

酵母 CLuc レポーターアッセイのコツ

2015年06月22日

1. β -Gal に替わるアッセイ法

ウミホタルルシフェラーゼ (CLuc) を用いた酵母レポーターアッセイは、CLuc が分泌型発光酵素であることから、従来から酵母で用いられてきた β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) によるレポーターアッセイに比較して、以下のような特徴を有しています。

特徴	理由
迅速・高感度	発光で測定するため
集菌・細胞破砕が不要	分泌型酵素であるため
同一サンプルの経時変化が追える	分泌型酵素で、かつ少量の培地のサンプリングで測定できるため

また、いくつかのプロモーター活性を比較したところ、その相対値は β -Gal の結果と対応しており (参考文献 1)、 β -Gal に替わるアッセイ法として期待できます。

2. 培養液・基質溶液の注意点

CLuc は酵母で生産されて培養液に分泌されるため、培養液環境の影響を受けます。したがって培養・測定において以下の点に注意が必要です。

(1) 培養液の pH

CLuc の安定性は pH に依存し、pH 5 以下の酸性領域においては不安定となります。一般に、酵母の培養液は調製時には pH6 程度ですが、酵母を植菌・培養すると徐々に下がり、stationary phase では pH 2-3 程度にまで低下します (特に SD などの最少培地で顕著)。このため、終濃度 0.2 M のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) を培地にあらかじめ加えることにより、培養液の pH を維持し、培養液中に分泌された CLuc の不活性化を防ぐ必要があります (図 1)。

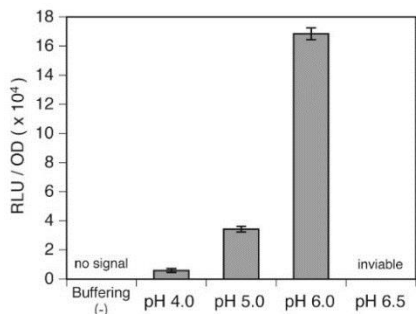


図1 培地の pH と酵母で発現した CLuc の活性

緩衝液なし、または緩衝液で pH を維持した最少培地で培養した形質転換酵母における培地中 CLuc 活性 (pH7.5 で測定)。pH5 以下では培地中の CLuc 活性が低下する。

(2) 培養液の成分

培養液中に分泌された CLuc の発光反応は、培養液に含まれる化学物質の影響を受ける可能性があります。これまでに調べた限りでは、高濃度のエタノールや銅の添加によって発光反応が若干阻害されます (図 2)。まだ調べられていない化学物質を培養液に添加する場合には、精製 CLuc 酵素 (アトー Cat. No. 3512030) を用いて CLuc 発光反応に対する化学物質の影響を予め調べておくことを推奨します。

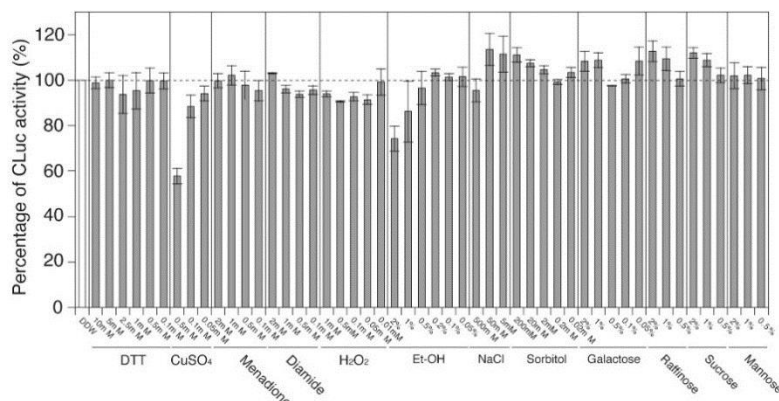


図2 CLuc 活性に対する化学物質の影響

CLuc を含む培地に各種化学物質を添加して CLuc 活性を測定

(3) 発光反応時の pH

CLuc の発光反応は弱酸性から弱アルカリ性の間で観察されますが、中性領域で最も強い発光反応を示します (図 3)。測定時に至適 pH7.4 付近にするために、アトー-CLuc 発光基質の製品に添付されているルシフェリン希釈液 ("Solution B") には 0.2 M Tris-HCl (pH 7.4) が添加されています。

