

細胞内タンパク質相互作用の高感度バイオセンサー FRET と BRET の活用 高感度検出装置 GloMax® Discover System



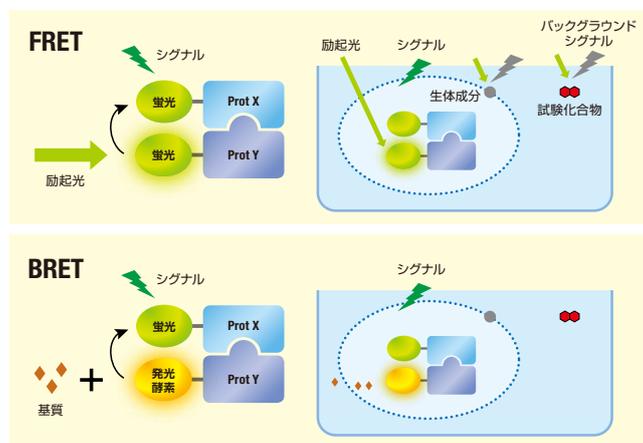
京都大学大学院
生命科学研究所
生体制御学医学研究科
病態生物医学 教授
松田 道行 先生

イントロダクション:

タンパク質相互作用解析は、個々のタンパク質機能だけでなく細胞内タンパク質ネットワーク、さらには細胞内プロセスを解明する上で重要な研究手法です。共免疫沈降 (Co-IP: Co-immunoprecipitation) 法、プルダウンアッセイ法、ファーウェスタンブロットリング法、表面プラズモン共鳴法など従来より様々なタンパク質相互作用解析法が開発されてきました。しかし、これらの方法の多くは細胞を破壊してタンパク質を取り出すため、生体内での真の相互作用を反映したものとは言えません。そのため、生きた真核細胞内でタンパク質相互作用をリアルタイムに観察できる手法の開発が強く求められてきました。このような要望に対するブレイクスルーとして期待される手法が FRET および BRET です。

今回ご登場いただく松田道行先生は、蛍光による生体イメージング技術の第一人者であり、蛍光技術を利用した研究ツールの開発に尽力されています。また、松田先生はこれまで開発されてきた FRET を応用した化合物スクリーニングについても検討されてきました。しかし、FRET 特有のいくつかの問題から新たに発光技術を基にした BRET を導入されました。本稿では蛍光を知り尽くした松田先生に FRET と BRET のメリット / デメリットならびに BRET を導入する際の重要な点についてお聞きしました。

タンパク質相互作用の研究ツール FRET および BRET とは……



FRET を用いた化合物スクリーニングでの問題

これまで開発してきた FRET を応用した化合物スクリーニング (上図) を検討しましたが、いくつかの問題が生じました。1つは、FRET では励起光を生細胞に照射するため、**細胞自身からの自家蛍光**も検出してしまふという問題です。また、細胞だけでなく、**スクリーニングにかける化合物自身が持つ自家蛍光**も多く、100 サンプルに1つ程度の高い頻度で強い自家蛍光が観察されました。これは、顕微鏡ベースの測定でも同様であり、検出装置側で対応することは困難でした。そこで、FRET と類似の技術で、励起不要の BRET を用いたアッセイ系の開発を検討しました。

BRET を用いた化合物スクリーニングでの問題

BRET を用いた化合物スクリーニングを検討しました。BRET は FRET とは異なり、強力な励起光を照射する必要が無いために、バックグラウンドを極めて低く抑えることができますが、いくつかの弱点をクリアする必要があります。BRET は励起光としての役割を生物発光に代えているため、発光量が弱く十分な蛍光量が得られない場合があるという点です。近年では生物発光技術の進化により、その発光強度は飛躍的上昇していますが、一般的なランプを用いた励起光に比べると生物発光による励起の強度は低くならざるを得ません。この問題は、検出装置側のスペック (高感度な発光検出および励起光としての生物発光を遮断するフィルター) により解決することができます。

問題の解決

BRET に対応するスペックのプレートリーダーを各社比較検討したところ、プロメガ社の GloMax® Discover System は他の BRET/FRET を検出できる大がかりなプレートリーダーとは異なり、コンパクトでありながらフィルターを装備した超高感度かつ広いダイナミックレンジを有するため実験に最適な機器であることを確認することができ、採用にいたしました。GloMax® Discover System を用いて、BRET によるアッセイ系を無事に構築することができ、Preliminary な実験では化合物による影響も認められませんでした。これから GloMax® Discover System を用いた BRET アッセイにより本格的に化合物をスクリーニングする予定です。

まとめ

- タンパク質相互作用の測定は、細胞内で何が起きているのか知るために重要な情報を得ることができる。
- FRET/BRET は、従来法とは異なり、生きた細胞内でのタンパク質相互作用を観察できる点で非常に優れた実験手法である。
- FRET は、サンプルである低分子化合物の自家蛍光のみならず、細胞に内在性の自家蛍光があり、プレートリーダーを用いたアッセイには適していない。
- BRET はスペックの合ったルミノメーター (フィルター、超高感度、広いダイナミックレンジ) が必要だが、FRET における自家蛍光の問題を排除することができ、生細胞でタンパク質相互作用をアッセイできる。

その他の BRET と FRET のそれぞれの優位点

- | | |
|------|--|
| BRET | <ul style="list-style-type: none"> • 励起光不要による高い S/N 比 • 強い励起光による光毒性がない • プレートリーダーに励起光のシステムが不要 |
| FRET | <ul style="list-style-type: none"> • 基質が不要な高時空間分解能イメージング • 蛍光タンパク質の種類が豊富 |

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
GloMax® Discover System / 本体 (発光・蛍光・吸光 [UV/可視光])	1台	GM3000	4,600,000
GloMax® Dual Injectors with Pumps (デュアルインジェクター)	1セット	GM3030	900,000

- マニュアル不要の直感操作 (大型タブレット PC 付属)
- プロメガの各種アッセイプロトコールをインストール済み
- 高感度と広いダイナミックレンジで確実な検出を
感度: 3×10^{-21} moles ルシフェラーゼ
レンジ: > 9 桁
- 細胞のアッセイに最適な機能を搭載
- NanoBRET™ / BRET やマルチアッセイなどに対応

