

CONTENTS:

REVIEW

NLRP1 & NLRP3: a tale of two inflammasome sensors

PRODUCTS

NLRP1 inflammasome cellular assays

- NLRP1 reporter Cells
- NLRP1 inflammasome inducer

TLR4 reporter cell lines

- THP1-Dual™ Cells
- THP1-Dual™ MD2-CD14-TLR4 Cells
- THP1-Dual™ MD2-CD14 KO-TLR4 Cells

QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia

A secreted luciferase detection reagent

Mycoplasma detection with MycoStrip™

- MycoStrip™ 10/20/50 tests
- MycoStrip™ 50 tests (without cassettes)
- MycoStrip™ 100 tests (without cassettes)

InvivoGames

Brain stimulation assay

NLRP1 & NLRP3: a tale of two inflammasome sensors

2000年代初頭、最初に報告されたインフラマソームである NLRP1 および NLRP3 は、危険シグナルを感知する、サイトゾルの複数タンパク質複合体で構成されています。活性化されたインフラマソームは、成熟および炎症性サイトカイン IL-1 β および IL-18 の放出を機能させます¹。NLRP1 は NLR(ヌクレオチド結合ドメインロイシンリッチリピート受容体)ファミリーの最初に同定されたメンバーでしたが、その機能的関連は長年にわたりはっきりとしないままでした。一方、NLRP3 は急速に典型的で最も特徴が解き明かされたインフラマソームとなり、II型糖尿病、痛風性関節炎、およびがんを含む、膨大な数の疾患と状態と関連付けられています²。今日、NLRP1 研究は、新たな勢いに達しています。ウイルス感染^{3,4}、および UVB 放射線⁵ は、ヒトにおいて NLRP1 の天然のトリガーであることが同定されています。さらに、NLRP1 の過剰な活性化は、新型コロナウイルス感染の状況下で、新型コロナウイルス感染症の重症度にも寄与しており⁴、また NLRP1 の機能獲得型変異は、扁平上皮癌感受性の上昇につながります⁶。これらの新しい発見が、インフラマソーム分野で NLRP3 を引きずり落とすと推測したくなります。実際に、いくつかの疾患では、NLRP3 の活性化はその他のインフラマソーム反応による傍観者効果の可能性があります。恒常性および病理学的背景における NLRP1 および NLRP3 の役割の解釈は、微生物および非感染症の新しい治療法につながります。今回、当社ではこれら 2 つのセンサーについての最新の知識をレビューし、病態生理学におけるそれぞれの役割を評価する際の実験的難題について議論します。

Of mice and men

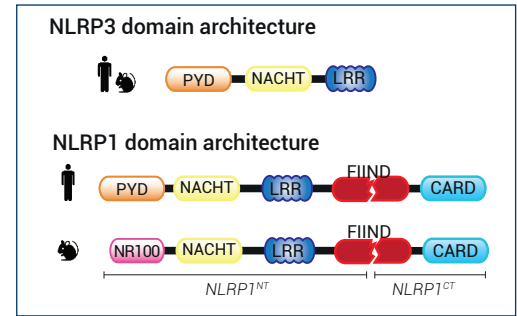
NLRP3 および NLRP1 は、組織での発現、タンパク質構造および活性化メカニズムなど、多くの点で異なります。さらに、NLRP3 はヒトとマウスの間で高度に保存されている一方、NLRP1 はそれがあてはまりません。

• Expression

ヒトでは、一つの NLRP1 遺伝子が選択的にスプライスされ、アイソフォーム 1 が最も研究されています⁷。対照的に、マウスでは複数遺伝子構成を示しています。最新情報の多くは、マウス Nlrp1b パラログに焦点を当てています⁸。ヒト NLRP1 は上皮バリア(すなわち、ケラチノサイトおよび気管支上皮細胞)で高発現している一方、マウス NLRP1B およびヒト/マウス NLRP3 は主に骨髓細胞で見られます⁸。

• Architecture

NLR タンパク質は通常、N 末端エフェクタードメイン、中央ヌクレオチド結合ドメイン(NACHT)およびいくつかのロイシンリッチリピート(LRRs)で構成される C 末端リガンド結合領域を特徴としています。NLRP および NLRC サブグループは、それぞれ N 末端のピリンドメイン(PYD)およびカスパーゼリクルートメントドメイン(CARD)が異なります。



NLRP3 は PYD-NACHT-LRR モジュールで構成され、NACHT および LRR ドメインが相互作用し、NLRP3 を自己抑制/閉鎖構造の状態で維持しています。NLRP3 が活性化すると、PYD はインフラマソーム形成を推進します⁹。

NLRP1 の構造は、NLRP3 および他の NLRP タンパク質と対照的です。N 末端の PYD-NACHT-LRR モジュールに加え、C 末端 CARD ドメインの上流にある function-to-find-domain ファンクショントウファインドドメイン(FIIND)を特徴としています。FIIND は恒常的な自己タンパク質分解を受け、N 末端(NLRP1^{NT})および C 末端(NLRP1^{CT})フラグメントが非共有結合で残ったままの“ライセンスされた”全長 NLRP1 (NLRP1^{FL})を生成します¹⁰。構造研究で、1 つの NLRP1^{FL} および 1 つの NLRP1^{CT} がジペプチジルペプチダーゼの DPP8/9 に結合し、インフラマソームを形成する NLRP1^{CT} を抑制する、三重複合体が明らかになりました。どのように単一の NLRP1^{CT} が最初に生成されるかは不明です。NLRP1^{CT} が放出されると、CARD は NLRP1 インフラマソーム形成を推進します。特にマウスでは、PYD は NR100 ドメインに置き換えられています。

これらの新しい発見が、インフラマソーム分野で NLRP3 を引きずり落とすと推測したくなります。

• NLRP3 inflammasome formation

NLRP3 は、幅広い刺激(微生物による刺激、無菌状態での刺激、または環境からの刺激)を感知できます。しかし、NLRP3 リガンドそれ自体は説明されておらず、また根本的な NLRP3 活性化の正確なメカニズムは、まだ十分に解明されていません。K⁺ 流出および酸化ミトコンドリア DNA などの細胞質ストレスシグナルが、NLRP3 の翻訳後修飾および開裂に寄与する、というのが、今日現在の考え方です^{12,13}。この NLRP3 構造の変化により、PYD は PYD/CARD 含有アダプターである ASC を介したプロカスペーゼ 1 のリクルートを可能にします¹²。NimA 関連プロテインキナーゼ 7 (NEK7) は LRR と相互作用し、マウスでは NLRP3 のオリゴマー形成を補助しているという説が出されています^{14,15}。ヒトでは必須ではありません¹⁶。重要な点として、NLRP3 の活性化段階はヒトおよびマウスで高く保存されているとみられ、マウス疾患モデルを使用した NLRP3 関連の研究を可能にしています。



2020年以來、ヒトNLRP1活性化についての理解が加速しています。多くの報告が“機能分解”モデルに沿っており[...]