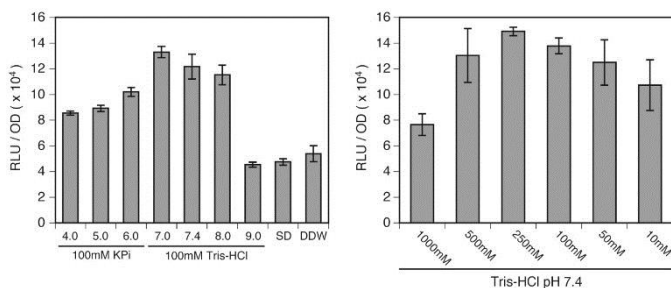


図3 CLuc 活性に対する測定時の緩衝液の pH と濃度の影響

緩衝液 (pH6) を含む培地で生産された CLuc について、緩衝液を添加して pH を再調整した場合の CLuc 活性を測定した (SD は培地、DDW は精製水を添加)。

3. CLuc 活性測定と標準化 (Normalization)

(1) 濁度 OD₆₀₀ による標準化

β -Gal のような細胞内レポーター酵素を用いてプロモーターの転写活性を測定する場合、一般的に細胞溶解液の蛋白質濃度を測定し、レポーター酵素活性をタンパク質濃度で除して標準化します。一方、分泌タンパク質である CLuc は、細胞数で CLuc 活性を標準化できるため、アッセイ系を劇的に簡略化することが可能です。細胞数を代表する値として濁度 OD₆₀₀ (660 nm などでも可) を測定し、CLuc 活性を OD₆₀₀ で除することによって標準化を行います。

$$[\text{転写活性値}] = [\text{CLuc 発光値}] / \text{OD}_{600}$$

培養液の組成や、プロモーターの強度によって条件が変動する可能性があります。対数増殖期であれば CLuc 活性と OD₆₀₀ の値の相関は直線性を示すことが過去の検討において示されています (参考文献 1 Fig. 2a)。

(2) 遠心分離を省略可能

一般的に培養液中の酵素活性を測定する際には、遠心分離により細胞を除去し、その上清を調製する必要があります。一方、酵母 CLuc レポーターアッセイでは、形質転換酵母が存在する培養液のまま CLuc 活性を検出できます。形質転換酵母を含む培養液を使った場合の CLuc 発光値は、遠心分離で細胞を除去して測定した CLuc 発光値よりも若干高い値となりますが、いずれも細胞数 (OD₆₀₀) との相関があるため、形質転換酵母を含む培養液のまま CLuc 活性を測定することができます。形質転換酵母を含む培養液の方が高い CLuc 活性を示すのは、分泌途中の CLuc も発光反応を触媒するためと考えられます。

(3) 活性の経時変化を測定

CLuc は培養液中に分泌されるので、培養液の一部を分取して CLuc 酵素活性とマイクロプレート OD₆₀₀ を測定することにより、一つのサンプルで転写活性の経時変化を測定することができます。

この場合、経時的に培養液を採取して測定しますが、全ての時間の採取終了後にまとめて測定する場合に注意する必要があります。酵母が存在する培養液は採取後も酵母が CLuc を分泌するため徐々に酵素活性が上昇していきます。このため、全てのサンプル採取終了後にまとめて測定したい場合などは、採取後すぐに遠心分離により菌体を除去し、上清を適宜測定まで冷蔵または冷凍保存することを推奨します。

