

極小の発光タグ HiBiT 実験特集



2017年秋号

かわら版

Promega

KAWARABAN

不可能を可能にする NanoLuc® テクノロジー



無限のアプリケーション

8人の日本の研究者が語る NanoLuc® セミナー開催!

9月13日および15日に東京および大阪にて NanoLuc® テクノロジーをご利用のユーザー 8名の方に最新の研究成果についてご講演いただきました。

ご講演の中から4名の研究者の方に最新アプリケーションについて本誌にご寄稿いただきました。(4-7ページ参照)



- 2～3頁、発光タグ HiBiT によるタンパク質発現解析新時代の幕開け
- 4頁、HiBiT システムを用いた筋芽細胞細胞融合のモニター系
- 5頁、Bi-molecular complementation assay を利用したアルツハイマー病など神経変性疾患病因研究
- 6頁、NanoLuc® を用いた BRET バイオセンサー BTeam による生細胞内 ATP 濃度計測
- 7頁、ルシフェラーゼ遺伝子を応用した分泌タンパク質の解析
- 8頁、HiBiT 実験 Q&A

プロメガ株式会社

発光タグ HiBiT による タンパク質発現解析新時代の幕開け

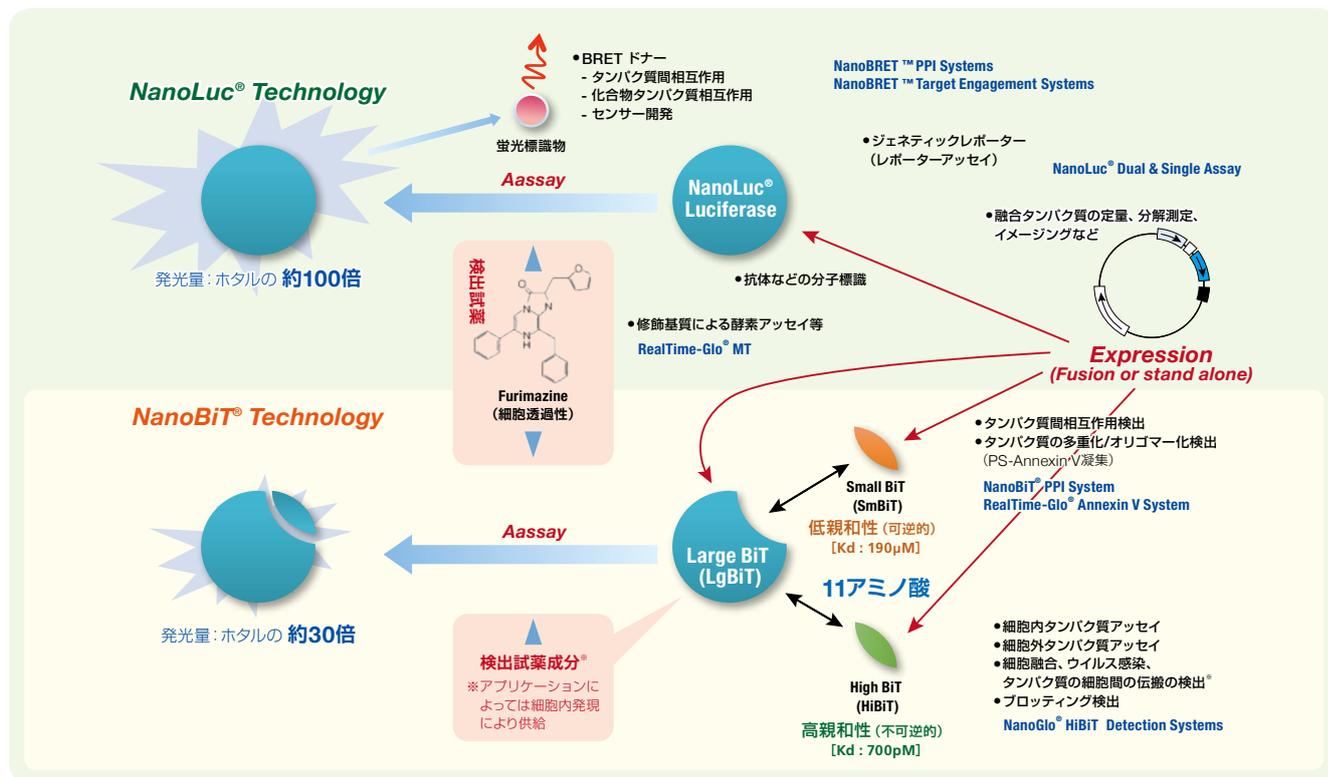
FLuc から NanoLuc[®] そして NanoBiT[®] へ

ホタルルシフェラーゼ (Fluc) は高感度で測定が容易であるため、プロモーターなど転写調節配列の解析やシグナル経路活性化の検出などに用いられ、レポーター遺伝子アクセシ (ジェネティックレポーター) の代名詞として広く利用されてきました。これら外部刺激から発現までの流れを捉えるジェネティックレポーターの用途に加えて、GFP などの蛍光タンパク質やエピトープタグなどのように個々のタンパク質と融合させてその発現を検出するプロテインレポーターとしてもルシフェラーゼを利用する試みもありましたが、分子量の大きさなどの問題があり、広く普及するまでには至りませんでした。

2012 年にプロメガで新たに開発された NanoLuc[®] は 19 KDa の低分子の発光酵素であり、従来のホタルルシフェラーゼの 1/3 の分子量であるにもかかわらず、発光レベルは 100 倍にも達します。この「小さくて明るい」というシンプルで根源的な特性は、これまで困難であった生体分子の解析につながる大きなポテンシャルを秘めています。さらに NanoLuc[®] を 11 アミノ酸 (SmBiT または HiBiT) と 18KDa の LgBiT に分断した NanoBiT[®] テクノロジーでは、小さなペプチドを付加するだけで目的タンパク質を特異的に検出できるようになります (LgBiT に対する親和性の異なる 2 種類のペプチド: 低親和性 [可逆的] の SmBiT および高親和性 [不可逆的] の HiBiT を開発)。