● NLRP1 inflammasome formation

NLRP1 インフラマソームの理解での大きな隔たりは、マウスモデルにおいて、炭疽菌致死因子(LF)がNLRP1活性化を示し、また炭疽菌感染により炎症性反応を促進すると報告された、2012年に埋まりました¹⁷。しかし、この発見はヒトでは再現できませんでした¹⁰。2020年以來、ヒトNLRP1活性化についての理解が加速しています。多くの報告が“機能分解”モデルに沿っており、以下にリストされるような異なる刺激が、NLRP1^{NT}部位の不安定化およびプロテアソーム分解を誘発し、NLRP1^{CT}フラグメントの放出を可能にします。

- Val-boroPro (VbP, Talabostat) は、マウスおよびヒトの両方において、抗がん免疫反応を刺激、DPP8/9の触媒活性を阻害、およびNLRP1^{NT}分解を誘導することが知られている低分子です^{11,18}。特に、現在の所、DPP8/9阻害剤として作用することが同定された、(病態)生理学的にコードされる分子はありません。

- 病原体コードタンパク質、特に一般的な風邪の原因物質であるヒトライノウイルス由来の3Cpro³、および新型コロナウイルス感染症の原因物質であるSARS-CoV-2由来のNSP5⁴のようなプロテアーゼは、NLRP1^{NT}分解およびNLRP1活性化を誘導することが示されています。そのため、NLRP1は微生物毒性因子の広いおとり受容体として作用することが示唆されています。これらのトリガーは、ヒトまたはマウスNLRP1に限局的であり、宿主および病原体の共進化を実証しています。

- 紫外線B (UVB) 放射線は、MAP3 キナーゼ ZAK α を介したリボトキシクストレス反応を引き起こします。このキナーゼはNLRP1^{NT}の過剰リン酸化を惹起し、その分解を加速する可能性があります⁵。

- 長鎖二本鎖RNA (dsRNA) は、セムリキ森林ウイルスの複製時に生成され、ヒトのNLRP1活性化を誘発しますが、マウスでは誘発しません¹⁹。このケースでは、NLRP1が構造をスイッチし、NLRP1^{NT}分解を起こしている可能性があります¹⁹。

NLRP1^{CT}フラグメントが放出されるメカニズムの同定については、まださらなる研究が必要とされています。

● NLRP3 and NLRP1 safeguards

センサー活性化およびインフラマソーム形成は、迅速および強力な炎症性反応を引き起こし、誤って誘発された場合は、きわめて有害です。そのため、不要な活性化を防ぐために、複数の防止装置がインフラマソーム反応の全段階で存在しています。少なくともNLRP3およびNLRP1において、そのようなチェックポイントがセンサーレベルで説明されています。

NLRP3活性化は、二つのシグナルで制御されています。最初のプライミングシグナルはNLRP3センサーを二次活性化シグナルにตอบสนองさせます。プライミングシグナルは、PRRs(病原体認識受容体)またはサイトカイン受容体によって運ばれます。シグナルそのもの、および持続時間と同様に、細胞の種類によって、NLRP3プライミングは転写のアップレギュレーション、翻訳後修飾、またはNEK7のようなタンパク質パートナーとの結合によって生じます^{13,20}。最近、Schmackeらは、IKK β 非依存性および優勢なNLRP3のプライミング経路をヒトにおいて同定しました¹⁶。著者らは、IKK β がNLRP3インフラマソームの組み立てで主要な役割を果たしていると考えられている細胞内小器官である、トランスゴルジネットワーク(TGN)へのリクルートメントを増加させることで、NLRP3プライミングを誘導することを示しました^{12,16,21}。

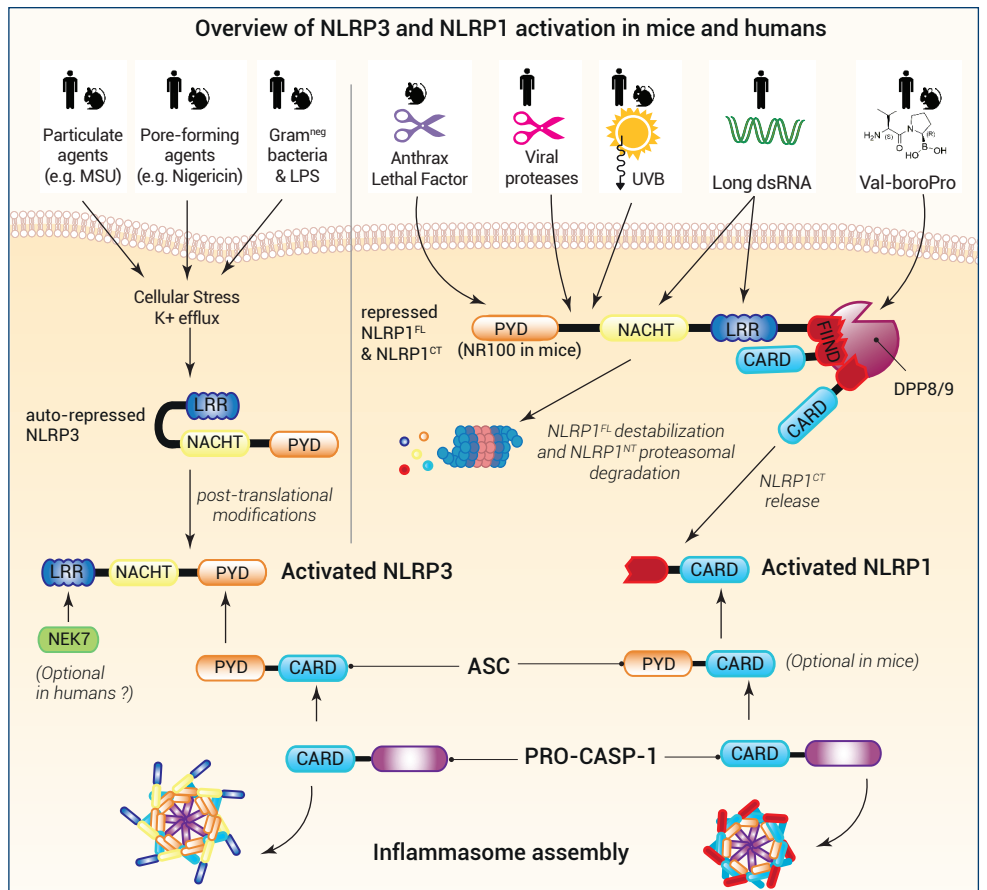
NLRP1活性化は、NLRP1インフラマソーム形成のチェックポイントとして示唆されている三重複合体DPP8/9-NLRP1^{FL}-NLRP1^{CT}からの機能性NLRP1^{CT}フラグメントの放出によって管理されています^{11,22}。Ballらによる最近の報告では、ホメオスタシスの間、NLRP1^{FL}