4. 定量性確保のための培養方法

(1) 定量性のある OD₆₀₀ の範囲

CLuc は、前述のとおり pH を制御された培養液中では比較的安定であるため、時間と共に培養液中に蓄積します。このため、培養の後期には OD₆₀₀ で除する標準化をしても、すでに培養液中に蓄積した CLuc のために発光値が高くなる傾向にあります (参考文献 1 Fig. 2a)。したがって、定量性が認められる範囲 (OD₆₀₀ で除する標準化が可能な範囲) で測定するには、96 ウェルマイクロプレートに 200 μ l を入れてプレートリーダーで測定した OD₆₀₀ (以下、「マイクロプレート OD₆₀₀」) が 0.1-0.4 であることを確認して CLuc 酵素活性を測定することが推奨されます (1 cm 角キュベットを用いて吸光度測定した場合にはおよそ 0.2-0.8 に相当します)。

定性的あるいは半定量的な判定でよければ、マイクロプレート OD₆₀₀ が 0.4 を超えても問題ありません。

(2) OD₆₀₀ を調整するための培養

前述のように、定量性が認められる範囲 (OD₆₀₀ で除する標準化が可能な範囲) で CLuc 活性を測定するには、測定時のマイクロプレート OD₆₀₀ が 0.1-0.4 となるように植菌することが重要です。

Constitutive なプロモーター活性を測定する場合は、まず前培養を stationary phase まで行い、新しい培地に前培養液を適量加え (このとき、予定している時間 (一晚など) の培養後にマイクロプレート OD₆₀₀ が 0.1-0.4 となるように加減して植菌する)、培養後に CLuc 酵素活性とマイクロプレート OD₆₀₀ を測定することが推奨されます。

Inducible なプロモーターを使って誘導剤の影響を調べる場合は、まず前培養を stationary phase まで行い、新しい培地に前培養液を適量加え (このとき、予定している時間 (一晚など) の培養後にマイクロプレート OD₆₀₀ が (低めの) 0.05-0.2 となるように植菌する)、次いで誘導剤を添加し、適当な時間経過後に CLuc 酵素活性とマイクロプレート OD₆₀₀ を測定します。プロモーターの活性に依存しますが、誘導剤添加後 2 時間以降に活性測定をすることを推奨します。また、誘導前の CLuc 活性が既に高い場合などは、誘導剤添加の際、遠心分離により培養液を除去し、新しい培地と誘導剤を添加してから再度培養するという方法もあります。

5. 実験例

5.1 Constitutive な転写活性の測定（試験管培養の場合）

- (1) CLuc レポーターベクターで形質転換した酵母 *S. cerevisiae* のプレートから中程度の大きさのコロニーを複数個採取し¹、試験管の液体培地（終濃度 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 入り）² に接種する。
- (2) 至適温度条件下で stationary phase に達するまで培養を行う（例えば 30°C、一～二晩）。これを前培養とする³。
- (3) 前培養液の一部（例えば 25 μ l）を、新しい試験管の液体培地（例えば 5 mL）に接種する⁴。前培養液の量は、決めた時間⁵ 培養したあとで、マイクロプレート OD₆₀₀ の値が 0.1-0.4 程度となるように調節する。
- (4) 培養後、培養液 200 μ l を透明な 96 ウェルマイクロプレートに移し、プレートリーダーで OD₆₀₀（「マイクロプレート OD₆₀₀」）を測定する。発光値を測定するのに適したマイクロプレート OD₆₀₀ 値は 0.1-0.4 程度。
- (5) 培養液 20 μ l を 96 ウェルマイクロプレート（黒プレートを推奨）に移し、希釈済みのルシフェリン溶液 80 μ l⁶ を加えて、CLuc 活性をルミノメーター（アトー AB-2350 Phelios など）で測定する。

