

2018年 春号

かわら版

Promega

KAWARABAN

今、試すべき最新の発光アッセイ

その理由とは??

HiBiT による

タンパク質発現・分解実験特集

2～3 頁、タンパク質解析実験の「お悩み」解決! HiBiT テクノロジー

4 頁、創薬ターゲットとしても大注目!

標的タンパク質分解をリアルタイムに検出!

5 頁、オートファジー活性を発光プレートリーダーで高速測定!

6 頁、*in vitro*? *in vivo*? それともプロメガの発光 3D アッセイ?

7 頁、あなたの実験イメージを具現化するプロメガの解析ツールと受託サービス

タンパク質相互作用解析のスーパーモデルケース

8 頁、コンサルティング & 貸出プログラム

MAX れんたるを開始しました!

プロメガ株式会社

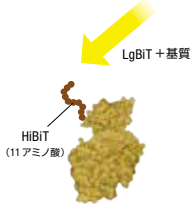
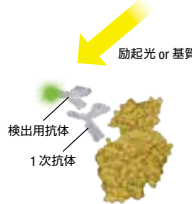
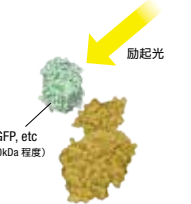
タンパク質解析実験の「お悩み」 解決！ HiBiT テクノロジー



プロメガは抗体不要でタンパク質量が可能な画期的な発光タグシステムを開発しました。HiBiT システムは 11 アミノ酸のペプチドタグと、それに高い親和性で結合する相補的な NanoLuc® ルシフェラーゼ断片 (LgBiT ; 17.6kDa) と基質を用いた、発光法によって目的タンパク質を検出する技術です (下表)。相補的に結合した LgBiT と HiBiT は NanoBiT® Luciferase となり、従来のホタル、ウミシイタケルシフェラーゼの 30 倍以上の発光輝度を有します。

すでに実用化されているタンパク質検出タグとして、エピトープタグ (His、c-Myc、FLAG 等) や GFP 等の蛍光タンパク質が知られています。これらは簡便性、親和性、アプリケーション、ランニングコストの面で長所と短所があるため、実験により使い分ける必要がありました (下表)。HiBiT システムはタンパク質量に関して、これら多くの点で高い性能を持ち、これまで難しいとされた様々な実験系を実現できる世界初の新規発光タグシステムです。ここではタンパク質の解析実験における様々な「お悩み」に対し、HiBiT がどのように解決できるかについてご案内します。

タンパク質の検出法比較表

	HiBiT システム	抗体	エピトープタグ	蛍光タンパク質
				
POI 機能への影響	POI 機能への影響小	POI 機能への影響なし	POI 機能への影響小	POI 機能への影響大
ありのまま	内在性に近い発現が可能 (ゲノム編集によるタグの導入が容易) 遺伝子組み換え作業あり	内在性発現 遺伝子組み換え作業なし	内在性に近い発現が可能 (ゲノム編集によるタグの導入が容易) 遺伝子組み換え作業あり	発現ベクターによる強制発現 (ゲノム編集による導入は困難) 遺伝子組み換え作業あり
検出	発光 簡単 (ステップ数 少) → 多検体処理も容易	発光、蛍光、発色 非常に煩雑 (ステップ数 多) 固定化必要 (ELISA, 免疫染色)	発光、蛍光、発色 煩雑 (ステップ数 多) 固定化必要 (ELISA, 免疫染色)	蛍光 簡単 (0 ステップ)
ランニングコスト	検出試薬	1 次抗体 & 検出用 抗体が必要、基質	検出用 抗体が必要、基質	なし
用途	定量 (ライセート & 生細胞 [経時的定量も可能 ¹⁾])	○ (ELISA)	○ (ELISA)	× (高バックグラウンド、低感度)
プロット	○	○	○	N/A
イメージング	○ (生細胞 ²⁾)	△ (免疫染色)	△ (免疫染色)	◎ (生細胞 ³⁾)

※ POI : 標的タンパク質。N/A : Not Applicable。 1) 細胞内タンパク質の場合、LgBiT タンパク質の安定発現が必要 (膜タンパク質や分泌タンパク質の場合は不要)
2) オリオン社の LV200 などの発光イメージングシステムが必要 3) 励起光による光毒性