明るさの向上は単純に感度の増加に直結します。感度の向上はこれまで検出できなかったものが検出できる (低発現タンパク質やトランスフェクション効率の低い細胞での発現など) と同時に、これまで検出できていたタンパク質ならば、分子数を抑えても検出可能であることを意味します (100 倍の感度なら 1/100 の分子数でも検出可能)。タグを利用したタンパク質発現実験ではタグの付加による標的タンパク質への影響 (アーティファクト) を最小限に抑えるためにより小さいタグを求めて使用していますが、もう一つのアーティファクトの原因、CMV などを利用した過剰発現についてはそれほど考慮されていないのが実情です。低発現のタンパク質の場合、過剰に発現させて検出レンジに入れなければ実験になりませんが、本来はできるかぎり内在レベルでの発現が望まれるはずで、HiBiT はこの大きなアーティファクトの問題両方を解決するソリューションなのです。これまでタンパク質を過剰に発現させることでしか見えなかった現象を実際の生体内レベル (内在性レベル) でとらえることができ、本来の生体内の分子数レベルで行われる真の反応が観測できます。実際の例として、ゲノム編集により本来の遺伝子ローカスに発光タグ (HiBiT) を導入することで、過剰発現させた場合よりも薬剤による応答性が飛躍的に向上しました (次ページ図 1 参照)。これは細胞内のタンパク質と内在性レベルで発現するタグ付加タンパク質が適切な化学量論的比率で維持されるからであると推察されます。

「小さくて明るい」これら 2 つの HiBiT の特性は、本来のタンパク質機能にほとんど影響を与えない短いペプチドを簡便に付加し、内在レベルの分子数でも検出できる感度を獲得できるため、生体内でのありのままのタンパク質のすがたを観察できることにつながります。



過剰発現よさようなら! 内在性発現よこにちは!

HiBiT はわずか 11 アミノ酸のタグであることから、CRISPR/Cas9 と非常に相性が良いテクノロジーと言えます。HiBiT をノックインした後、HiBiT タグ付き内在性タンパク質として検出することで、より生体に近い事象としてタンパク質発現を観察することができます。

dBET1 は、BRD4 を選択的に分解誘導する PROTAC (Proteolytic Targeting Chimera) のひとつで、E3 コピキチンリガーゼと BRD4 に結合する二機能性化合物として知られています。CRISPR/Cas9 を利用して HiBiT- BRD4 を

内在性タンパク質として発現させ、dBET1 の有効性を比較しました。

図 1. A では、CMV, TK 各プロモーターを用いて一過性に発現、あるいは CRISPR/Cas9 を用いて内在性に発現した HiBiT-BRD4 に対する dBET1 の分解誘導を比較しています。強力な CMV プロモーターで駆動するベクターを多く用いた場合、最も高い HiBiT-BRD4 の発現が確認されましたが、dBET1 の分解誘導はわずかに観察されるだけでした。一方、弱い TK プロモーターを利用すると発光量は大きく減少するものの、分解誘導が明確に観察されます。内在性の HiBiT -BRD4 を発現させた場合

100,000-10,000 RLU のシグナルが得られています。仮に Fluc で同様のアッセイ系が構築できたとしても、2,000-200 RLU 程度の低い発光値しか得られないことが予想されます。すなわち、**HiBiT だからこそ初めて簡便に信頼性の高い内在性発現タンパク質の定量が可能になったのです**。一方、LgBiT 安定発現株を用いた図 1B, C では、dBET による HiBiT-BRD4 の分解誘導を一過性あるいは内在性の発現と比較しています。驚くべきことに、dBET1 の分解誘導の効果 (EC₅₀) は、一過性発現と比較し内在性発現では **10 倍以上高く** (EC₅₀ として 1/10 以下) 現れ、より**大きなアッセイウインドウ**が得られました。

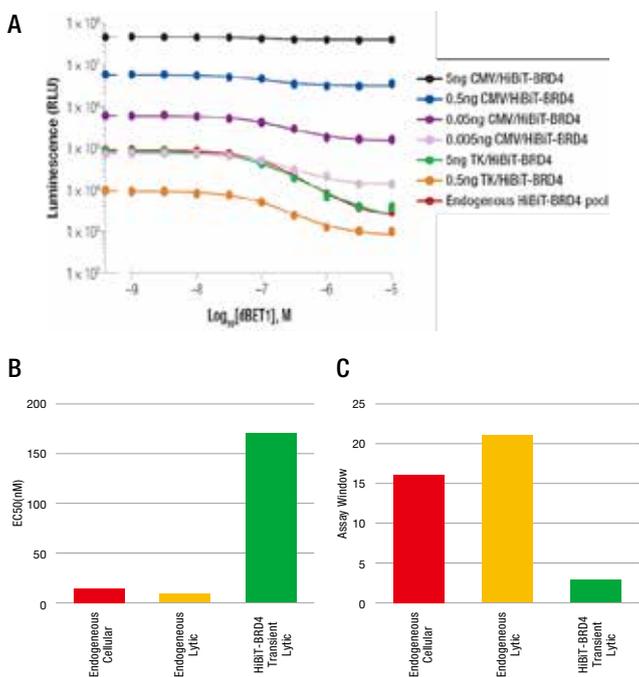


図 1 PROTAC dBET1 による HiBiT-BRD4 の分解誘導

A: CMV あるいは TK プロモーターを利用して HiBiT-BRD4 を細胞内に一過性あるいは内在性発現させ dBET1 の分解誘導を検出した。B, C: LgBiT 安定発現株に HiBiT-BRD4 を CRISPR/Cas9 を用いて内在性に発現させたもの (Live cell format) ■、CRISPR/Cas9 を用いて内在性に発現させた HiBiT-BRD4 (lytic format) ■、一過性に発現させた HiBiT-BRD4 (lytic format) ■ をそれぞれの検出試薬で測定した。

すなわち、これまで一過性発現系では狭いアッセイウインドウしか得られないため、化合物スクリーニングで望ましいリードが得られなかった標的でも、**内在性発現系ではアッセイウインドウが広がり、新たなリード化合物が得られる可能性を示唆**しています。

