

■■■ Luciferase assay のコツ ■■■

■ プロモーターバンク事業では未公開分を含めて、これまでに 584 通りのルシフェラーゼアッセイを行いました。これまでのアッセイを通じて経験した細胞の取り扱いについて述べます。

■ 使用したすべての細胞に使えることですが、transfection の当日に密度が 70~90%になるよう細胞を播種することで遺伝子導入効率を上げることが出来ます。また transfection 後の培地交換は、極力細胞にストレスを与えないように慎重に行うとよいでしょう。PBS(-)で洗浄を行うよう指示するプロトコールもありますが、これを行うことで細胞がダメージを受けて浮遊してしまい、アッセイをしようとした時（ここでは transfection より 48hr 後）には細胞が死滅しているということもあるので注意する必要があります。細胞が浮遊してしまってもアッセイをしてみるとルシフェラーゼ活性を測定できることもありますので、最適な条件を検討した上で接着細胞が減ってしまっても諦めずにアッセイしてみることをお勧めします。

■ 各細胞ごとの継代時、アッセイ時の注意点は下記の通りです。また、分化実験を行った場合は培養条件と参考文献を付記しました。

■ HeLa: 比較的容易に培養できる。

分化用培地の組成と方法: ①+20% FCS: Transfection より 6hr 後、通常培地に medium change (以下 MC) し、さらに 30min 後 MC (DMEM + 20% FCS)。②+TNF α : Transfection より 6hr 後 MC (DMEM + TNF α 1 μ g/ml)。

参考文献: ① M. Kurabayashi. *et al.* (1995): Sequences of the 5'-flanking region of the human helix-loop-helix protein-encoding *Id2A* gene, and

promoter activity regulated by serum and c-Jun/AP-1. *Gene* 156, 311-312. ② C. Y. Ito *et al.* (1994): Three NF- κ B sites in the I κ B- α promoter are required for induction of gene expression by TNF α . *Nucleic Acids Res.* 22, 3787-3792.

■ HepG2: 剥がれにくく集塊を形成しやすい細胞なので、トリプシン処理を行ったあとにピペティングをよく行い、細胞を分散させてから播種するとよい。

分化用培地の組成と方法: ①+dexamethasone: Transfection より 6hr 後 MC (MEM + dexamethasone 1 μ M)。②heat shock: Transfection より 1hr 後 medium addition。さらに 5hr 後 MC +42 $^{\circ}$ C incubation。③+CoCl $_2$: Transfection より 6hr 後 MC (MEM + CoCl $_2$ 150 μ M)。Transfection より 24hr 後 Assay。

参考文献: ① H. Nakabayashi. *et al.* (1989): Transcriptional regulation of α -fetoprotein expression by dexamethasone in human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 264, 266-271. ② R. C. Smith *et al.* (2002): Spatial and temporal control of transgene expression through ultrasound-mediated induction of the heat shock protein 70B promoter *in vivo*. *Human Gene Ther.* 13:697-706. ③ E. Minet *et al.* (1999): HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and *cis* elements located within the 5' URT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 534-540.

■ HEK293: 細胞培養用のノンコートディッシュでも培養可能であるが、接着力が弱く剥がれやすい。どう

しても剥がれてしまう場合にはコラーゲンコート
のディッシュを使用するとよい。

■ Saos-2: 長期継代すると不規則な形態を示す細胞
が現れる場合がある。

分化用培地の組成と方法: serum starvation:
Transfectionより6hr後MC (McCoy's 5A + 0.5% FCS)。
Transfectionより24hr後 Assay。

参考文献: A. Zaika. *et al.* (2001): Oncogenes induce
and activate endogenous p73 protein. *J. Biol. Chem.*
276, 11310-11316.

■ MCF-7: 長期継代すると性質が変化するため、ア
ッセイにはなるべく継代数の少ない細胞を使用する。

分化用培地の組成と方法: +progesterone:
Transfectionより6hr後MC (DMEM + progesterone 10
ug/ml)。

参考文献: K. Nishida *et al.* (1997): Identification
of regulatory elements of human α_6 integrin subunit
gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 258-263.

■ B16: pH が下がりやすいので、細胞密度の高い状
態が続かないようにする。

■ NIH3T3: 飽和密度になると接触阻害を起こすため、
継代は細胞同士に隙間があるうちに行う。

分化用培地の組成と方法: serum starvation:
Transfectionより6hr後MC (DMEM + 0.5% FCS)。
Transfectionより24hr後MC (DMEM + 10% FCS)。

参考文献: J. Schaley *et al.* (2000): Induction of the
cellular E2F-1 promoter by the adenovirus E4-6/7
protein. *J. Virol.* 74, 2084-2093.