- 1 コロニーごとに発現の状況が若干異なります。中程度の大きさのコロニーを複数個混ぜて接種すると、より安定なデータが得られます。
- 2 CLuc が安定になる pH を維持するため、終濃度 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) を培地に加えてください。リン酸カリウム緩衝液は、培養液とは別にオートクレープしてから混合することをお勧めします（一部のアミノ酸は pH 6.0 では析出することがあるようです）。
- 3 定量性を重視する場合、測定時のマイクロプレート OD₆₀₀ を 0.1-0.4 にすることが重要です。コロニーを液体培地に植えて前培養無しで、予定した時間にマイクロプレート OD₆₀₀ をこの範囲にコントロールすることは難しいので、前培養して植え替えることをお勧めします。
- 4 植菌量は、形質転換酵母の増殖速度に依存して調節します。
- 5 一晩が便利です。
- 6 希釈には CLuc 発光基質製品に添付の基質希釈液 (Solution B) を使用します。

5.2 Inducible な転写活性の測定（試験管培養の場合）

- (1) CLuc レポーターベクターで形質転換した酵母 *S. cerevisiae* のプレートから中程度の大きさのコロニーを複数個採取し¹、試験管の液体培地（終濃度 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.9) 入り）² に接種する。
- (2) 至適温度条件下で stationary phase に達するまで培養を行う（例えば 30°C、一～二晩）。これを前培養とする³。
- (3) 前培養液の一部（例えば 25 μ l）を、新しい試験管の液体培地（例えば 5 mL）に接種する⁴。前培養液の量は、決めた時間⁵ 培養したあとで、マイクロプレート OD₆₀₀ の値が 0.05-0.2 程度となるように調節する⁷。
- (4) 培養後、培養液 200 μ l を透明な 96 ウェルマイクロプレートに移し、プレートリーダーで OD₆₀₀（「マイクロプレート OD₆₀₀」）を測定する。望ましいマイクロプレート OD₆₀₀ 値は 0.05-0.2 程度⁸。
- (5) 培養液に誘導剤を添加し、培養を続ける。誘導が検出できるまで通常 2 時間程度かかる。
- (6) 適当な時間に、培養液 20 μ l を 96 ウェルマイクロプレート（黒プレートを推奨）に移し、希釈済みのルシフェリン溶液 80 μ l⁶ を加えて、CLuc 活性をルミノメーター（アトー AB-2350 Phelios など）で測定する。
また、同時に培養液 200 μ l を取り、マイクロプレート OD₆₀₀ を測定する。発光値を測定するのに適したマイクロプレート OD₆₀₀ 値は 0.1-0.4 程度。
サンプリングを繰り返して転写活性の経時変化を追うこともできる⁹。

- 7 誘導剤を添加して、転写活性が検出できるようになるまでしばらく培養が必要となりますが、その間にも酵母は増殖するので、マイクロプレート OD₆₀₀ が低めになるように調節します。
- 8 直線性を重視する場合、長時間培養することによりマイクロプレート OD₆₀₀ 値は 0.4 を超えないように、誘導剤添加時の培養液のマイクロプレート OD₆₀₀ 値は 0.1 より低くします。
- 9 全ての時間のサンプル採取終了後にまとめて測定したい場合は、採取後すぐに遠心分離により菌体を除去し、測定まで上清を冷蔵または冷凍保存することを推奨します。

5.3 Constitutive な転写活性の測定（96 ウェルプレート培養の場合）

- (1) 96 ディープウェルプレートの各ウェルに液体培地（終濃度 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 入り）² 1 ml を入れ、CLuc レポーターベクターで形質転換した酵母 *S. cerevisiae* のプレートから中程度の大きさのコロニーを接種する。
- (2) シールでふたをして¹⁰、至適温度条件下で stationary phase に達するまで培養を行う（例えば 30°C、二晩）。これを前培養とする³。
- (3) 新しい 96 ディープウェルプレートの各ウェルに液体培地（終濃度 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 入り）² 1 ml を入れ、前培養液の一部（例えば 5 μl）を 96 ディープウェルプレートの各ウェルに接種する⁴。前培養液の量は、決めた時間⁵ 培養したあとで、マイクロプレート OD₆₀₀ の値が、0.1-0.4 程度となるように調節する¹¹。
- (4) 培養後、培養液 200 μl を透明な 96 ウェルプレートに移し、プレートリーダーで OD₆₀₀（「マイクロプレート OD₆₀₀」）を測定する。望ましい値は 0.1-0.4 程度。
- (5) 培養液 20 μl を 96 ウェルマイクロプレート（黒プレートを推奨）に移し、希釈済みのルシフェリン溶液 80 μl⁶ を加えて、CLuc 活性をルミノメーター（アトー AB-2350 Phelios など）で測定する。

