

## SLAS2018 プロメガポスター概要

### 1266-B assessing autophagic flux in cultured cells

2016年にノーベル賞医学・生理学賞の受賞となったオートファジーを評価するシステムです。

オートファジーは細胞内のタンパク質等の分解に深く関与しており、オートファジーの破綻が疾患に結びつく事が分かってきています。

このシステムには相補的な NanoLuc ルシフェラーゼの結合システム NanoBiT ( NanoLuc Binary Technology ) の原理を応用した、多機能発光タンパクタグ HiBiT の技術が活用されています。

オートファジーのマーカーである LC-3 タンパクと HiBiT を融合タンパクとして細胞内に発現させます。

オートファジーが進むと LC-3 タンパクが分解されるため、システムに付属する試薬を用いて、HiBiT-LC-3 の発光量の変化よりオートファジーの活性を評価します。

これまでのオートファジー評価法では、下記のデメリットがありました。

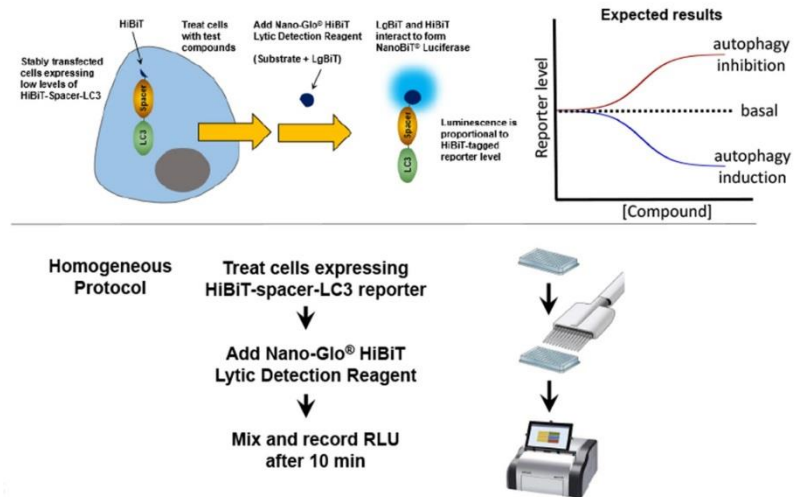
- ・ 蛍光測定となり、定量化が難しい
- ・ 測定するには機器を選ぶ

一方で、発光 Autophagic Assay には下記のメリットがあります。

- ・ 発光測定となるためウェル全体の測定が可能
- ・ 定量が容易
- ・ 特殊な機器は必要なく、プレートリーダーでの測定が可能。

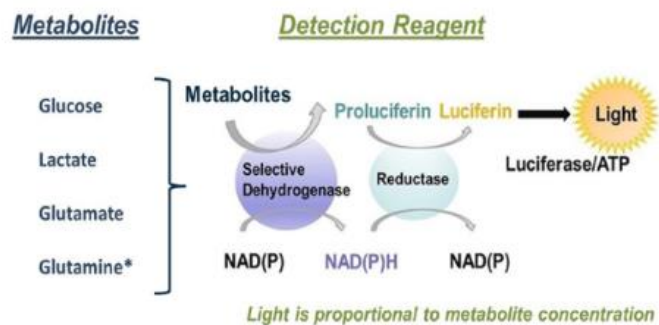
ポスターでは 384well plate でのアッセイ事例を示しており、High Throughput Screening(HTS)でオートファジー活性を制御する因子の探索にも活用可能であることを示しています。また、3次元培養系での検討も行っております。より生体内に近い環境とされる 3次元培養系での評価にも活用可能です。