タンパク質を検出するための良い
抗体が見つかりません…

抗体を用いた検出は時間ばかり
かかってうんざり…



HiBiT は抗体を必要としません！

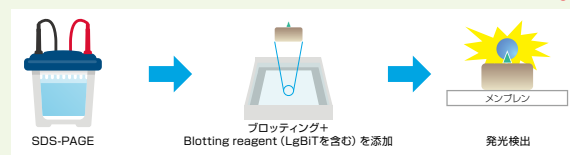
比較対象 抗体 エピトープタグ

抗体を使う実験は、内因性タンパク質を検出する目的においては極めて重要であるものの、一般的にとっても面倒で時間のかかる作業です。目的タンパクに対して特異性の高い抗体を見つけるのは、コストも時間もかかり一苦労です。さらにその実験では、長時間のインキュベーション、ブロッキング、洗浄、二次抗体検出が必要です。HiBiT は検出試薬を細胞に加え、タンパク質を検出するだけです。例えば細胞内タンパク質量では、HiBiT Lytic Assay 試薬 (細胞溶解剤、LgBiT および NanoLuc® 基質を含む) を添加後 10 分間で測定が完了します。プロットメンブレン上でのタンパク質検出では、細胞を溶解し、SDS-PAGE 泳動、メンブレン転写します。メンブレンに HiBiT Blotting assay 試薬 (LgBiT および NanoLuc® 基質を含む) を添加するだけで、目的タンパク質をバンドとして検出する操作は 30 分以内に完了します。

細胞ライセートのタンパク質量 (HiBiT Lytic Assay)



プロットメンブレン上でのタンパク質量 (HiBiT Blotting)



タグ自身がタンパク質を台無しにしないかと心配でなりません…

HiBiT はわずか 11 アミノ酸です！

比較対象 エピトープタグ 蛍光タンパク質

大きなタンパク質タグがタンパク質の機能を妨げる可能性があります。小サイズであることは、タンパク質タグとして最適です。タンパク質の発現や機能への影響を最小限に抑えることができます。

現在使用しているタンパク質検出法では感度が低く定量的な検出ができません…

HiBiT は極めて高感度です。わずか 1amol の HiBiT でも検出できます！

比較対象 抗体 エピトープタグ 蛍光タンパク質

HiBiT の発光は NanoLuc® ルシフェラーゼの発光に由来しています。NanoLuc の発光値は従来のホタル、ウミシイタケルシフェラーゼの発光の 100 倍以上です。また、ルシフェラーゼによる発光測定は GFP などの蛍光タンパクによる検出に比べ、10,000 倍以上の定量性感度があります。また、一般に ELISA、ウエスタンの検出は、それぞれ fmol、pmol オーダーが限界と言われていますが、プレートリーダーでの測定では、わずか 1amol の HiBiT- 目的タンパクを検出できます (図 1)。

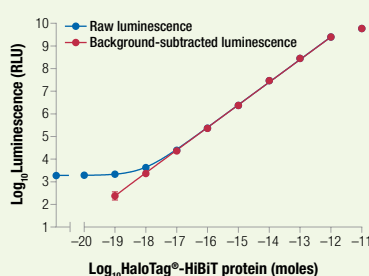


図 1. HiBiT 融合タンパク質の検出感度と直線性
精製 HaloTag®-HiBiT タンパクを Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent により検出した。少なくとも 7 桁のリアダイナミックレンジを示した ($r^2 = 0.9982$)。



私の研究対象のタンパク質は極めて発現レベルが低く検出ができません…

HiBiT はゲノム編集の応用で内在性レベルの発現を定量化できます！

比較対象 抗体 エピトープタグ 蛍光タンパク質

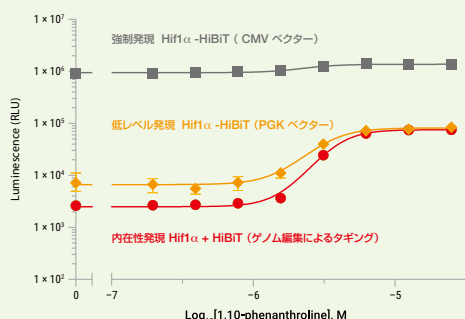


図 2. phenanthroline による HIF1 α -HiBiT の安定性評価

CMV あるいは TK プロモーターを利用して HIF1 α -HiBiT を細胞内に一過性発現あるいはゲノム編集による内在性 HIF1 への HiBiT タグ付けにより発現させ、phenanthroline によるタンパク安定性を発光検出により評価した。

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 (図 2)。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のが一因であると推察されます。

内在性発現レベルの検出が可能

低発現のタンパク質の場合、発現ベクターで過剰発現というアーティファクトを伴う実験をせざるを得ませんでした。本来はできるかぎり内在レベルでの発現が望まれます。HiBiT の活用により、これまでタンパク質を過剰発現でしか見ることができなかった現象を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。