は酸化チオレドキシシン-1(TRX-1)と関連しており、また還元ストレスがそれらの解離およびNLRP1^{NT}部分のプロテアソーム分解を引き起こすことを示しました。その結果生じるNLRP1^{CT}フラグメントは、二次シグナルによってインフラマソーム組み立てのために放出されるまで、隔離および三重複体内で抑制されます²²。これらの*in vitro*データは、還元ストレスがNLRP1活性化を促進することを強く示唆しています。しかし、還元ストレスの生理学的な誘導物質の同定には、さらに研究が必要です。そのうえ、還元ストレス時のNLRP1^{NT}の分解がプライミングステップとして作用するのか、またはそれがNLRP1インフラマソーム形成を誘導するのか不明です。両方の場合において、還元ストレスによるNLRP1^{NT}の分解後のNLRP1^{CT}蓄積およびその他の刺激(例: ウイルスプロテアーゼ、UVB放射線)が、三重複合体チェックポイントを解除している可能性があります^{11,22}。

インフラマソーム形成上流の、NLRP3およびNLRP1センサーのプライミングと活性化の境界は、主要な研究軸のままです。

● Signaling

活性化NLRP3およびNLRP1センサーは、それぞれPYDおよびCARDドメインを通してASCと結合し、プロカスペーゼ-1をリクルートします^{12,23}。ヒトでは、NLRP1とプロカスペーゼ1の相互作用は厳密にASC依存的ですが、マウスでは必須ではありません²³。最終的に、この複合体はカスペーゼ1活性化を引き起こし、pro-IL-1 β およびpro-IL-18、またガスターミンD(GSDMD)を次々に切断し、それぞれの生理活性型にします。細胞膜でのGSDMD孔

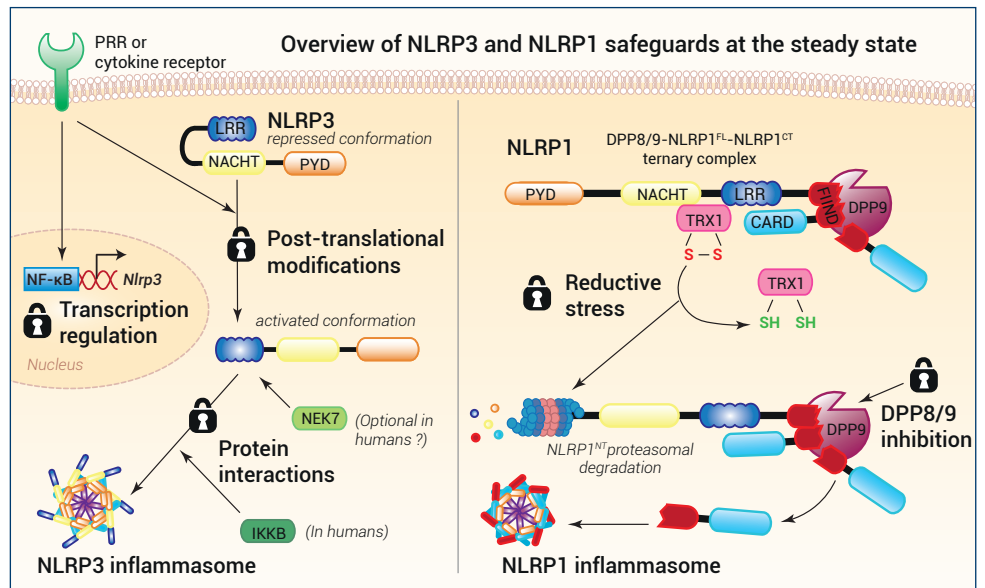


の形成は、IL-1 β およびIL-18の分泌を可能にし、最終的にパイロトーシス細胞死をもたらします²⁴。

特に、NLRP3 および NLRP1 インフラマソームは、さらにシグナル伝達メカニズムを使用している可能性があります。不活性/ロックアウトカスパーゼ-1またはGSDMDを持つマウスでは、NLRP3 インフラマソームはカスパーゼ-8、カスパーゼ-3、およびガスターミンE (GSDME) を介在した、遅延型の代替型細胞死に関与しています^{25,26}。ヒト肺上皮細胞では、新型コロナウイルスプロテアーゼ NSP5 が NLRP1 インフラマソームシグナル伝達を、GSDMD の不活化によって拮抗させています。感染細胞の死は NLRP1 駆動型のカスパーゼ-3 の活性化および GSDME 切断によって確保されています⁴。興味深い事に、新型コロナウイルス感染症の重症患者は、インフラマソームマーカー (IL-18、GSDMD、GSDME、カスパーゼ-3)、およびカスパーゼ-3 由来アラミンである成熟 IL-16 の血漿中レベル上昇を示しています⁴。この発見は、ほとんど知られていない IL-16 の役割および作用メカニズムを今後の *in vivo* 研究が解明することを期待させるものです。さらに、カスパーゼ-3 - GSDME 軸がサイトカイン放出および/または溶解期の代償的または並行的なシグナル伝達経路であるのかは、各インフラマソームにおいて未解明のままです²⁶。

Future challenges

インフラマソームは病原体の排除に効果的ですが、その過剰刺激は生体にとって有害にもなり得ます^{2,27,28}。そのため、炎症性サイトカインの全身的なブロック、およびそれによって生じる日和見感染を防ぐために、細かい治療戦略を開発することが重要です。重度の新型コロナウイルス感染症では、NLRP3 反応の悪化を示している可能性があります。報告では NLRP3 とインフラマソームスペックは、患者の単球細胞で共染色されることが示されています²⁹。NLRP3 の肺病理学における関与も、新型コロナウイルス感染マウスモデルを使用して証明されています³⁰。しかし、最近の新型コロナウイルス NSP5 プロテアーゼによる NLRP1 活性化の発見は、実験デザインに注意を求めています。ウイルスへのダイレクトな NLRP3 反応をほのめかすデータは、NLRP1 インフラマソーム反応による細胞ストレスによるものでもある、という可能性はないでしょうか？