受容体のインターナリゼーションを簡便・明瞭に定量化

G タンパク共役型受容体 (GPCR) は主に三量体 G タンパク質を介したシグナル伝達系と、GPCR キナーゼとβアラジン結合を介したシグナル伝達系が知られています。後者伝達経路が前者に遅れて発見されたことに加えて、バイアス型あるいはインバース型アゴニストはこれらの伝達経路への作用が通常のアゴニストとは異なることなどから、GPCR 研究分野においては両伝達経路を正確に観察することが非常に重要になります。

細胞を溶解しない HiBiT Extracellular Assay により、細胞膜表面上の GPCR のみを検出することが容易になりました。

右上図はβ2 アドレナリン受容体 ADRB2 の細胞膜上の残存量、すなわちインターナリゼーションを観察しています。Isoproterenol (ISO) は EC₅₀ 51nM で細胞内取り込み率は 84% を示しました。これと比較して、Salmeterol (Salm) は、EC₅₀ 1nM で細胞内取り込み率は 37% でした。Salm の cAMP 産生能 (efficacy) は ISO と同等と報告されています¹⁾ が、受容体インターナリゼーションでは、ISO と異なった efficacy を示しました。すなわち、**HiBiT を利用した GPCR のインターナリゼーションアッセイは、potency のみならず、efficacy も定量できることを示しています**。受容体インターナリゼーションはβアラジン経路によるもので、弊社技術ではタンパク質間相互作用検出システム NanoBRET® (BRET) あるいは NanoBiT® (発光) を用いて検出可能です。これらの検出はβアラジンの結合を直接観察することができますが、GPCR およびβアラジンの両方に酵素やタグを融合させて発現させる必要があるなど若干複雑な系の構築が必要でした。しかし、HiBiT による受容体インターナリゼーション

は GPCR に HiBiT タグを付加するのみで、そのタグ付位置の許容範囲 (下記) もあり、βアラジン結合試験よりもはるかに容易になったといえます。上記 ADRB2 における Salm のインターナリゼーションアッセイの結果は、βアラジン結合試験の報告と一致しています¹⁾。HiBiT による受容体インターナリゼーションアッセイは、シグナリングにおけるアゴニズムの違いを検出する有用なツールになります。もちろん GPCR 以外の膜タンパク質のインターナリゼーションを用いること、さらには膜への発現・トラフィッキングなどへの応用も期待されます。

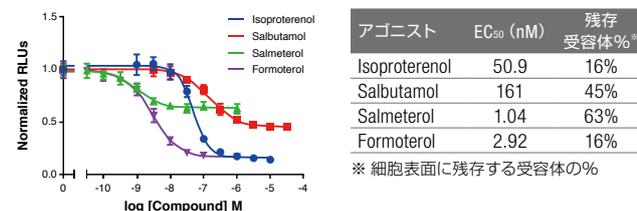


図 2 β2-adrenergic receptor (ADRB2) のエンドサイトーシス

ADRB2 の細胞外ドメインに HiBiT をタグ付けし、アゴニスト刺激 30 分後の細胞外 HiBiT タグを Nano-Glo® HiBiT Extracellular Reagent を用いて検出した。

タンパク質内部へのタグ挿入も可能

HiBiT が小さいということは、タグ付される元のタンパク質に対しての影響が非常に小さいことも期待できます。また、タグは N 末端あるいは C 末端に付加することが一般的ですが、N 末端はタンパク質機能の必須領域である場合が多く機能維持による制限があります。

CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) は嚢胞性線維症に関連する塩素チャネルで、508F 欠損変異がその原因であると報告されています。CFTR の両末端は細胞内にあるため、CFTR の細胞外ループに HiBiT を挿入することで、CFTR の細胞膜へのトラフィッキング検出に成功しています。なお、図 2 においては、ADRB2 のシグナル配列の直後に HiBiT を挿入しています。このように、**HiBiT はタンパク質分子内部に挿入しても、十分に機能し得ることが期待**されます。

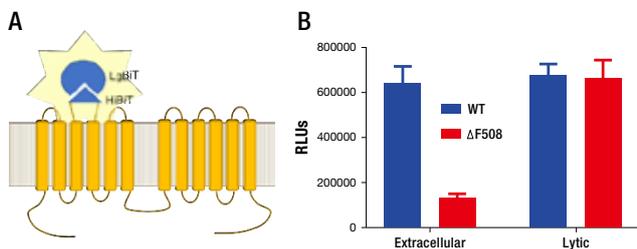


図 3 CFTR のエンドサイトーシス

A. HiBiT を細胞外ループに挿入した例イメージ (挿入位置を正確に記述したものではありません) B. Wild type と F508 欠損を Extracellular format (細胞表面上の CFTR を反映) および Lytic format (細胞全体での CFTR 量を反映) で測定した。

まとめ

HiBiT は 11 アミノ酸という小ささ、LgBiT との高親和性により明るい NanoLuc® 活性を再構成するという特徴から、これまでのアッセイ法では実施が難しかった細胞内タンパク質の定量観察を可能にし、さまざまな利用法によりライフサイエンスの大きな前進に寄与することが期待されます。

参考文献

1) Sudarshan Rajagopal *et al. Mol. Pharmacol.* 2011, 80, 367

PromegaClub オンサイトセミナー & 寺子屋、全国何処でも駆けつけます!