加えてトランスフェクションでの遺伝子導入が難しい細胞にも対応できるように、バキュウロウイルス粒子 BacMam での遺伝子導入法も開発しています。



### 1323-D Implementation of acoustic dispensing for kinetic monitoring of glycolysis

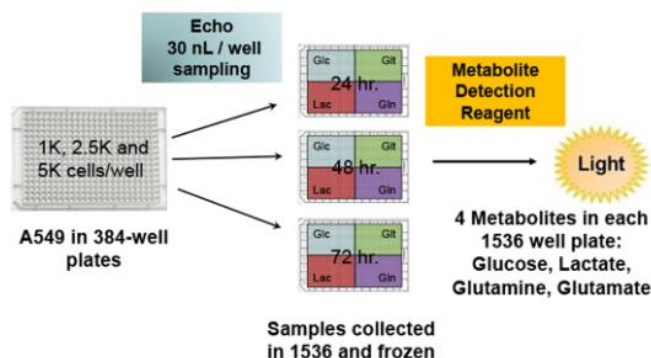
グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸は細胞における主要な栄養因子であるとともに、これらの因子の細胞内外のバランスの変化は細胞の性質に大きな影響を及ぼします。プロメガでは発光測定技術を元に、これらの細胞内外の因子を測定する技術(LGGG アッセイ; Lactate 測定アッセイ、Glucose 検出アッセイ、Glutamine 検出アッセイ、Glutamate 検出アッセイ)を確立しています。



## SLAS2018 プロメガポスター概要

今回はこのプロメガの技術と、音響技術を使った微量の液体サンプル自動分注装置 Echo® Liquid Handler システムを活用し、1536wellでの細胞外のアッセイモデル、72 時間までの LGGG の量の変化、ミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤 Metformin を添加した際の検討例を示しています。

糖代謝およびグルタミン代謝の主要因子を 1536well フォーマットで高感度かつに経時に測定できることを示しています。



### 1236-B Deciphering key cancer and inflammation signaling pathway

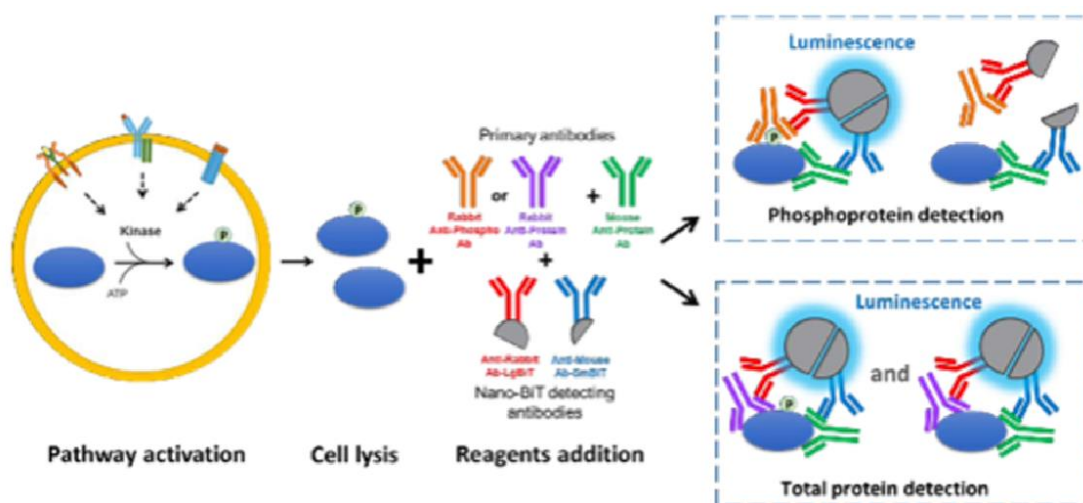
がんおよび炎症のキーとなる pathway について ImmunoBiT アッセイを使用したセルベースでのキナーゼアッセイの実施例をご紹介します。下記 pathway のキーとなるタンパクについて定量および阻害を見ています。

- ・ NF-κB pathway: IκBα のトータルおよびリン酸化のモニタリング
- ・ JAK/STAT pathway: STAT3 のトータルおよびリン酸化のモニタリング
- ・ BTK pathway: BTK のリン酸化の検出