同様に NLRP3 活性化は、呼吸器ウイルス感染によく見られる現象である、バクテリア二次感染からのリポポリサッカライド (LPS) に対する、非カノニカルなカスパーゼ-4/5 の反応によって誘発される可能性があります³¹。

各インフラマソーム、および感染と病原性の流れの間のフィードフォワードループの相対的重要性の解釈は、*in vivo* での研究を必要とします。マウスとヒトの間の低い NLRP1 保存性を回避するための一つの戦略として、トランスジェニック発現により、マウスインフラマソームの要素をヒトに相当する物で置換した、ヒト化マウスの使用があります。

感染の無い状態、または無菌性炎症では、NLRP3 および NLRP1 での機能獲得型 (GOF) 変異が、一遺伝子性のヒト炎症性疾患 (つまり、インフラマソーム症) を引き起こします^{32,33}。そのため、NLRP3 でのこのような変異は、クリオピリン関連周期性症候群 (CAPS) を引き起こす一方、NLRP1 での GOF 変異は NLRP1 関連自己炎症性関節炎 (NAID) および多発性自己治療性掌蹠瘡 (MSHPC) のような状態を引き起こします^{32,33}。

興味深い事に、多くの NLRP3 および NLRP1 自己炎症性変異は、センサー阻害に必須のドメインに存在します^{32,33}。そのため、特定のセンサーをターゲットすることにより、インフラマソーム過剰活性化を防ぐ低分子をスクリーニングするための、最初の試験場を提供しています。マウス炎症性疾患モデルは、強力で特異的な NLRP3 阻害剤である MCC950 のスクリーニングおよび発見を可能にしました^{34,35}。この将来有望な薬剤は、臨床試験第 II 相で試験、および追加試験を待っています。さらに、製薬会社を刺激し、現在他のいくつかの NLRP3 阻害剤は臨床試験で先行しています³⁶。

公衆衛生におけるインフラマソーム関連疾患の負担軽減には、多くの疑問が残ったままで、さらなる研究が必要とされています。

インフラマソーム形成上流の、NLRP3 および NLRP1 センサーのプライミングと活性化の境界は、主要な研究軸のままです。

- Martinson, F. and J. Tschopp. *Cell Death Differ.* 2007. 14(1): p. 10-22.
- Mangan, M.S.J., et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018. 17: p. 588.
- Robinson, K.S., et al., *Science*, 2020: p. eaay2002.
- Planès, R., et al., *Molecular Cell*, 2022. 82(13): p. 2385-2400.e9.
- Robinson, K.S., et al., *Science*, 2022. 377(6603): p. 328-335.
- Zhong, F.L., et al., *Cell*, 2016. 167(1): p. 187-202.e17.
- Fenini, G., et al., *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(13): p. 4788.
- Bauernfried, S. and V. Hornung, *J Exp Med*, 2022. 219(1).
- Tschopp, J. and K. Schroder, *Nature Reviews Immunology*, 2010. 10(3): p. 210-215.
- Chavarría-Smith, J., et al., *PLoS Pathogens*, 2016. 12(12): p. e1006052.
- Hollingsworth, L.R., et al., *Nature*, 2021. 592(7856): p. 778-783.
- Swanson, K.V., M. Deng, et al., *Nature Reviews Immunology*, 2019. 19(8): p. 477-489.
- Gros Lambert, M. and B.F. Py, *J Inflamm Res*, 2018. 11: p. 359-374.
- He, Y., et al., *Nature*, 2016. 530: p. 354.
- Sharif, H., et al., *Nature*, 2019. 570(7761): p. 338-343.
- Schmacke, N.A., et al., *Immunity*, 2022. 55(12): p. 2271-2284.e7.
- Kovarova, M., et al., *The Journal of Immunology*, 2012. 189(4): p. 2006-2016.
- Chui, A.J., et al., *Science*, 2019. 364(6435): p. 82-85.

- Bauernfried, S., et al., *Science*, 2020: p. eabd0811.
- Christgen, S., D.E. Place, et al., *Cell Research*, 2020.
- Hamilton, C. and P. Anand, *F1000Research*, 2019. 8(676).
- Ball, D.P., et al., *Sci Immunol*, 2022. 7(77): p. eabm7200.
- Ball, D.P., et al., *Life Sci Alliance*, 2020. 3(3).
- Kovacs, S.B. and E.A. Miao, *Trends in Cell Biology*, 2017. 27(9): p. 673-684.
- Schneider, K.S., et al., *Cell Rep*, 2017. 21(13): p. 3846-3859.
- Zhou, B. and D.W. Abbott, *Cell Rep*, 2021. 35(2): p. 108998.
- Platnich, J. and D. Muruve, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019. 670.
- Xue, Y., et al., *Trends in Immunology*, 2019. 40(11): p. 1035-1052.
- Rodrigues, T.S., et al., *Journal of Experimental Medicine*, 2021. 218(3): p. e20201707.
- Zeng, J., et al., *EBioMedicine*, 2022. 75: p. 103803.
- Vora, S.M., J. Lieberman, et al., *Nat Rev Immunol*, 2021. 21(11): p. 694-703.
- Alehashemi, S. and R. Goldbach-Mansky, *Front Immunol*, 2020. 11: p. 1840.
- Lin, B. and R. Goldbach-Mansky, *J Allergy Clin Immunol*, 2022. 149(3): p. 819-832.
- Coll, R.C., et al., *Nat Med*, 2015. 21(3): p. 248-55.
- Coll, R.C., et al., *Nature Chemical Biology*, 2019. 15(6): p. 556-559.
- Chen, Q.-L., et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021. 138: p. 111442.