プロメガクラブ (無料) なら様々な特典、サービスで研究のお困りごとを解消します。新しい HiBiT テクノロジーの詳細、導入に関するご相談も承ります。プロメガクラブについての詳細、入会登録は www.promega.co.jp/promegaclub.html



HiBIT システムを用いた筋芽細胞細胞融合のモニター系



名古屋大学医学部保健学科
亀高 諭 先生

骨格筋は物理的な力を発揮するだけでなく、糖の貯蔵、生理活性因子の分泌など様々な生理機能を有する重要な組織である。また、日常的な収縮、弛緩のサイクルや過度の負荷などにより損傷しても回復することのできる、可塑性に富んだ組織でもある。骨格筋が損傷を受けると、筋細胞表層に存在する筋衛星細胞が活性化され増殖し、筋芽細胞へと分化する。その後筋芽細胞が遊走し損傷部位に集合し、細胞同士が融合して骨格筋の前駆体である多核の筋管細胞を形成する。このようにして形成された筋管細胞により、筋損傷部位が修復されると考えられている(図1)。これらの過程には多くの分子が関与していることが明らかとなっているが、筋管形成、特に筋芽細胞同士の細胞融合のプロセスに関する基本的な分子機構やその調節機構に関しては未だ不明な点が多い。

これまで、筋管形成は多核筋管細胞の数や骨格筋マーカーの発現量による評価など、形態学的あるいは生化学的な指標で評価されることがほとんどであったため、C2C12 培養筋芽細胞を用いた筋分化系においては、巨大な筋管細胞が顕著に増加してくる筋分化誘導後 4 日目以降で筋分化の程度が評価されることが多かった。しかし、筋管細胞形成には細胞融合だけでなく、細胞の遊走や筋管細胞の維持、成長など様々な要因が関与するため、筋芽細胞の細胞融合メカニズムに特異的に焦点を当てた分子スクリーニングには split GFP など限られた系で可能であったが検出感度、検出までにかかる時間などが問題だった。

本研究では、NanoLuc® ルシフェラーゼの発光活性を持たない C 末端欠損型蛋白質 LgBiT と、LgBiT に高い親和性を持つ 11 アミノ酸からなる HiBIT ペプチドを用いた筋芽細胞の融合を検出するモニター系を構築した。LgBiT、HiBIT をそれぞれ GFP および mCherry (mCh) 融合型の蛋白質として細胞に発現させるベクターを構築し、それらをマウス培養筋芽細胞 C2C12 細胞に遺伝子導入し、各々の融合遺伝子の安定発現株を樹立した。得られた両細胞株を共培養し培地中の血清濃度の低下により筋分化を誘導すると数日の間に多核の筋管細胞が形成されるが、この過程で細胞融合により細胞質中の GFP-LgBiT、mCh-HiBIT が会合することで、活性型の NanoLuc® が再構成されると予想された(図2)。実際、C2C12 細胞の筋分化誘導に伴い数時間後には NanoLuc® の活性化が検出され始め、筋管形成に伴い継続的にその活性は上昇した。また筋管形成を阻害するアクチン重合阻害剤サイトカラシン D (CytD) の添加によりこの NanoLuc® 活性化が阻害されることなどから、本検出系により形態学的な指標では評価することができない分化初期の C2C12 細胞の細胞融合現象を感度よく検出することが可能になったと考えられる(図3)。

また、本アッセイに用いる Nano-Glo® Live Cell Assay 基質は細胞の生存活性にほとんど影響を与えないため、NanoLuc® 活性の測定後培地交換により分化を継続することや、同一ウェルの生細胞数を MTT アッセイなどにより測定することができることから、同一ウェルの継続的な測定や、薬剤や遺伝子制御による細胞融合の度合いの変化を適切に評価することが可能であると考えられる。

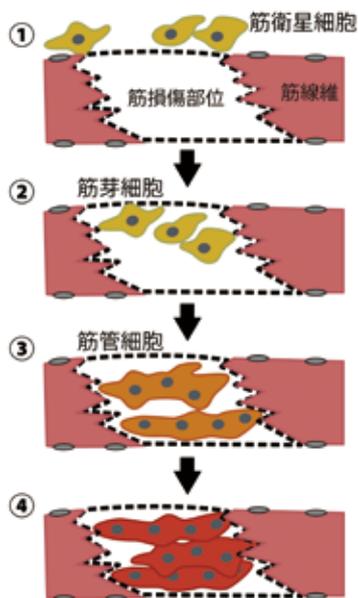


図1. 筋損傷からの修復プロセス

骨格筋の損傷に伴い、まず筋衛星細胞の活性化及び筋芽細胞への分化が起こる(①)。その後、筋芽細胞が損傷部位に遊走し(②)、筋芽細胞同士が融合することで筋管細胞が形成され(③)、筋組織の修復が行われる(④)。

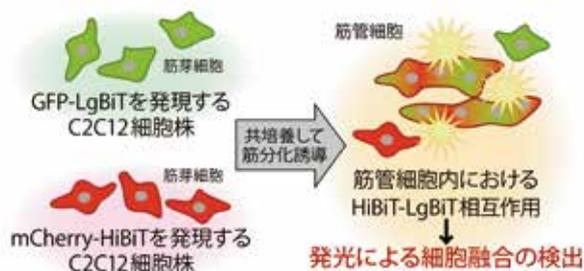


図2. HiBIT を用いた細胞融合検出システムのコンセプト

GFP-LgBiT, mCherry-HiBIT 発現 C2C12 細胞を用いた筋管形成の検出系の概略。

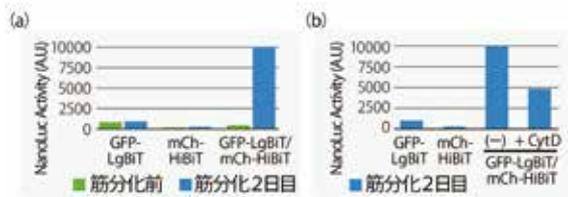


図3. HiBIT を用いた筋芽細胞融合の検出

HiBIT-LgBiT を用いた C2C12 細胞の細胞融合の検出。双方の細胞を共培養し、分化誘導をかけた時のみ NanoLuc® の活性化が見られ(a)、その活性化は細胞融合を阻害する CytochalasinD (CytD) 添加により阻害される(b)ことから、本検出系における NanoLuc® の活性化が筋分化による細胞融合現象を反映していると考えられる。

結論

- C2C12 筋芽細胞に HiBIT、LgBiT を導入することで筋分化に伴う細胞融合の検出系を確立した。
- 本検出系により筋芽細胞融合に関わる分子スクリーニングが効率よく行えると考えられる。

プロメガ学術部員の

目からウロコ

亀高先生のお話の中で、HiBIT を用いた検出系での評価により、筋細胞融合に関する遺伝子の新たな側面を切り開く事も出来たとのコメントが印象的でした。亀高先生の結果より、細胞の融合に加え、昨今注目されるエクソソームを介したデリバリーなどにも応用が可能とも感じました。現在、先生はこの系を活用し、筋細胞融合に関する化合物の探索を実施されています。新たな発見の報告が待ち遠しいです!