結論：ImmunoBiT のメリットとして以下が挙げられます。

- ・ NanoLuc の発光を利用：化合物の阻害が少ない
- ・ ホモジニアスアッセイで簡便、また細胞を改変 (トランスフェクション等) する必要がない
- ・ WB, ELISA, 蛍光アッセイに比べ少ない手順で検出可能
- ・ HTS に最適
- ・ 抗体を変えればご自身の目的タンパクにも適用可能

※現在、ImmunoBiT アッセイのαテスターを募集しております。ご希望ありましたらご連絡ください。



## SLAS2018 プロメガポスター概要

### 1348-D Monitoring Functional Mechanism of Protein Degradation

2016年にオートファジーがノーベル賞医学・生理学賞を受賞し、細胞内タンパク質分解の破綻による疾患が注目を集めています。しかしこれまでは細胞内タンパク質をリアルタイムに、また高ハイスループットでモニターすることが難しく、解決すべき課題の一つとなっていました。

プロメガはこの課題の解決法として、独自の NanoLuc テクノロジーを用いて目的タンパク質と Proteasome の相互作用をリアルタイム検出する手法を開発しました。目的タンパク質に NanoLuc を融合させ、

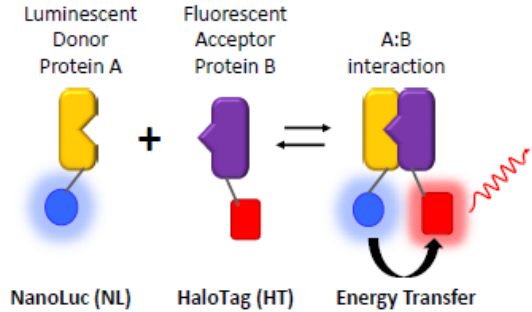
Proteasome サブユニットに HaloTag を融合させることで、目的タンパク質と Proteasome の相互作用を NanoBRET テクノロジーで検出できるようにしています。同時に NanoLuc シグナルにより目的タンパク質量の定量も行うことができます。この技術の発展系として、

NanoLuc の代わりに HiBiT タグを使用

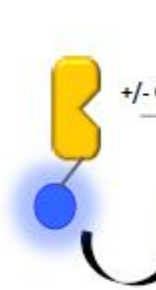
し、ゲノム編集で HiBiT 付加したタンパク質の分解モニタリングデータも掲載しています。ポスター1349-E と合わせてご参照ください。

### NanoBRET™ Protein:Protein Interactions

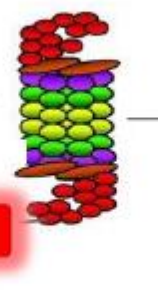
#### Bioluminescence Resonance Energy Transfer



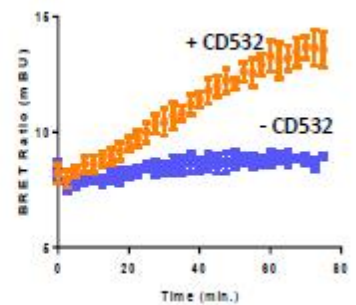
#### NL-cMyc



#### HT-PSMD



#### cMyc:PSMD



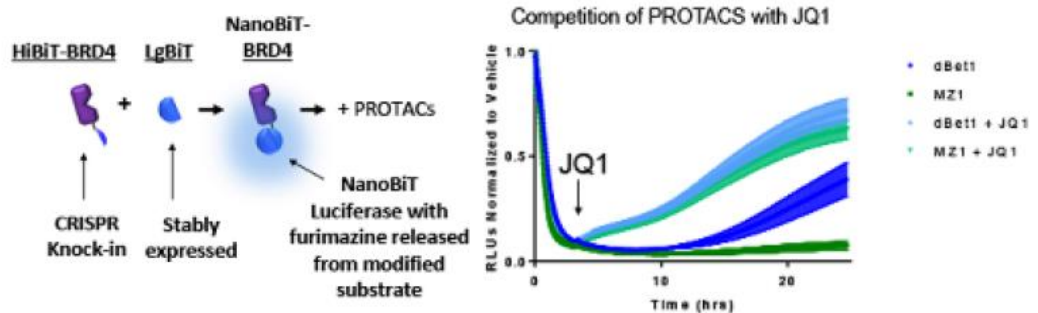
### 1349-E Monitoring Protein Dynamics at Endogenous Levels