NLRP1 inflammasome cellular assays

InvivoGen 社はヒト NLRP1 インフラマソームの研究促進のため、一連の A549 ヒト肺癌由来レポーター細胞株を提供しています。NLRP1 と NF- κ B 誘導 ASC::GFP 融合タンパク質の安定な発現は、蛍光顕微鏡を使用しての ASC スペック形成のリアルタイムモニタリングを可能にします。新型コロナウイルス感染における NLRP1 の役割調査を支援するため、二つの細胞株は新型コロナウイルス受容体であるヒト ACE2 および TMPRSS2 をコードする遺伝子を安定的に過剰発現します。

NLRP1 reporter cells

- A549-ASC-NLRP1 Cells **NEW**
- A549-ASCoV2-NLRP1 Cells **NEW**
- A549-ASC Cells (control) **NEW**
- A549-ASCoV2 Cells (control) **NEW**

- ❖ ヒト NLRP1 の安定な発現(コントロール細胞を除く)
- ❖ ASC::GFP の NF- κ B 依存性発現
- ❖ 新型コロナウイルスに寛容性のある ASCoV2 細胞

A549-ASC-NLRP1 細胞では、NF- κ B アクチベーター(例、ヒト TNF- α)を用いた ASC::GFP の発現および Val-boroPro (VbP、下記をご覧ください)を用いた NLRP1 活性化は、蛍光 ASC スペック(緑のドットで目視可能)の形成(Fig. 1A)、および最終的にはパイロトーシス細胞死を誘発します(Fig. 1E)。

A549-ASCoV2-NLRP1 細胞はまた、新型コロナウイルス受容体を発現しており、ウイルス感染の際と同様の反応を示します(Fig. 1B および F)。

A549-ASC および A549-ASCoV2 コントロール細胞は、内在性の NLRP1 発現を欠き、ASC::GFP スペックの形成(Fig. 1C および D)、またパイロトーシスを妨げます(Fig. 1E および F)。

NLRP1 inflammasome inducer

- Val-boroPro **NEW**

- ❖ NLRP1 の強力なアクチベーター
- ❖ 高純度でバクテリアのコンタミネーションフリー
- ❖ 機能試験済

InvivoGen 社は、NLRP1 インフラマソームを活性化できる非選択的ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)阻害剤の Val-boroPro (VbP) を提供しています¹。VbP は ASC スペック形成(Fig. 1A) および溶解性細胞死(Fig. 1E)で視覚化されるような、NLRP1 インフラマソーム組み立てを引き起こします。

Bauernfried らは最近、セムリキ森林ウイルスによる感染に関連して生成される、長鎖 dsRNA を、NLRP1 が認識することを示しました²。これは、高分子量 Poly(I:C) のトランスフェクションで模倣できます。データは同社ウェブサイトからご覧頂けます。www.invivogen.com/a549-ascg-nlrp1

PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
A549-ASC-NLRP1 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-ascg-nlrp1
A549-ASCoV2-NLRP1 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-ascov2-nlrp1
A549-ASC Cells (control)	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-ascg
A549-ASCoV2 Cells (control)	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-ascov2
Val-boroPro	10 mg	tlrl-vbp-10

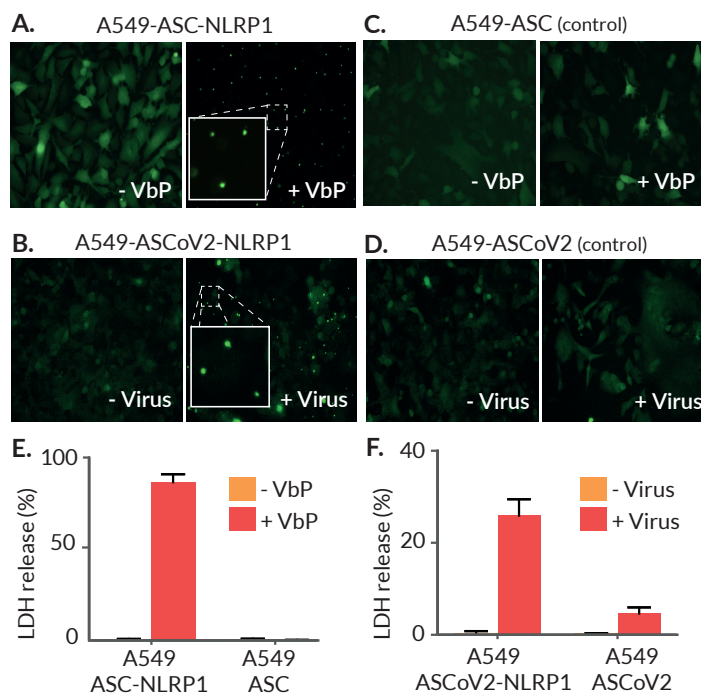
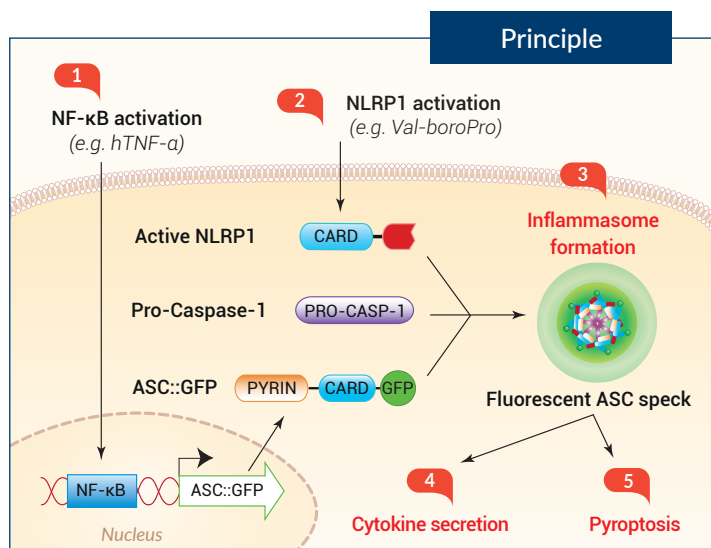


Figure 1. Monitoring of ASC::GFP speck formation and pyroptosis upon NLRP1 activation. All cell lines were incubated with the NF κ B inducer hTNF- α \pm Val-boroPro (VbP) (A,C,E) or \pm SARS-CoV-2 viral particles (Virus) (B,D,F). ASC::GFP expression and speck formation was monitored using fluorescence microscopy (A-D). Subsequent pyroptosis was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) assay. Data is shown in percentage of cell death (E,F).