CRISPR/Cas9 を利用して、目的の内在性タンパク質にレポータータグをつけようとしています。プラスミドドナーを作ることが面倒でし、挿入効率が低すぎます。

HiBiT はプラスミドドナーを必要としません！

比較対象 蛍光タンパク質

GFP のような大きなレポーターは CRISPR/Cas9 でのノックインにはとても難易度が高いです。大きなレポーターにはプラスミドドナーや長い配列のドナーが必須です。プラスミドの構築の手間とコストが生じます。あるいは長い人工配列を使用した場合も、2 本鎖 DNA を使う必要があり、ノックイン効率が悪く、組み換えの重複が生じやすくなります。HiBiT は 1 本鎖のオリゴテンプレートを使って挿入することができます。サイズが小さいので、効率よくノックインすることができ、またオリゴの作製コストも抑えられます。

HiBiT 配列 (33 bases) の利用には Web 上での簡単なライセンス内容の承認登録が必要です (www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/)。出張セミナー「やってみよう! HiBiT ノックイン実験」も承っております。詳細については www.promega.co.jp/onsite_seminar/ をご覧ください。

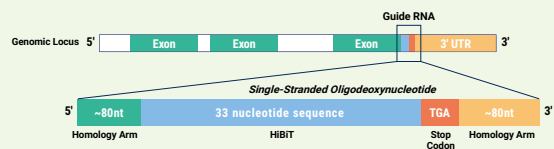


図 3. CRISPR/Cas9 による HiBiT のノックインの際のドナーオリゴのデザイン

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10 ml	N3030	26,000
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	10 ml	N2420	28,000
Nano-Glo® HiBiT Blotting System	100 ml	N2410	36,000
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2371	73,000
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2381	73,000
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2361	73,000

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2391	73,000
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2401	73,000
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2411	73,000
pBiT3.2-C [TK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000
pBiT3.2-N [TK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000
pBiT3.3-C [PGK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000
pBiT3.3-N [PGK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000

*カタログ番号 が「カスタム品」となっている製品のご注文については promega.formstack.com/forms/casorder よりお申込みください (プロメガクラブへの入会が必要です)。

創薬ターゲットとしても大注目！

標的タンパク質分解をリアルタイムに検出！

古くから細胞内タンパク質分解の破綻が疾患を引き起こすことが知られており、特にアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患の原因として有名です。代表的なタンパク質分解系としてはオートファジーと並んでユビキチン-プロテアソーム系が挙げられます。がん細胞ではタンパク質分解系を阻害して異常タンパク質を蓄積させることにより細胞死を誘導することからプロテアソーム阻害剤がすでに抗がん剤として使用されています。また最近では標的タンパク質を強制的にユビキチン化し、分解促進する PROTAC などの標的タンパク質特異的分解誘導薬に注目が集まっており、創薬ターゲットとして今非常にホットな分野です。しかしながら、細胞内タンパク質分解をハイスループットで、さらにはリアルタイム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。このセッションでは、プロメガが開発した発光リアルタイムタンパク質モニタリング法とその応用事例をご紹介します。

標的タンパク質特異的分解誘導薬とは

ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解は、ユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) による標的タンパク質のユビキチン化から開始します。これを利用し、標的タンパク質を E3 リガーゼと強制的に結合させてユビキチン化し、分解を促進する「標的タンパク質分解誘導薬」がいくつか開発されています。PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera)¹⁾ や日本で開発された SNIPER (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein ERaser)²⁾ が代表的な技術です。これらの標的タンパク質分解誘導薬は標的タンパク質に結合する分子と E3 リガーゼに結合する分子をリンカーでつないだ二機能性の低分子化合物で、本来は相互作用しないタンパク質同士を強制的に結合させることから「分子糊 (Molecular Glue)」とも呼ばれています (図 1A)。

これらタンパク質分解誘導薬では、標的タンパク質を過剰に発現させるとわずかな変化量をとらえることが困難になるため、内在性レベルでリアルタイムに測定できるアッセイ法が望まれます。また重要な創薬ターゲットであることから、簡便でスクリーニングに対応したアッセイ法であればより有用です。これまで基礎研究ではウェスタンブロットング、スクリーニングでは TR-FRET や AlphaLISA[®] などが使用されてきました。しかしこれら抗体を用いる検出法は、多くの場合内在性レベルの発現解析には検出感度が不十分です。さらにウェスタンブロットングは時間がかかり、操作も複雑であることがネックになっていました。

これらの点を解決するのが NanoLuc[®] テクノロジーを応用したアッセイです。ここでは HiBiT タグを用いて目的タンパク質の発現量を迅速・高感度に検出するアッセイ (図 1B)、および NanoBRET[™] を利用して PROTAC による目的タンパク質と E3 リガーゼの相互作用を検出するアッセイ (図 1C) をご紹介します。