タンパク質の分解、細胞膜上から細胞内への取込み、リン酸化などのダイナミックな変化は細胞の生理活性や疾患の要因として重要な意味を持つにも関わらず、生きた細胞での解析が遅れていた分野です。特に内在性レベルでの解析には非常に高感度の検出法が必要とされるため、特に難しい課題となっていました。

プロメガが開発した高発光タグ HiBiT は、これらの解析を大きく進める可能性を秘めています。このポスターではわずか 11 アミノ酸でありながら高発光のペプチドタグ HiBiT を使用し、内在性レベルでのタンパク質ダイナミクスをモニタリングしています。

HiBiT をゲノム編集で目的タンパク質に融合させ、HiBiT と結合して発光活性を示す LgBiT タンパク質を細胞に

安定発現させる系を構築し、HiBiT 融合タンパク質のリアルタイムモニタリングを行っています。

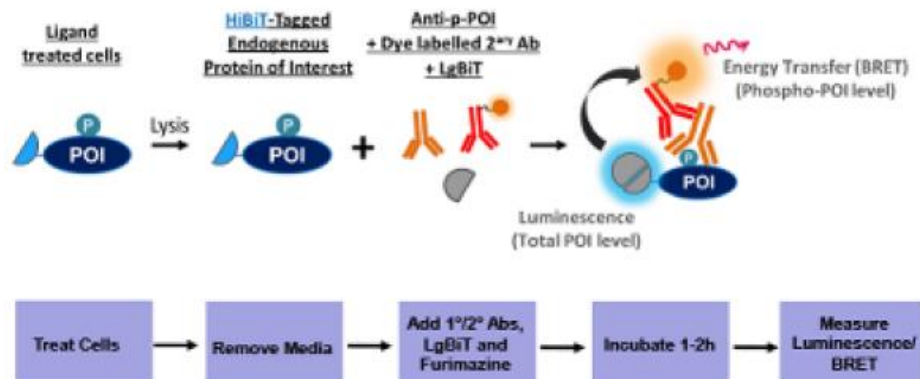


## SLAS2018 プロメガポスター概要

またこの系と HaloTag 融合タンパク質を組合せて NanoBRET を行えば内在性レベルでのタンパク質相互作用解析も可能になり、

HaloTag 融合タンパク質の代わりに蛍光標識した抗リン酸化抗体を使えば

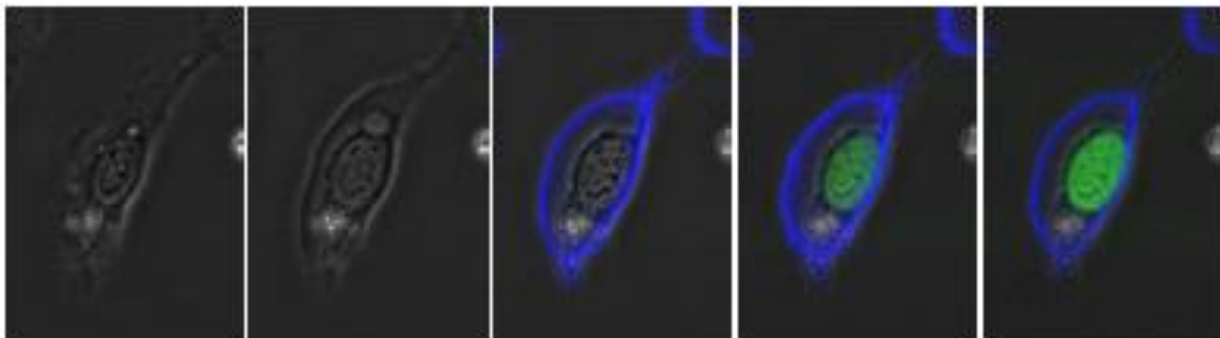
NanoBRET により内在性レベルでのタンパク質リン酸化を検出するアッセイ系も構築可能です。 内在性レベルでタンパク質を解析したい方、必見です。