RELATED PRODUCTS

- Recombinant human TNF- α : recombinant cytokine (rcyc-htnfa)
- Poly(I:C) (HMW): Long synthetic analog of dsRNA (tlrl-pic)

TLR4 Dual™ reporter cell lines

InvivoGen 社は、TLR4 によって誘導される二つの主要な経路、MyD88 および TRIF 依存性経路のモニタリングを可能にする、初の THP1-Dual™ 由来レポーター細胞株を提供しています。これらの細胞は、機能的な TRIF 依存性反応を再現するため、および TLR4 による平滑型および粗面型 LPS (リポポリサッカライド) への感度を上昇させるための MD-2 (ミエロイド分化因子 2) および CD14 (分化抗原群 14) を過剰発現しています。このように、これらの細胞は、健康、研究および産業に大きな脅威となる LPS の検出に使用できます。

- THP1-Dual™
- THP1-Dual™ MD2-CD14-TLR4 **NEW**
- THP1-Dual™ MD2-CD14 KO-TLR4 (control) **NEW**

Key Features

- ❖ デュアルレポーターシステム：IRF-Lucia および NF-κB-SEAP
- ❖ TRIF 依存性経路の再現
- ❖ PMA 分化不要
- ❖ 平滑型 (s) および粗面型 (r) LPS に高い反応性

THP-1 単球細胞は、シグナル伝達カスケードに關与する TLR 関連遺伝子と同様に、様々な PRRs (例、TLR4) を発現しているため、自然免疫研究の生理学的な背景を提供します¹。InvivoGen 社の THP1-Dual™ 細胞は、TRIF 依存性 IRF、および MyD88 依存性 NF-κB 経路のそれぞれをモニターする、Lucia ルシフェラーゼおよび SEAP (分泌性胎盤アルカリホスファターゼ) の二つの誘導型レポーター遺伝子の特徴としています。

THP1-Dual™ MD2-CD14-TLR4 細胞において、rLPS および sLPS に対する IRF の反応は、MD-2、CD14 および TLR4 の安定な発現により再現されます (Fig. 1)。この特徴は時間のかかる細胞の PMA 分化の必要性を無くします。さらに、LPS 刺激の際の NF-κB 反応が顕著に増加します (Fig. 2)。

THP1-Dual™ MD2-CD14 KO-TLR4 コントロール細胞は、TLR4 の両アレルノックアウトにより改変されており、どの種類の LPS にも反応しません (Fig. 1 および 2)。

InvivoGen 社は便利な抗菌試薬および高感度なエンドトキシン検出キットを提供しています。詳細はウェブサイトをご覧ください。 www.invivogen.com/endotoxin-detection-kit

PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
THP1-Dual™ Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	thpd
THP1-Dual™ MD2-CD14-TLR4 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	thpd-mctrl4
THP1-Dual™ MD2-CD14 KO-TLR4 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	thpd-mckotr4

- ### RELATED PRODUCTS
- LPS-EK Ultrapure: Rough LPS from *E. coli* K12 (tlrl-pekllps)
 - LPS-EB Ultrapure: Smooth LPS from *E. coli* O111:B4 (tlrl-pelpls)
 - QUANTI-Blue™ Solution: SEAP detection reagent, liquid (rep-qbs)
 - QUANTI-Luc™: Luciferase detection reagent, powder (rep-qlc1)

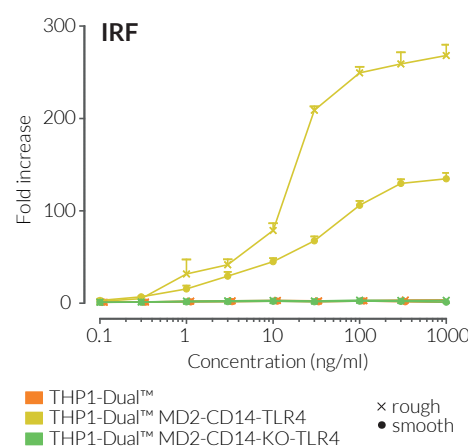
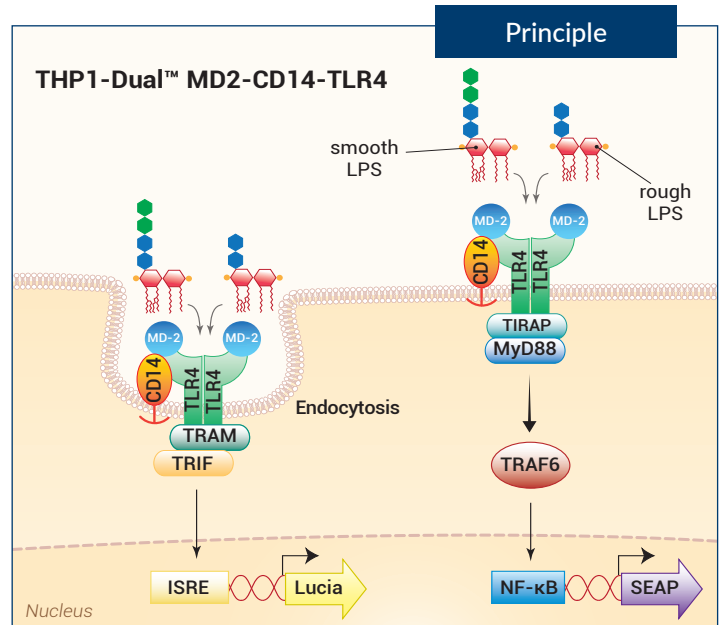


Figure 1. IRF responses to rough and smooth LPS in THP1-Dual™-derived cells. Cells were incubated for 24 hours with increasing concentration of rough (LPS-EK ultrapure (UP)) and smooth (LPS-EB UP) LPS. The IRF response was assessed by measuring the activity of Lucia luciferase in the supernatant using QUANTI-Luc™. Data are shown in fold response over non-induced cells (mean ± SEM).

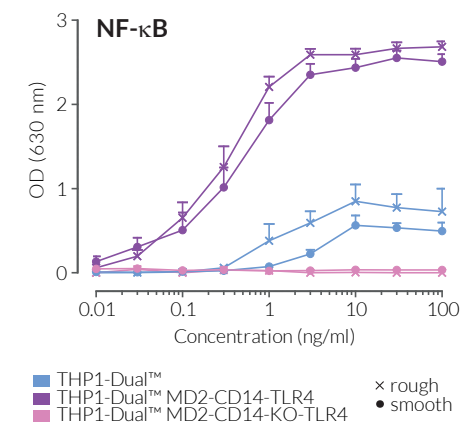


Figure 2. NF-κB responses to rough and smooth LPS in THP1-Dual™-derived cells. Cells were incubated for 24 hours with increasing concentration of rough (LPS-EK UP) and smooth (LPS-EB UP) LPS. The activation of NF-κB was assessed by measuring the activity of SEAP in the supernatant using QUANTI-Blue™ Solution. Data are shown as optical density (OD) at 630 nm (mean ± SEM).