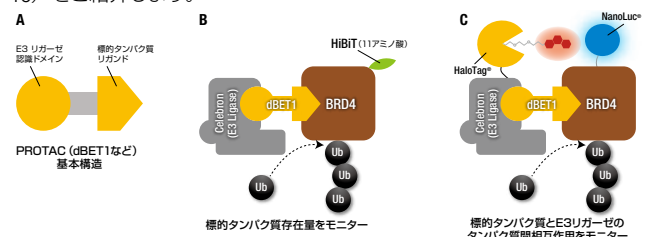


図 1. 標的タンパク質特異的分解誘導薬解析ツールの原理

A. PROTAC の模式図。B. HiBiT タグを付加した BRD4 タンパク質分解を発光値として直接にモニター。C. HaloTag[®] 付加 Celebrin と NanoLuc[®] 付加 BRD4 の相互作用を BRET によりモニター

高発光タグ HiBiT を用いたタンパク質ダイナミクス検出法

HiBiT は内在性レベルの発現量でも十分検出できる感度を持ち、かつサイズが非常に小さく (11 アミノ酸)、ゲノム編集で容易に標的タンパク質にノックイン (タギング) できることから、内在性レベルのタンパク質発現量解析に最適です (3 ページ参照)。検出操作も簡便であり、細胞に 1 種類の検出試薬 (LgBiT タンパク質と発光基質を含む) を添加するだけで発光します。ウェスタンブロットングのようにエンドポイント解析する場合、必要なのは HiBiT タグを付加した目的タンパク質、HiBiT 検出試薬とルミノメーターのみです (図 2)。HiBiT タグ付加標的タンパク質は発現量に気を付ければベクター (低発現用プロモーターを推奨。3 ページ参照) で外来性に発現させることも可能です。

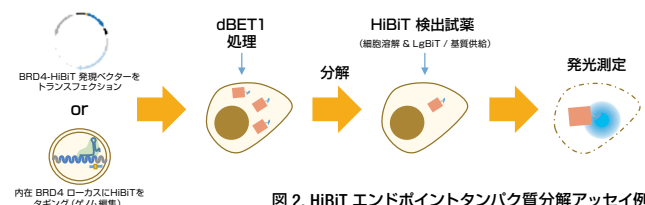


図 2. HiBiT エンドポイントタンパク質分解アッセイ例

一方リアルタイムモニタリングを行う場合は、HiBiT タグ付加標的タンパク質に加えて LgBiT タンパク質を安定的に発現させる必要がありますが、発光測定する際は Nano-Glo[®] Live Cell Reagent を添加するだけです。図 3 はゲノム編集で HiBiT を付加した BRD4 のリアルタイムモニタリング例です。このデータから 2 種類の PROTAC (dBTET1 or MZ1) 処理により 3 時間以内に BRD4 発現量が低下すること、また MZ1 の方が速やかに BRD4 量を低下させることが分かります。

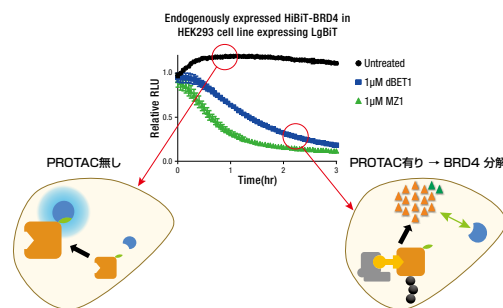


図 3. HiBiT リアルタイム タンパク質分解アッセイデータ

BRD4 遺伝子にゲノム編集で HiBiT をノックインし、さらに LgBiT を安定発現させた HEK293 細胞での BRD4 モニタリングデータ。PROTAC (dBTET1 および MZ1) 処理により BRD4 量が減少する様子を HiBiT 発光で検出した。

PROTAC によるタンパク質相互作用誘導解析

より詳細な解析を実施したい場合は、NanoBRET[™] テクノロジーを用いて、PROTAC による標的タンパク質と E3 リガーゼの相互作用誘導をモニターすることも可能です (図 1C)。図 4 は dBTET1 による BRD4 と Celebrin の相互作用カインेटクスを検出したデータです。dBTET1 添加後 1 時間ではほぼシグナルがプラトーに達し、BRD4 と Celebrin が結合したことを示しています。

新たなモダリティとしても注目されるタンパク質分解誘導の基礎的な実験にも利用できる HaloTag PROTAC 試薬 (HaloTag[®] 融合タンパク質分解誘導化合物) も開発中です。ご興味がある方はお問合せください。

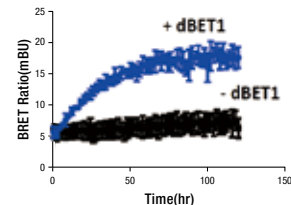


図 4. NanoBRET[™] を用いた dBTET1 による Celebrin-BRD4 相互作用のカインेटクス測定。

まとめ

NanoLuc[®] 最新技術により、生きた細胞でのタンパク質分解をリアルタイムに解析できるようになりました。特に内在性レベルでのタンパク質動態を追うことができる HiBiT でのモニタリングはユビキチン-プロテアソーム系の解析に限らず、他の系にも応用できるシンプルでフレキシブルな技術です。次のページではオートファジー解析への応用事例を紹介します。