Bi-molecular complementation assay を利用した アルツハイマー病など神経変性疾患病因研究



東京大学 大学院医学研究科
神経病理学分野
認知症先端予防治療学
橋本 唯史 先生

アルツハイマー病は初老期に発症し、認知症を主症状とする進行性の神経変性疾患であり、超高齢化社会を迎えた現代、その克服は人類の喫緊の課題といえる。アルツハイマー病などの神経変性疾患では、神経細胞内、あるいは細胞外に疾患を特徴付ける病因タンパク質の凝集体が出現することが病理学的に認められている。これまで生化学・遺伝学的解析から、この病因タンパク質の凝集体形成過程は疾患発症の鍵機構であることが分かっており、その機序解明は疾患修飾薬の開発に不可欠である。

神経変性疾患の病因タンパク質は、タンパク質が凝集核依存的に構造変化して凝集体を形成する「凝集過程」、形成された凝集体が細胞間を移動する「伝播過程」、によって病変を形成・拡大させると考えられており、これらの過程は「プリオン様現象」と呼ばれている。タンパク質間の相互作用を鋭敏、かつ特異的にモニターすることが可能な bi-molecular complementation assay は、神経変性疾患病因タンパク質のプリオン様現象をモニターする上で極めて有効なツールである。我々はこれまでにアルツハイマー病脳老人斑の構成タンパク質 amyloid β peptide (A β) に注目し、split-luciferase complementation assay により A β のオリゴマー化測定系の樹立に成功した (Hashimoto, *JBC* 2011, *JNS* 2012)。さらに最近、可逆的な分子間相互作用の測定が可能な NanoBiT® を用い、前頭側頭型変性症あるいは筋萎縮側索硬化症に蓄積する FUS タンパク質の凝集過程の素過程であるオリゴマー化 (図1)、及び伝播 (図2) を測定する実験系を樹立したので、以下に紹介する。これらの技術は今後アルツハイマー病など認知症の治療薬開発に重要な知見を与えることが期待される。

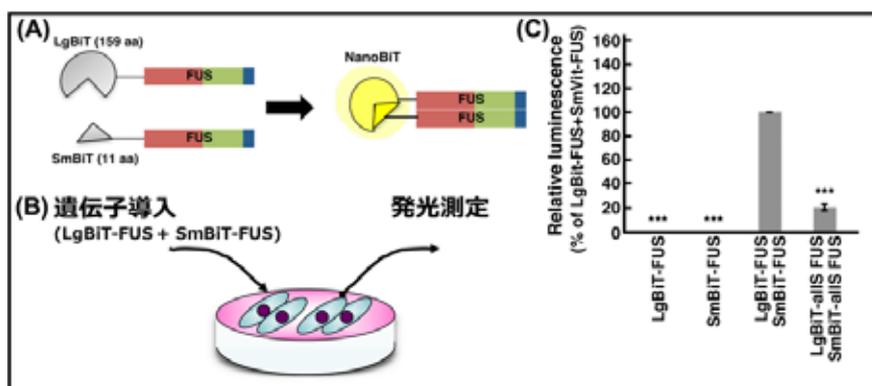


図1. FUS タンパク質オリゴマー化検出系の作成

(A) FUS のオリゴマー化を検討するため、FUS のアミノ末端に LgBiT あるいは SmBiT を融合させたタンパク質を作成した。FUS がオリゴマー化すれば、発光が期待される。(B) LgBiT-FUS あるいは SmBiT-FUS を HEK293 細胞に一過性に導入し、20 時間後に細胞内の luminescence を GloMax® Navigator により測定した。(C) LgBiT-FUS 及び SmBiT-FUS を共発現した細胞において強い発光が認められ、FUS がオリゴマー化することが確かめられた。一方 FUS のアミノ末端 27 個のチロシンをセリンに置換して、自己重合能を失った allS 変異体はオリゴマー化が低下することが分かった。N=5, (***) p<0.001。

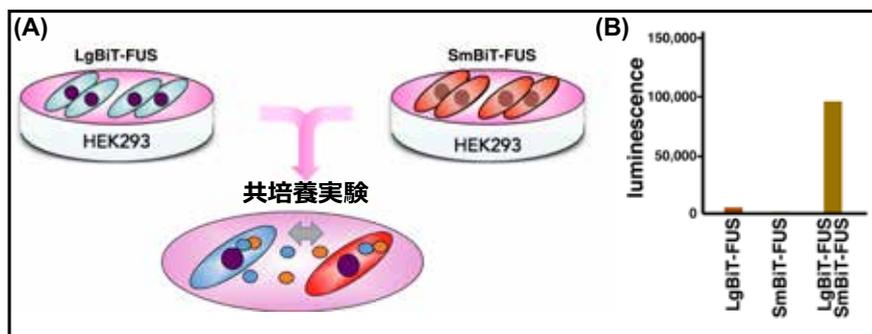


図2. FUS タンパク質の細胞間伝播検出系の作成

(A) FUS の細胞間伝播を検討するため、LgBiT-FUS あるいは SmBiT-FUS を恒常的に発現する HEK293 細胞を作成し、両細胞の共培養実験を行なった。もし FUS が細胞間を伝播すれば、共培養より発光が期待される。(B) LgBiT-FUS 及び SmBiT-FUS を恒常発現した HEK293 細胞を 72 時間共培養し、細胞内の luminescence を GloMax® Navigator により測定した。その結果、共培養により、luminescence の著しい上昇が認められ、FUS が細胞間を伝播することが確かめられた。N=3。