### 1362-C Real-Time High Throughput Detection of Annexin V Binding

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assay はリアルタイムにアポトーシスを検出するキットです。NanoBiTの原理を利用しています。RT-Glo と同様、最初 1 回添加のみで 48 時間までのリアルタイムに発光測定できます。エンドポイントアッセイも可能です。また、CellToxGreen 様の膜非透過型核酸結合蛍光色素とともにネクローシス検出のマルチアッセイもできます。ポスターではアポトーシス、ネクローシスのリアルタイムマルチアッセイ、48 時間のリアルタイムデータ、Caspase-Glo との相関、発光イメージングのデータを掲載しております。

※イメージングデータは国内でオリンパスと共同でデータ取得しております。このような発光イメージングにご興味のある方はご連絡ください。



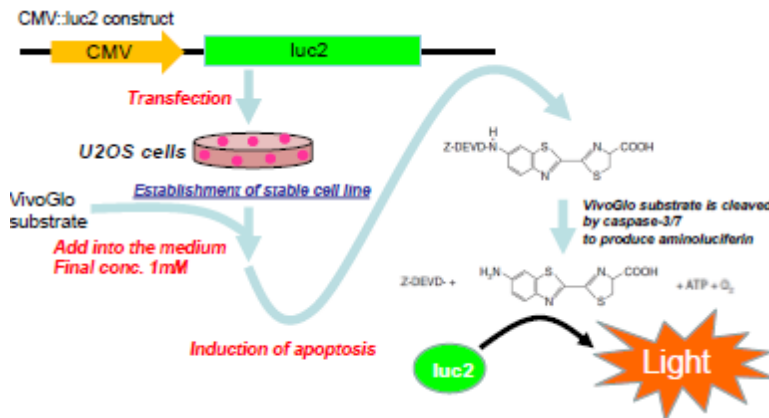
## SLAS2018 プロメガポスター概要

### 1363-D Real-Time image analysis (Olympus)

アポトーシスの過程における各ステップを、発光および蛍光イメージングによりモニタリングしたデータを紹介しております。Luciferase 安定発現細胞に対して VivoGlo caspase 3/7 基質、および AnnexinV necrosis assay にて測定することにより、アポ

トーシスの過程として 1. Caspase 活性、2. AnnexinV 陽性、3. ネクローシスの 3 つのイベントについて、リアルタイムにイメージングすることに成功しました。

※国内でオリンパスと共同で取得したデータです。このような発光イメージングにご興味のある方はご連絡ください。



### 1212-C Biluminescent HT Succinate Detection Method

Succinate-Glo は、代謝産物として Succinate (コハク酸) を生じる脱メチル化酵素の活性を簡便に検出できるアッセイシステムです。

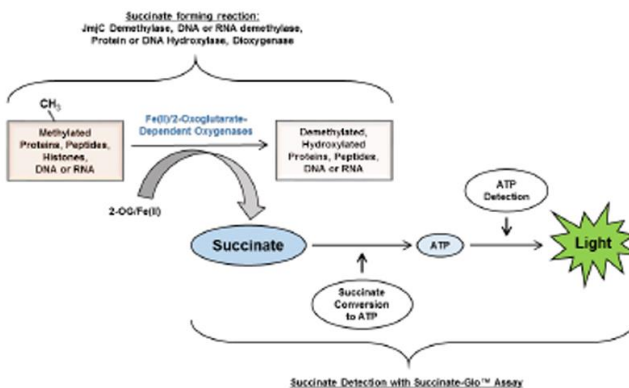
このアッセイでは、脱メチル化酵素活性測定に加え、タンパク質・DNA・RNA の水酸化酵素 / 酸化還元酵素の活性測定にも使用することができます。