参考文献

- 1) Sakamoto, Kathleen M. *et al.* PNAS 98.15 (2001): 8554–8559.
- 2) Itoh Y. *et al.* (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, 5820–5826

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Nano-Glo [®] HiBiT Lytic Detection System	10 ml	N3030	26,000
Nano-Glo [®] Live Cell Assay System	100 回分	N2011	28,000
CMV LgBiT (KanR/HygR) Vector	-	カスタム品	80,000
NanoBRET [™] PPI MCS Starter System	1 セット	N1811	180,000
NanoBRET [™] PPI Flexi [®] Starter System	1 セット	N1821	150,000

*カタログ番号が「カスタム品」となっている製品のご注文については promega.formstack.com/forms/casorder よりお申込みください (プロメガクラブへの入会が必要です)。

オートファジー活性を発光プレートリーダーで高速測定！

オートファジーの分子メカニズムを解明した功績にて東京工業大学 大隅崇教授が2016年のノーベル生理学・医学賞を受賞したことは記憶に新しいところだと思います。オートファジーはがん、神経変性疾患、生活習慣病、感染、各種の炎症などの様々な疾患に関与し、また発生・免疫・寿命などにも関わりのある分解機構です^{1,2)}。オートファジーフラックスの測定では全般的なマーカーであるLC3に対しての発現・局在解析やLC3に蛍光タンパク質を付与してのイメージング解析が行われています。一方で従来法はスループットが低い事、蛍光イメージングの評価というデメリットがありました。これに対し、今回、プロメガではオートファジーフラックスを発光にて測定し、簡便に定量化する技術を確認しました。

オートファジーとは

オートファジーは細胞質成分をリソソームにて分解する現象であり、酵母から高等動物・植物まで保存されている機構です。オートファジーには、シャペロン介在性オートファジー、ミクロオートファジー、マクロオートファジーの3つの形式が知られていますが、ここでのオートファジーはマクロオートファジーを指すものとしてご紹介します。オートファジーが誘導されると隔離膜が出現・伸長し、タンパク質やオルガネラなどを包み込みます。完全に包み込んだ状態をオートファゴソームと呼びます。続いてオートファゴソームがリソソームと融合し、リソソーム内の分解酵素により包み込まれた細胞質成分が分解されます(図1上参照)。この様な過程を経て、細胞質成分を分解するのがオートファジーです。

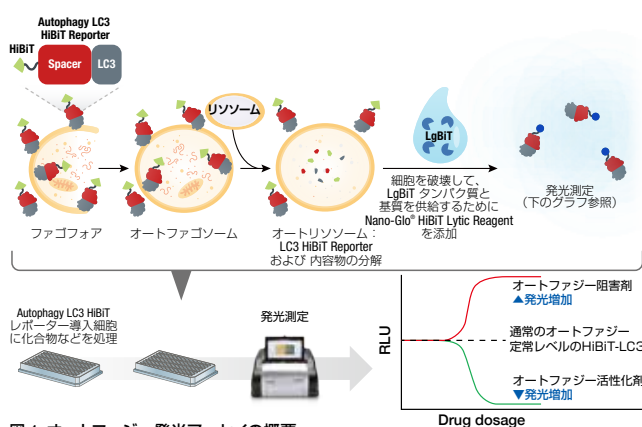


図1. オートファジー発光アッセイの概要

発光法を用いたオートファジーフラックスの検出

オートファジーの過程において多くの分子の関与が見出されていますが、LC3タンパク質はオートファジーのほぼすべての過程で存在する事からオートファジーの全般的なマーカーとして広く利用されています。その利用方法としてはLC3の発現量をウェスタンブロッティング(WB)にて測定したり、LC3にGFPやRFPなどの蛍光タンパク質を付加し、イメージングでの評価がなされてきました³⁾。一方で、WBではスループットが低い事や蛍光イメージングによる評価が難しく、定量的な比較には特殊な装置が必要になるなどのデメリットがありました。プロメガの新しいアッセイでは発光タグHiBiTを活用し、プレートリーダーを用いたオートファジーフラックス解析を可能にしました(図1参照。HiBiTについては2ページをご覧ください。)。Autophagy LC3 HiBiTレポーター導入細胞にオートファジー活性に影響を与える化合物を添加し、発光基質とLgBiTタンパク質を検出試薬として加える事で検出を行います。オートファジーを誘導するとHiBiT-LC3レポーターの分解が促進され、発光シグナルが低下します(抑制されると発光シグナルが増加)。すなわち、本アッセイシステムは一般的なルミノメーターを用いて、オートファジーフラックスの変化を発光シグナルにて簡便に評価することができます。