結論

前頭側頭型認知症、或いは筋萎縮性側索硬化症の病因タンパク質 FUS について以下の知見が明らかとなった。

- FUS は培養細胞内でオリゴマー化する
- FUS は細胞間を伝播する。

神経変性疾患病因タンパク質の“プリオン様現象”を測定するのに、bi-molecular complementation assay は有用なツールとなることが示唆された。

プロメガ学術部員の

目からウロコ

NanoBiT® はアミロイドペプチドのオリゴマー化測定系樹立において、従来のガウシアを用いた split luciferase と比較し、特に①タンパクサイズ ②可逆性の 2 点で非常に優れたツールであるとのこと評価を頂きました。今後 HiBiT を用いて細胞間伝播の実験系を検討予定とのこと、神経変性疾患の新たな実験ツールの開発に期待です！



NanoLuc® を用いた BRET バイオセンサー BTeam による 生細胞内 ATP 濃度計測



京都大学 生命科学研究所
高次生体統御学
今村 博臣 先生

生細胞内 ATP 濃度測定に興味ある方はお気軽にご相談下さい。また、大学院生も募集していますので、私たちの研究に興味のある方はぜひご一報下さい。

ホームページ: <http://www.imamura.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html>

私たちが以前開発した FRET 型蛍光バイオセンサーである ATeam は、ATP 結合タンパク質 ϵ を介して 2 つの蛍光タンパク質 (CFP と YFP) を融合させた構造を持っています。今回、ATEam の CFP を NanoLuc® に置き換えることにより、ATP 濃度依存的に生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) 効率が増加する新規発光 ATP バイオセンサー「BTeam」を開発しました。ATP 濃度が低い条件では、 ϵ が伸びた構造をとるために NanoLuc® から YFP への BRET 効率が低くなる一方、ATP 濃度が高くなると、 ϵ が閉じた構造をとるため BRET 効率が上昇し、結果として YFP の発光強度が増加します (図 1A)。

まず、培養哺乳類細胞に BTeam を発現させ、細胞培養液に NanoLuc® の発光基質を加えてマイクロプレートリーダーを用いた測定をおこないました。発光基質の添加後、細胞からの発光強度は時間とともに徐々に低下していきましたが、重要なことに、BRET 比 (YFP と NanoLuc® の発光強度比) は一定に保たれていました。また、既存の発光 ATP アッセイは、発光基質の濃度や細胞の数によって影響を受けやすいのですが、BTeam の BRET 比はこれらの要因の影響をほとんど受けないということも示されました。次に、BTeam の BRET 比から ATP 濃度を見積もったところ、多くの培養哺乳類細胞株において細胞質では 4 mM 前後、ミトコンドリアマトリックスでは 2 ~ 3 mM であることが示されました。

続いて、顕微鏡を用いた BTeam 発現細胞のイメージングをおこないました。解糖系の阻害剤と酸化的リン酸化の阻害剤を加えたところ、急速な BRET 比の減少が単一細胞レベルでも明瞭に観察することができました (図 1B)。

BTeam によって、生細胞内 ATP 濃度を指標としたハイスループットスクリーニングや、ATP イメージング技術の光合成生物への適用への道が拓けたと考えています。

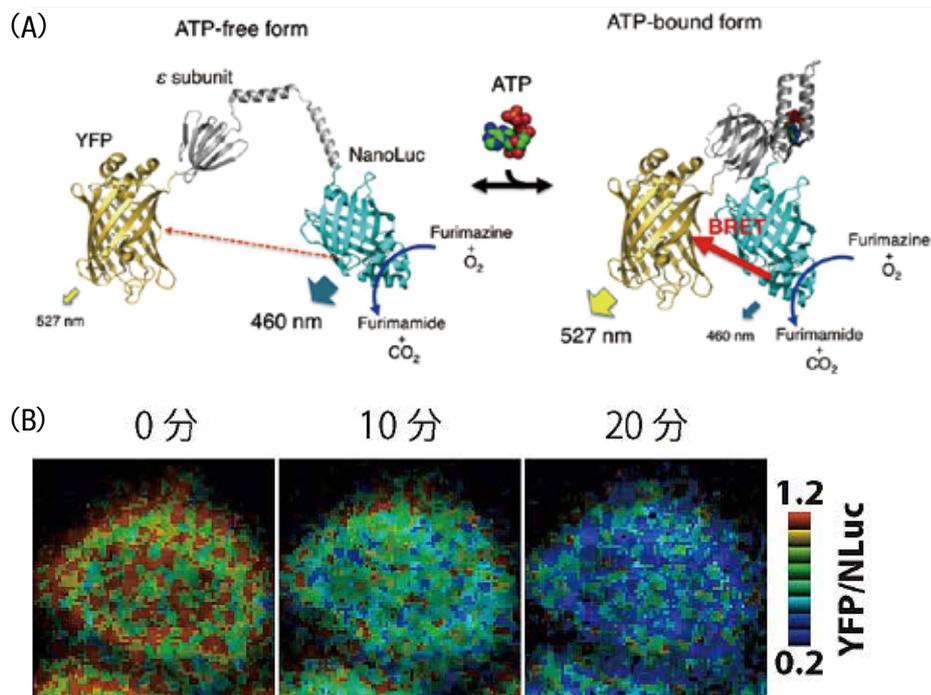


図 1. Bteam の模式図と単一細胞ライブイメージング

(A) BTeam の模式図。 ϵ への結合によって NanoLuc® と YFP 間の距離が変化することで BRET 効率が増減する。(B) BTeam を発現する細胞の単一細胞ライブイメージング。BRET 比を疑似カラー表示している。0 分の段階で ATP 合成阻害剤を添加した。

結論

- NanoLuc® を利用した BRET 型 ATP バイオセンサー「BTeam」を開発し、生きた細胞内の ATP 濃度を、マイクロプレートリーダーあるいは顕微鏡によって高い定量性で発光測定することが可能になった。
- BTeam によって、生細胞内 ATP 測定の適用範囲が大きく広がった。

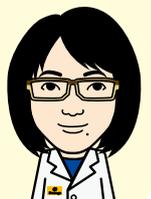
参考文献

- Yoshida, Kakizuka & Imamura (2016), "BTeam, a novel BRET-based biosensor for the accurate quantification of ATP concentration within living cells." *Scientific Reports* 6, 39618.