1. Hornung V. et al., 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.*; 168(9):4531-7.

QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia

InvivoGen 社は、二つのセレンテラジン利用分泌ルシフェラーゼである Lucia および Gaussia の生物発光検出用にデザインされた QUANTI-Luc™ の、液状製剤の ready-to-use 試薬を提供しています。QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia は生細胞上清中のフラッシュまたはグロー発光検出に適合しています。この新しい製剤は、QUANTI-Luc™ (粉末) および QUANTI-Luc™ Gold (粉末) の後継品となります。

A Secreted Luciferase Detection Reagent **NEW**

QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia は、多く引用されている InvivoGen 社の QUANTI-Luc™ (Gold) 検出試薬の液状製剤です。生細胞上清中の分泌型 Lucia または Gaussia ルシフェラーゼ、および細胞溶解後の細胞内 Renilla ルシフェラーゼの高感度な検出用にデザインされました。より便利に使用できるように、本製品は即時の希釈が可能で、またフラッシュまたはグロー検出の選択が可能となっています。

QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia は、二つの液体コンポーネントから構成されています。

- QUANTI-Luc™ 4 Reagent 20X (セレンテラジン基質)
- QUANTI-Luc™ 4 Stabilizer 25X (最適化されたグローアッセイ試薬)

フラッシュおよびグロールシフェラーゼ検出の両方で、明るいシグナルを発生します。

- ルシフェラーゼ活性のフラッシュ検出は細胞培養上清(またはライセート)と QUANTI-Luc™ 4 試薬を混ぜるだけです。
- ルシフェラーゼ活性のグロー検出は、シグナル安定性を増強させるために、QUANTI-Luc™ 4 Stabilizer を混合物に加えるだけです。

Key Features

- ❖ 便利、安定、および優れたコストパフォーマンス
- ❖ Lucia および Gaussia 分泌型ルシフェラーゼに最適化
- ❖ 細胞ライセート中の Renilla ルシフェラーゼと互換
- ❖ フラッシュおよびグロー検出に最適
- ❖ デュアルレポーター検出に適合(例・ Lucia および SEAP)



PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
	500 tests	rep-qlc4lg1
QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia	2 x 500 tests	rep-qlc4lg2
	5 x 500 tests	rep-qlc4lg5

RELATED PRODUCTS

- QUANTI-Luc™: Flash detection reagent, powder (rep-qlc1)
- QUANTI-Luc™ Gold: Flash and Glow detection reagent, powder (rep-qlcg1)
- Lucia reporter cell line collection: invivogen.com/cell-lines

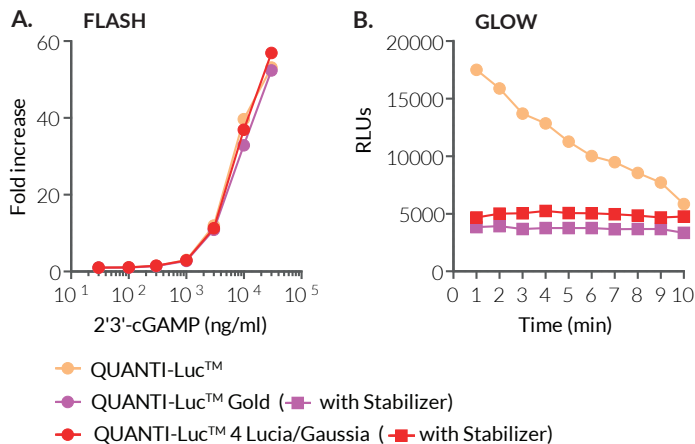


Figure 1. Lucia detection using QUANTI-Luc™, QUANTI-Luc™ Gold, and QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia. THP1-Dual™ cells, which feature an IRF-inducible Lucia reporter gene, were cultured with increasing concentration of 2'3'-cGAMP, a STING agonist. After overnight incubation, QUANTI-Luc™, QUANTI-Luc™ Gold, or QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia were added to the supernatants. (A) For Flash detection, Lucia activity was assessed immediately. Data is shown as fold increase. (B) For Glow detection, the Stabilizer was added to QUANTI-Luc™ Gold and QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia prior to Lucia activity measurement every minute for 10 minutes. Data is shown as relative light units (RLUs).

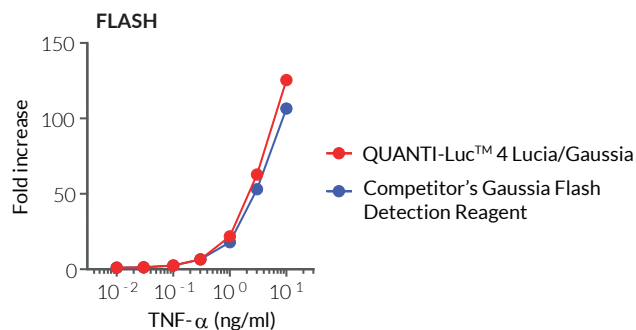


Figure 2. Flash detection of Gaussia luciferase. HEK293 cells stably transfected with an NF-κB-inducible Gaussia reporter gene were cultured with increasing concentration of human TNF-α. After overnight incubation, the Gaussia activity in the supernatant was assessed immediately after addition of InvivoGen's QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia or a Gaussia detection reagent from a competitor. Data is shown as relative light units (RLUs).

... STAY TUNED !

2023 年春、QUANTI-Luc™ 4 Renilla 発売開始予定!
この溶解バッファーで構成される液状製剤は、細胞内セレンテラジンベースの Renilla ルシフェラーゼ検出を可能にします。

QUANTI-Luc™ (粉末) および QUANTI-Luc™ Gold (粉末) は、
2023 年 6 月に販売中止となります。

Mycoplasma Detection With MycoStrip™

科学コミュニティ向けのマイコプラズマコンタミネーションの解決法開発における 40 年以上の経験から、InvivoGen 社は現在、細胞培養中のマイコプラズマ検出に特別な研究設備が不要の、簡単なストリップベースの試験 MycoStrip™ を提供しています。注目すべき点は、1 時間未満で結果が得られる点で、MycoStrip™ は迅速にコンタミネーションと戦うことができます。

Mycoplasma Detection Kit

- MycoStrip™ 10/20/50 tests
- MycoStrip™ 50 tests (without cassettes) **NEW**
- MycoStrip™ 100 tests (without cassettes)

Key Features

- ❖ 迅速：1 時間以内で実施、実作業時間 15 分未満
- ❖ 明確：結果の解釈が簡単
 - ・バンド 1 本-マイコプラズマ陰性
 - ・バンド 2 本-マイコプラズマ陽性
- ❖ 早い結果：2~5 分以内
- ❖ 特異的：全コンタミネーションの 95% を占める、6 つの種を検出。他のバクテリア、菌類および哺乳類 DNA との交差性なし
- ❖ 高感度： $10\text{-}10^2$ CFU/ml 程度の低さも検出可能
- ❖ カセット有りタイプ：使用に便利
- ❖ カセット無しタイプ：経済的で環境に優しい