3次元細胞モデルでもオートファジーを評価！

HiBiT-LC3レポーターを活用した例を図2に示しました。ここではPP242とBafA1*を組み合わせ、HiBiTの発光値の変化からオートファジーフラックスを2次元培養と3次元培養のモデルで評価しています。

PP242処理によりオートファジーを誘導すると、HiBiT-LC3レポーターの分解が促進され発光値が低下します。それに対してPP242とBafA1処理を行うと、HiBiT-LC3レポーターの分解が抑制され、発光値が回復する結果が観察されました。2次元、3次元の培養形態に関わらず、発光法によりオートファジーフラックスを評価できることが示唆されます。

ある種のがん細胞においては、2次元培養、3次元培養、がん組織ではオートファジーに関する転写因子の発現パターンが異なるとの報告がなされています⁴⁾。従来法では難しかった3次元培養での評価も発光

法の活用で進展することが期待されます。3次元モデルを用いたその他の発光解析法については6ページを参照ください。

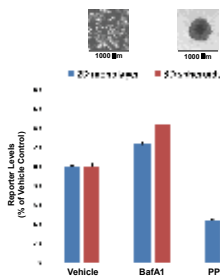


図2. 2次元細胞モデルと3次元細胞モデルでのオートファジー活性の評価

Autophagy LC3 HiBiTレポーター導入 HEK293細胞を使用した。2次元細胞モデルでは10,000 cells/wellで96well plateに播種。3次元細胞モデルでは2,000 cells/wellにてCorning® 96-well Clear Round Bottom Ultra Low Attachment Microplateに播種した。各化合物を6時間処理し、発光測定を行った。

※ PP242: mTOR阻害剤(オートファジー誘導剤)、BafA1(Bafilomycin A1): オートファゴソームとリソソームの融合阻害剤(オートファジー阻害剤)

オートファジーに関するスクリーニングへの展望

がんをはじめ、種々の疾患の発症などにオートファジーが関与する事から、オートファジーを制御する薬剤スクリーニングや創薬にも関心が高まっています。スクリーニングのモデル例として、図3に Autophagy LC3 HiBiTレポーターを用いた384wellプレートでのアッセイ例を示しました。

スクリーニングでは概ねCV値10%以内、Z'値が0.5以上であることが求められます⁵⁾。プロメガのアッセイ例ではCV値3~5%、Z'値0.6~0.7を示し、良好なアッセイ系が構築できる事が示されました。

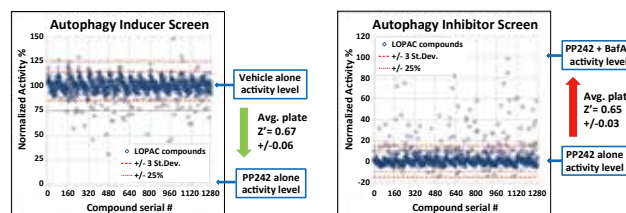


図3. LOPACライブラリーを用いたスクリーニングのモデル例

Autophagy LC3 HiBiTレポーター導入 HEK293細胞を1000 cells/wellで384well plateに播種した。(左) 種々の化合物にて6時間処理し、発光測定を行った。Vehicle controlを100、PP242のサンプルを0とし、オートファジーを誘導する化合物の探索を行った。(右) PP242と種々の化合物にて6時間処理し、発光測定を行った。PP242のみのサンプルを0、PP242 + BafA1のサンプルを100とし、オートファジーを阻害する化合物の探索を行った。

最後に

オートファジーは今や多くの人が知る機構となりましたが、オートファジーの分子機構にはまだまだ未解明な点があります。今回プロメガではオートファジーのメジャーマーカーであるLC3に着目し、HiBiTの技術を活用しました。発光技術がオートファジー研究の新しい発見の一助になれば幸いです。

参考文献

- 1) *N Engl J Med*. 2013 Feb 14;368(7):651-62.
- 2) *Nature Reviews Cancer* volume 17, pages 528–542 (2017)
- 3) Yoshii, S. R. & Mizushima, N. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–13 (2017).
- 4) Corinna Bingel et al. *Cell Death Dis.* 2017 Aug; 8(8): e3013
- 5) アッセイ系のバリデーションの手順(東京大学 創薬機構)
http://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/wp/wp-content/themes/ddi/doc/assay_validation_method.pdf

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Autophagy LC3 HiBiT Reporter Vector and Detection System	1kit	GA2550	88,000
HEK293 Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cell Line and Detection System	1kit	GA1040	1,070,000
U2OS Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cell Line and Detection System	1kit	GA1050	1,070,000

in vitro ? in vivo ? それともプロメガの発光 3D アッセイ?