プロメガ学術部員の

目からウロコ

CellTiter-Glo®での細胞内 ATP 測定データを見慣れた身からすると、BTeam でリアルタイムに ATP 変化を追ったデータは非常に印象的でした。また FRET に対する BRET の強みとして、植物の光合成メカニズム解析への応用を挙げておられたのも興味深いアプリケーションです。現在 NanoBit® バージョンも作製中とのことですので、より明るいセンサーができれば細胞内の各部位における ATP 変化をさらにはっきり検出できるようになると期待しています。



ルシフェラーゼ遺伝子を応用した分泌タンパク質の解析



東京医科歯科大学
医歯学総合研究科
システム発生・再生医学分野
松島 隆英 先生

私は細胞内タンパク質の細胞内ダイナミクスに興味があり、細胞内あるいは細胞内から細胞外への各タンパク質の動態を様々なスクリーニング系を用いて解析を行っています。その中でも IL1 β を代表として一部の分泌タンパク質については分泌シグナルを持たず、かつ小胞体-ゴルジ体を経由せずに細胞外へと輸送されるという非古典的分泌経路に現在着目しています。私はこの経路をとる新規のタンパク質の同定とその分泌機構の解析を目的に研究を進めていますが、肝心の分泌機構の解析には細胞外の分泌タンパク質の定性・定量解析を行うことが必須となり、分泌タンパク質解析に一般的に利用される ELISA 法などでは新たに特異的な抗体が必要となるなど様々な問題が浮上してきました。そこで既存の手法に代わる分泌タンパク質の簡便かつ安価な定性・定量解析システムとしてルシフェラーゼ遺伝子を応用した単純な解析手法を考えました(図1)。既存のルシフェラーゼ遺伝子に加えて当時プロメガが新たに販売を開始した NanoLuc® を IL1 β に融合させた発現ベクターを使ってプレアッセイを試みた結果、IL1 β -NanoLuc® を遺伝子導入した細胞の培養液でのみ劇的な発光シグナルを確認することができました(図2)。この結果を踏まえて NanoLuc® を用いて非古典的分泌経路をとる新規のタンパク質の分泌解析を行ってきましたが、強制発現系では内在性タンパク質の分泌機構を正確に解析することが困難であるという新たな問題が出てきました。そのため現在はスプリット型 NanoLuc® として開発された極小発光タグである HiBIT を使用して、ゲノム編集技術を用いて作製した HiBIT タグ・ノックイン細胞とノックインマウスを用いて小胞体-ゴルジ体を経由しない細胞外への細胞内タンパク質の分泌機構の解析を進めています。

また上記の解析に加えて HiBIT - LgBIT の高親和性に着目し、どんな分子生物学解析にも対応できる「パーサタイル(万能) タグ」としての HiBIT 技術の可能性についても検討を進めており、その成果は 2017 年度生命科学系学会合同年次大会にて皆さんにご紹介したいと思っています。

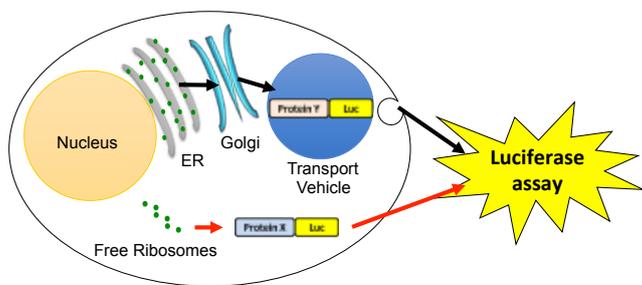


図 1. ルシフェラーゼ融合タンパク質による分泌解析システム

分泌タンパク質解析に一般的に利用される ELISA 法に代わる技術として目的タンパク質にルシフェラーゼを融合させた状態で細胞に発現させることで、ワンステップでタンパク質の分泌量を発光シグナルとして測定する。

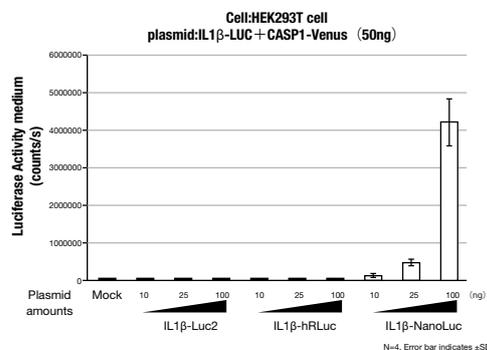


図 2. ルシフェラーゼ融合 IL1 β 発現細胞の培養液内でのルシフェラーゼ活性

HEK293T 細胞に各ルシフェラーゼ遺伝子を融合させた IL1 β 発現ベクターと Casp1-Venus 発現ベクターを遺伝子導入し、48 時間ごとに培養液を回収してルシフェラーゼアッセイを行った。IL1 β -NanoLuc® を遺伝子導入した細胞の培養液でのみ発現ベクター量依存的な発光の上昇を確認することができた。

結論

- ELISA に代る技術として NanoLuc®/HiBIT 融合タンパク質を用いたルシフェラーゼアッセイが有用である。
- 極小発光タグである HiBIT タグはゲノム編集によるノックインが容易である。
- HiBIT タグはパーサタイル(万能) タグ? (続きは 2017 年度生命科学系学会合同年次大会)。

プロメガ学術部員の

目からウロコ

これまで良い抗体がなく実験が滞っていた方に朗報でした。HiBIT は抗体フリーで分泌タンパクを解析できる画期的なツールであるとご評価頂きました。さらにゲノム編集への応用において、その高輝度性、スクリーニングの簡便さから、内在性の遺伝子発現解析に相性抜群のタグであるとのコメントを頂きました。今後 HiBIT のポテンシャルをさらに引き出す万能タグとしてのツールを開発予定とのことでその進捗に期待です!