またこのポスターでは、酵素活性の測定だけでなく酵素反応速度論の解析や、阻害剤の阻害様式の検討 (Fe(II) または 2-oxoglutarate 競合的か) に使用したデータを紹介しています。また、少ない反応液量にも対応しており、化合物によるアッセイ系への

干渉が少ないため、high-throughput screening (HTS) にも適したアッセイシステムです。ポスターでは、JMJD2C メチル化酵素の阻害剤スクリーニングを実施したデータも紹介しています。

(キーポイント)

- ヒストン、DNA、RNA、その他タンパク質の脱メチル化酵素アッセイ (産物として Succinate を生じるもの)
- 高感度: Succinate として 200nM ~ 15μM、ng オーダーの酵素量でアッセイ可能
- HTS 対応: 384-well plate にも対応
- 化合物による偽陽性・偽陰性が少なく、化合物スクリーニングに最適



## SLAS2018 プロメガポスター概要

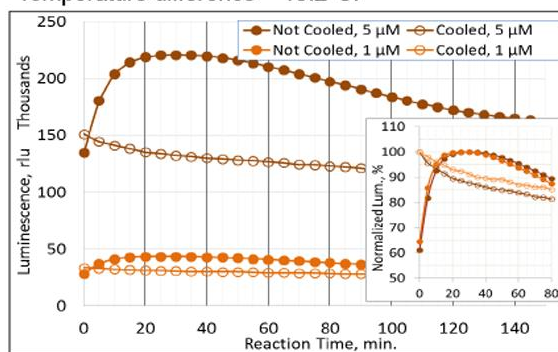
### 1257-C Improving your data with Internally Cooled Multifunctional Reader

化学反応の速度は温度に大きく依存するため、温度の変動は実験結果に影響を及ぼす要因となります。プレートリーダーの測定チャンバー内の温度は必ずしも室温に等しいとは限らず、機器からの放熱によって室温よりも2~10°Cも高くなることもあるため、測定データの精度に影響を及ぼす可能性があります。

このポスターでは、TECAN社の冷却モジュール Te-Cool™を用いて、ホタルルシフェラーゼ発光反応ベースのGloアッセイに及ぼす温度変化の影響について検討しています。ポスターでは測定時の温度変化が、酵素反応のキネティクスに影響すること、化合物スクリーニングの誤判定をもたらす可能性、などを示しています。こうした温度変化の影響に対して、冷却モジュールを使用する方法や、あらかじめ測定プレートを測定チャンバー内で平衡化する方法が効果的であるデータを紹介しています。高い精度をもつ最適なデータを確保するためには、測定時の温度管理を適切に実施することが重要です。

Succinate-Glo™ assay at 5µM or 1µM of Succinate in Actively Cooled vs. Non-Cooled Readers.

Room Temperature = 22.6°C;  
Non-Cooled reader internal Temperature = 32.8°C;  
Temperature difference = 10.2°C.



### 1358-D Quantitative Cell-Based Bioassays to Advanced Immunotherapy

がん治療を始め、様々な疾患治療に抗体医薬品が応用されつつあります。抗体医薬品の評価には細胞を使用するバイオアッセイが欠かせませんが、細胞を使うアッセイだけにハイスループット化が難しいという懸念があります。

プロメガが提供する数々のバイオアッセイは 96-well plate フォーマットだけでなく 384-well plate フォーマットにも対応しており、今後ますますニーズが高まる抗体医薬品評価の高速化の強力なツールです。このポスターでは開発競争が激しい PD-1/PD-L1 パスウェイを始めとする Co-Inhibitory パスウェイのブロック抗体バイオアッセイ、CD40 や OX40 パスウェイを始めとする Co-Stimulatory パスウェイのブロック抗体、アゴニスト抗体バイオアッセイを紹介します。