Watch our video on MycoStrip™



PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
MycoStrip™	10 tests	rep-mys-10
	20 tests	rep-mys-20
	50 tests	rep-mys-50
MycoStrip™ 50	50 tests (without cassettes)	rep-mysnc-50
MycoStrip™ 100	100 tests (without cassettes)	rep-mysnc-100

RELATED PRODUCTS

- Plasmocin®: Mycoplasma elimination reagent (ant-mpp)
- Plasmocure™: Alternate reagent for mycoplasma elimination (ant-pc)
- Normocin™: Anti-microbial reagent for preventing contamination of cell cultures by mycoplasmas, bacteria or fungi (ant-nr1)
- Plasmotest™: Cell-based assay for mycoplasma detection (rep-pt1)



Figure 1. Mycoplasma detection using MycoStrip™ with or without cassette. SP: Sample Pad, CP: Conjugation Pad, C: Positive Control Band, T: Test Band.

FREQUENTLY ASKED QUESTIONS

Q：ポジティブコントロールバンドが見られない場合はどうしますか？

A：ポジティブコントロールバンドが無い場合、反応は失敗したことを意味しています。MycoStrip™ は等温 PCR に基づいており、最適温度は 65℃ です。同社ではサーモサイクラーの使用、または温度計でヒートブロックの温度確認を強くお勧めします。

Q：試験結果でマイコプラズマ陽性の場合はどうしますか？

A：InvivoGen 社が解決法を提供いたします！培養系は同社の包括的な抗マイコプラズマ試薬で簡単に処理可能です。培養系を Plasmocin® または Plasmocure™ で処理し、その完了後 (~ 2 週間)、MycoStrip™ を使用して再試験して下さい。

Q：マイコプラズマコンタミネーションの試験は、いつするべきですか？

A：同社では、他のソース/研究室から細胞を受け取った際、細胞増殖および/または形態の変化に気づいた際、あるいは日ごろから (例、2 ~ 3 週毎) 試験することを強く推奨しています。

Q：どのようにマイコプラズマのコンタミネーションを防ぎますか？

A：InvivoGen 社では、マイコプラズマのコンタミネーションを防止するための抗菌試薬を複数提供しています：ご利用の細胞の種類によって、Normocin™、Plasmocin® prophylactic および Primocin® からお選びください。

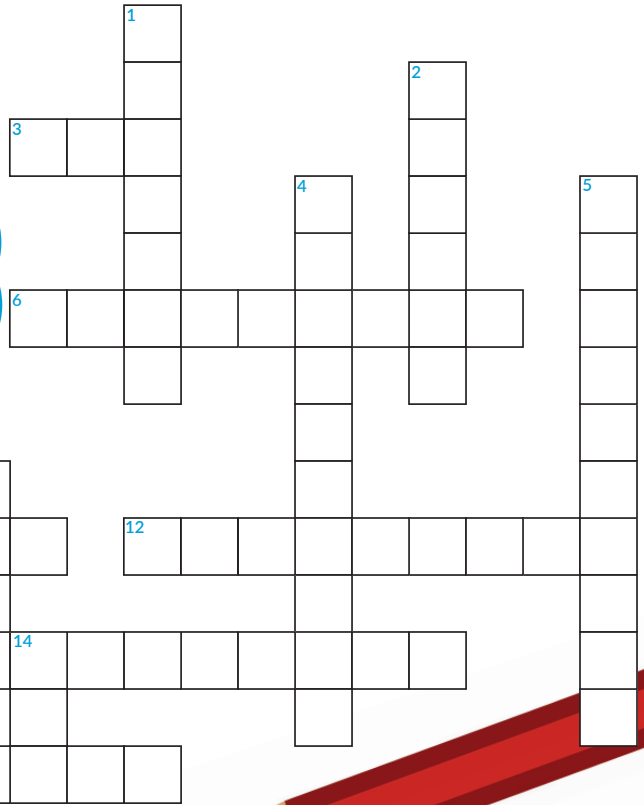


InvivoGames: Brain stimulation assay

Crossword puzzle

Across

- 3. It can be rough or smooth
- 6. A pore-forming protein
- 7. Specific domain in NLRP1
- 11. Meant to bind
- 12. Immune cell messengers
- 13. Defense mechanism
- 15. InvivoGen's luciferase

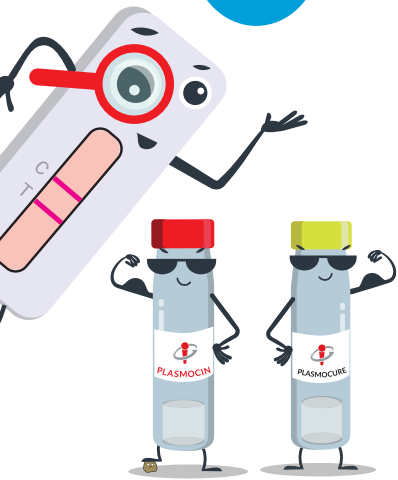


Down

- 1. Protein scissor
- 2. Antibiotic by InvivoGen
- 4. Cell death through fire
- 5. Degradation complex of the cell
- 8. Inflammasome with a pyrin domain
- 9. Useful to track cells in the dark
- 10. The T in TLR stands for?
- 14. Inflammasome player

DON'T LOSE YOUR HEAD
OVER MYCOPLASMA!
USE PLASMOCURE™
& PLASMOCIN®

Find 10 differences



www.invivogen.com/mycoplasma-elimination

8. NLRP 9. GFP 10. Toll 11. Receptor 12. Cytochromes 13. Inflammasome 14. ASC 15. Lucia
Solution: 1. Caspase 2. Zoonin 3. LPS 4. Pyroptosis 5. Proteasome 6. Gasdermin 7. FIIND

Solution (top to bottom, left to right): nunchucks, grenade, scull, finger, mycoplasma missing behind bottle, tube missing, mycoplasma inside bottle (2x), mycoplasma missing

InvivoGen

Europe Tel: +33 562 71 69 39
USA Tel: +1 888 457 5873
Asia Tel: +852 3622 3480

Fax: +33 562 71 69 30
Fax: +1 858 457 5843
Fax: +852 3622 3483

info.eu@invivogen.com
info@invivogen.com
info.hk@invivogen.com