2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ランチョンセミナーで松島先生よりご講演の要旨

ルシフェラーゼ遺伝子を利用した発光システムはワンストップの作業で体内の分子の作用・挙動を検出可能なパラメーター(レポーター活性)に変換する手法であり、シグナル伝達解析やバイオセンサーなどといった様々な分子生物学的解析に利用されている。我々の研究室でもルシフェラーゼ遺伝子を応用した様々なスクリーニング系を開発してきた。その中でも近年では煩雑かつ高価な ELISA 解析に代わるシステムとして NanoLuc®/HiBIT 融合タンパク質を用いたハイスループットアッセイに対応可能な分泌タンパク質の定性・定量解析システムを開発して研究に利用している。特にスプリット型 NanoLuc® として開発された HiBIT タグは 11 アミノ酸の付加により目的タンパク質の発光定量を可能とした「極小」の発光タグであり、ゲノム編集による各遺伝子へのタグ付け(タグging)の際にも一般的に利用されているルシフェラーゼ遺伝子群と比較して利用しやすい特性がある。我々はその特性を利用して HiBIT タグ・ノックイン細胞とノックインマウスの作製をシステムティックに進め、小胞体-ゴルジ体を経由しない細胞外への細胞内タンパク質の分泌機構の解析を進めている。本発表では我々の研究成果を交えながらウエスタンブロットや免疫沈降、免疫染色といった分子生物学解析に広く利用されている FLAG などの既存のスマールタグに取って代わる「パーサタイル(万能) タグ」としての HiBIT 技術の可能性について論ずる。

12/7 神戸で行われる 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ランチョンセミナーでお待ちしております。

HiBIT 実験 Q&A

Q HiBIT 塩基配列を人工合成、ペプチド合成してもいいですか？

A ラベルライセンスの内容を承認、登録して頂く必要があります (1分で終了する配列利用に関する簡単な登録です)。下記サイトよりご登録ください。
www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/

Q ORF 内部に HiBIT を挿入してもワークしますか？

A タンパク質の内部に HiBIT タグを組み込んでも LgBIT と結合することを社内で検証しております。Nano-Glo® HiBIT Extracellular Detection System (カタログ番号: N2420) の製品マニュアル 20 ページに、その際の注意点等を記載しております。

Q 分泌型の融合ベクターはどのような時に使用しますか？

A 膜タンパク質などでネイティブなシグナルペプチドを使用しない場合、強制的に細胞膜に移行させる際に使用します。

Q 論文実績はありますか？

A 下記論文実績があります。
CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.7b00549>

Q HiBIT と LgBIT の結合はどのくらい強いのですか？

A HiBIT-LgBIT の親和性は $K_d=7 \times 10^{-10} \text{M}$ です。一般的なアフィニティータグ (His や FLAG、c-Myc) の抗体との親和性 $K_d=2.2 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ に比べ、高い親和性を示します。

Q HiBIT ベクターは N 末端付加用、C 末端付加用がありますが、どのように選択すればよいのですか？

A ほとんどのタンパクで N 末端、C 末端の配向性の違いはありませんので、一般的なアフィニティータグ (His や Flag、c-Myc など) 同様、どちらを選択頂いても構いません。ただし、膜タンパク質など N 末端にシグナルペプチドがある場合は C 末端に HiBIT を付加する、あるいはシグナルペプチドと ORF の間に HiBIT を挿入するなどの工夫が必要です。

Q HiBIT と目的タンパクの間にリンカーは必要ですか？またその長さを検討する必要はありますか？

A ほとんどのタンパクでは Flexi® cloning site またはマルチクローニングサイトの制限酵素サイトの挿入で得られるリンカーで十分です。タンパクの種類により、稀に立体障害のため、長いリンカーが必要な場合があります。

Q ゲノム編集に応用するためには何を準備すればよいのですか？

A CRISPR/Cas9 によるゲノム編集ではガイド RNA、ドナー DNA テンプレート (HiBIT およびゲノムに相同な配列)、Cas9 タンパク (または発現ベクター) が別途必要です。
下記の CRISPR/Cas9 ゲノム編集による HiBIT ノックインプロトコルをご参照ください。

<http://www.promega.co.jp/hibitcrispr/>

また、ゲノム編集を実施する受託メーカーに受託して頂くことも可能です。その際は上記人工合成の際のライセンス登録を行ってください。

Q HiBIT 抗体はありますか？

A 現状、HiBIT に対する抗体はありません。



直ぐに始めたい方に朗報です！

Q 初回キャンペーンなどありませんか？

A HiBIT 導入キャンペーンを実施中です (2017 年 12 月 22 日まで)
www.promega.co.jp/hibitcamp/ を参照ください。

Q HiBIT のサブクローニング受託はしていますか？

A 受託可能です。以下のサイトより見積もりをご請求ください。
www.promega.co.jp/hibitserv/

Q 検出にはどのような機器が必要ですか？

A 一般的な発光測定装置 (ルミノメーター) で検出できます。試薬をご購入いただける方にはレンタルプログラム RentaMAX をご利用いただけます。詳細については www.promega.co.jp/rentamax/ をご覧ください。

アプリケーションを知りたい方！

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ランチョンセミナー

分子生物学解析における HiBIT テクノロジーの未来
The Future of HiBIT Technology for Molecular
Biological Analysis

プログラム: No. 2LS02

日時: 12 月 7 日 (木) 11:45 ~ 12:45

会場: 第 2 会場 (神戸ポートピアホテル 借楽 2)

12 月に神戸で開催されます ConBio2017 (第 40 回 日本分子生物学会年会 / 第 90 回 日本生化学会大会)におきましてランチョンセミナーを行います。最新のタンパク質検出タグ HiBIT をご利用いただいている東京医科歯科大学 システム発生・再生医学研究分野 松島 隆英 先生にご講演いただきます。要旨については 7 ページをご覧ください。

日本語 Web site : www.promega.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2017年10月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店