¹⁰ 通気性がよく水分を透過しにくいものを使用します。例えば Thermo Scientific 社 Gas Permeable Adhesive Seal AB-0718

¹¹ ウェルごとに形質転換体異なる場合は、決めた時間（一晩が便利）培養後に多くのウェルの培養液のマイクロプレート OD₆₀₀ 値が 0.1~0.4 となるよう、前培養液の添加量をウェルごとに調節することをお勧めします。

5.4 Inducible な転写活性の測定（同一の形質転換体を用いた誘導剤の比較など） （96 ウェルプレート培養の場合）

- (1) CLuc レポーターベクターで形質転換した酵母 *S. cerevisiae* のプレートから中程度の大きさのコロニーを複数個採取し¹、試験管の液体培地（終濃度 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 入り）² に接種する。
- (2) 至適温度条件下で stationary phase に達するまで培養を行う（例えば 30°C、二晩）。これを前培養とする³。
- (3) 前培養液の一部（例えば 500 μl）を、新しいフラスコの液体培地（例えば 100 mL）に接種する⁴。前培養液の量は、決めた時間⁵ 培養したあとで、マイクロプレート OD₆₀₀ の値が、0.05-0.2 程度となるように調節する⁷。
- (4) 培養後、培養液 200 μl を透明な 96 ウェルプレートに移し、プレートリーダーで OD₆₀₀（「マイクロプレート OD₆₀₀」）を測定する。望ましい値は 0.05-0.2 程度⁸。
- (5) 96 ディープウェルプレートの各ウェルに上記培養液 1 ml を入れ、誘導剤を添加する。発光が検出できるまで 2 時間程度かかる。
- (6) 適当な時間に、培養液 20 μl を 96 ウェルマイクロプレート（黒プレートを推奨）に移し、希釈済みのルシフェリン溶液 80 μl⁶ を加えて、CLuc 活性をルミノメーター（アトー AB-2350 Phelios など）で測定する。
また、同時に培養液 200 μl を取り、マイクロプレート OD₆₀₀ を測定する。発光値を測定するのに適したマイクロプレート OD₆₀₀ 値は 0.1-0.4 程度。
サンプリングを繰り返して転写活性の経時変化を追うこともできる⁹。

<参考文献>

1 Y. Tochigi *et al.*: Sensitive and Convenient Yeast Reporter Assay for High-Throughput Analysis by Using a Secretory Luciferase from *Cypridina noctiluca*. *Anal. Chem.* 82, 5768-5776 (2010).

執筆・監修

産業技術総合研究所 扇谷 悟

日本獣医生命科学大学 柄木裕貴



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- ペリスタポンプ
- クロマトグラフ
- 電気泳動分析機器

- DNA分析装置
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- バイオ研究機器
- 医療分析装置

- 本 社 〒111-0041 東京都台東区元浅草 3-2-2
- ◆技術サービス
- 技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東 2-21-6
- センター (東京都許可 医療機器製造業)
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満 2-8-1

- TEL (03) 5827-4861 (代表) FAX (03) 5827-6647
- TEL (03) 5827-4873 (代表) FAX (03) 5827-4874
- TEL (03) 5818-7560 (代表) FAX (03) 5818-7563
- TEL (06) 6136-1421 (代表) FAX (06) 6356-3625

■URL <http://www.atto.co.jp/>