in vitro と in vivo の中間を担うと目されている 3 次元培養を行うための機材・手法・プレートが続々と開発されています。昨今では 1536well での 3 次元培養サンプル(3D サンプル) のスクリーニングモデルも報告されるようになり、3D サンプルを扱う方法も身近なものになってきました。しかし、様々な 3D サンプルの作製法が確立される一方で、その評価方法に関しては十分に浸透していません。そこで、このセッションでは発光法で測定できる細胞アッセイの一例を紹介します。

3D での細胞生存試験の王道・ATP 測定アッセイ

3D サンプルでは細胞塊の中心まで試薬が浸透し、しっかりと検出できているか、という疑問が常につきまといます。そこでプロメガでは酸により 3D サンプルから直接抽出した ATP との比較を行い、どれくらいの抽出効率なのかを検討しました。図 1 にその結果を示しています。

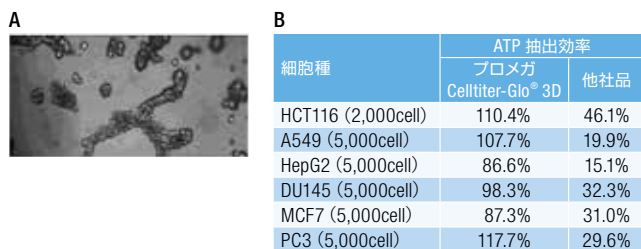


図 1. マトリゲル上で培養した 3D サンプルにおける ATP 抽出効率の比較
Matrigel® (Corning) をコートした well に種々の細胞種を播種し、4 日間培養した。
A. 4 日間培養後の A549 細胞の顕微鏡下写真。細胞が凝集し塊を形成している。
B. 種々の細胞種を表に記載の細胞数で播種した。トリクロロ酢酸を用いて 3D サンプルから ATP を抽出した場合の値を 100 とし、CellTiter-Glo® 3D および他社品の ATP 抽出効率を相対的に示した。

プロメガの 3 次元用 ATP 測定試薬はほぼ 100% の抽出効率であることから、3D サンプルにおける細胞の生存性の指標として十分に利用できることを示唆しています。

(この他に、DNA 染色による細胞膜透過性の確認実験も行っています。テクニカルのひとつコラム 2016 年 1 月号; www.promega.co.jp/pdf/tech1601.pdf をご覧ください)

一方で 3D サンプルでの生細胞の評価方法の 1 つに、サンプルのサイズや体積を評価する方法があります。実際のサンプルを観察した評価方法になりますが、スループットの問題や特殊な機器が必要になる事、3D サンプル内部の状態を反映していないという懸念があります。これに対して、ATP 量が 3D サンプルのサイズ・体積と良く相関するとの報告が複数あり、現在では ATP 測定アッセイが 3D サンプルでの生細胞の評価の王道となっています。

細胞内グルタチオン・アポトーシスの測定

生体内の還元物質であるグルタチオンは活性酸素種 (ROS) や異物の除去に関わる重要な分子です。一方で、酸化ストレスなどが起因となることで細胞はアポトーシスを引き起こす事が知られています。図 2 には 3D サンプルでの細胞内グルタチオンとカスパーゼ 3/7 の活性測定の例を示しました。3D サンプルにおいても、2D サンプルと同じように測定することが可能です。

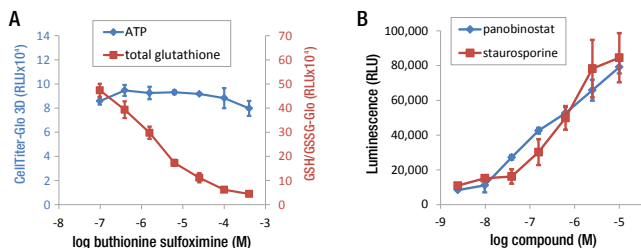


図 2. 細胞内トータルグルタチオンとカスパーゼ活性の測定
HCT116 細胞を GravityPLUS™ 96-well hanging-drop platform (InSphero) に播種し、4 日間培養し spheroid を形成させた。
A. GSH 合成阻害剤 BSO (buthionine-sulfoximine) を種々の濃度で添加し、48 時間処理した。GSH/GSSG-Glo™ アッセイで細胞内トータルグルタチオン量を測定し、CellTiter-Glo® 3D にて ATP 量を測定した。BSO 濃度に依存して細胞内トータルグルタチオンの減少が観察された。
B. 種々の濃度の panobinostat と staurosporine を添加し、24 時間処理後 Caspase-Glo® 3/7 アッセイを行った。化合物濃度に依存して、カスパーゼ 3/7 の活性が観察された。