■ WI38: 有限の寿命しかもたないので、飽和密度に
ならなくなったら増殖期が終了したと判断し、アッセ

イには使用しない。

■ C2C12: 比較的容易に培養できる。

分化用培地の組成と方法: ①+DM: Transfectionより
6hr後MC (DMEM + FCS-, insulin 10 ug/ml, transferrin
10 ug/ml)。②+2% horse serum: Transfectionより6hr
後MC (DMEM + horse serum 2%)。

参考文献: ①H.-S. Kwon *et al.* (2004): Protein
kinase B- α inhibits human pyruvate dehydrogenase
kinase-4 gene induction by dexamethasone through
inactivation of FOXO transcription factors.
Diabetes 53, 899-910. ②M. M. Katabi *et al.* (1999):
Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter
for gene-targeted therapy differentially expressed
and regulated in human cancer cells. *Hum. Gene Ther.*
10, 155-164.

■ CHO-K1: 比較的容易に培養できる。

■ GOS-7: トリプシン処理をしすぎると付着率が低
下するので注意。

■ F9: 長期間の培養で性質が変化することが多いた
め、継代は一定の条件で行う。コラーゲンコート
のディッシュを使用することで細胞の生存率が上がる。

分化用培地の組成と方法: +RA: Transfectionより6hr
後に通常培地にMCし、さらに30min後MC (DMEM +
retinoic acid 5 uM)。Transfectionより72hr後 Assay。

参考文献: J. P. Donahue *et al.* (1994): The integrin
 α_v gene: identification and characterization of
the promoter region. *Biochem. Biophys. Acta* 1219,
228-232.

■ LNCaP.FGC: 接着力が弱く、非常にはがれやすい
のでコラーゲンコート
のディッシュを使用する。

Transfection 後の培地交換は特に剥がれやすい。膜状に一気に剥がれてしまうので注意が必要。

分化用培地の組成と方法: +dexamethasone: Transfection より 24hr 後 MC (RPMI1640 + dexamethasone 10 μ M)。

参考文献: H. Uemura *et al.* (1995): Identification of a new enhancer in the promoter region of human TR3 orphan receptor gene. *J. Biol. Chem.* 270, 5427-5433.

■ MIN7: 接着に時間がかかり、接着力も弱いので transfection の際は早めに細胞を播種しておく。

■ MtT/SM: 半浮遊細胞であり接着力が弱いので、コラーゲンコートでのディッシュを使用する。球状の細胞が塊になって増え、多少塊が分散しにくい細胞が痛みやすいので無理にほぐさなくてよい。

■ NEC8: 接着に時間がかかり、接着力も弱いので transfection の際は早めに細胞を播種しておく。浮遊した細胞塊も生細胞である。

■ PC12: 接着力は弱いコラーゲンコートでのディッシュを使用すると生着が非常によくなる。アッセイ時、神経系に分化させる際にはポリリジンコートプレートを使用する。

分化用培地の組成と方法: +NGF: Transfection より 6hr 後に通常培地に MC し、さらに 30min 後 MC (DMEM + NGF 100 ng/ml)。

参考文献: M. Mbikay *et al.* (2002): Characterization of a repressor element in the promoter region of proprotein convertase 2 (PC2) gene. *Mol. Brain Res.* 102, 35-47.

■ IEC6: 他の細胞と同様の条件で Lipofectamine

2000 (Invitrogen)を用いた transfection では細胞が死滅してしまい、ルシフェラーゼ活性も測定できなかった。

■ K562: 浮遊細胞であり transfection 後の培地交換で細胞も吸ってしまう可能性があるで、培地添加に変更しアッセイ時に不必要分の上清をとり除くほうがよい。

分化用培地の組成と方法: +TPA: Transfection より 6hr 後 medium addition (RPMI1640 + TPA f.c. 50ng/ml)。
参考文献: M. Villa-Garcia. *et al.* (1994): Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human β_3 integrin gene. *Blood* 83, 668-676.

■ 以上の transfection はすべて Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて行いました。リン酸カルシウム法等、他の方法で transfection する場合には培養条件が異なる場合があります。予備実験を行い適切な条件を探して下さい。

■ アッセイに使用した細胞のうち MIN7 は宮崎純一先生(大阪大学大学院医学系研究科)よりご供与していただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。また HeLa、CHO-K1、MtT/SM、NEC8、IEC6 は理研 BRC 細胞材料開発室、MCF7 は(財)ヒューマンサイエンス振興財団 研究資源バンク、HEK293、LNCaP、FGC は ATCC より入手いたしました。(M. H. & M. Y.)
(2006. 02. 24)

=====

発行
理化学研究所・バイオリソースセンター
遺伝子材料開発室
dnabank@brc.riken.jp
<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

=====