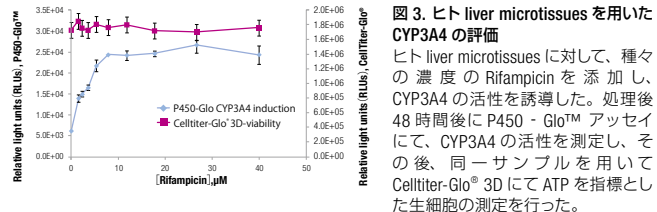
シトクロム P450 3A4 の測定

2D サンプルと異なり、3D サンプルでは細胞が有する本来の機能や分化能をより良く評価できる点もメリットの 1 つです。その 1 例として肝

毒性の評価法が挙げられます。創薬において肝毒性(薬物誘発性肝障害)は医薬品の開発中止理由の約 20% を占めています。株化細胞を用いた評価系では本来の機能・活性が低い、初代培養細胞では安定供給の面でデメリットがあります。肝毒性を早期に評価できる系が求められており、3 次元培養法が長期培養可能でかつ in vivo に近い評価モデルとして注目されています。

図 3 にはヒト liver microtissue を用いて主要な代謝酵素の 1 つである CYP3A4 の活性を評価したアプリケーションを示しました。また、ここでは培地をサンプルとして CYP3A4 の活性を評価し、ATP を指標として生細胞の測定を行っています。

(CYP3A4 の評価系に関しては ADME/Tox プロダクトガイドをご覧ください: promega.co.jp/pdf/adme_tox.pdf)



最後に

今回紹介したマーカー以外にも、プロメガの発光技術は 3D サンプルの死細胞マーカー (LDH) や NAD(P)/NAD(P)H、ROS (H₂O₂)、もちろんレポーターアッセイにも対応しています。さらにオートファジーも。図 4 には現在カスタムとしてご提供している、発光法での漏出 LDH の活性測定例を示しました。

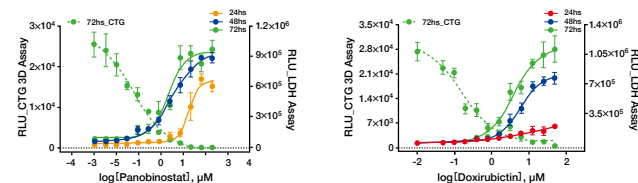


図 4. 3D サンプルにおける細胞毒性と細胞生存性のマルチアッセイ
HCT116 細胞を 2,500 cells/well にて 384 Ultra-Low Attachment plates(Corning) に播種した。種々の濃度の Panobinostat および Doxorubicin を添加し、化合物添加後 24,48,72 時間の培地サンプルを採取し、死細胞マーカーの漏出 LDH 量を発光法で測定した。72 時間の培地サンプルの採取後に残った細胞に対して、CellTiter-Glo® 3D アッセイを実施し、細胞内 ATP から生細胞を評価した。

発光 LDH アッセイや CYP3A4 アッセイの他、エネルギー代謝関連マーカー (Glucose, Lactate, Glutamine, Glutamate) アッセイ等、培地をサンプルとすることで、同一のサンプルにおいて複数のアッセイを実施できることもプロメガの技術の特長です。

今回紹介した以外のアプリケーションも公開していますので、上記のキーワードを是非検索してください!

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CellTiter-Glo® 3D Cell Assay	10 ml	G9681	16,500
GSH/GSSG-Glo™ Assay	10 ml	V6611	92,000
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5 ml	G8090	22,000
P450-Glo CYP3A4 Assay with Luciferin-IPA	10ml	V9001	24,000
Lactate-Glo™ Assay	5 ml	J5021	74,000
Glucose-Glo™ Assay	5 ml	J6021	67,000
Glutamate-Glo™ Assay	5 ml	J7021	74,000
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	5 ml	J8021	80,000
Luminescent LDH Cytotoxicity Assay	-	カスタム品	37,000

*カタログ番号で " カスタム品 " となっている製品のご注文については promega.formstack.com/forms/casorder よりお申込みください (プロメガクラブへの入会が必要です)。

事例
研究

あなたの実験イメージを具現化するプロメガの解析ツールと受託サービス タンパク質相互作用解析のスーパーモデルケース

ご協力：東京大学医科学研究所 抗体・ワクチンセンター 谷口 博昭 先生

タンパク質相互作用（Protein-Protein interaction, PPI）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、ファウースタンプロット法、表面プラズモン共鳴法など様々なタンパク質相互作用解析法が開発され、研究内容に合わせて最も説得力があり効率的な方法が選択されてきました。今回ご紹介する事例では従来の方法に加え、タンパク質タグである HaloTag® を用いたプルダウンや新技術 NanoBRET® を

取り入れた結果、新規な相互作用タンパク質候補の取得ならびにこれまで困難だった生細胞内における相互作用の定量的解析が可能となり、*in vitro* から生細胞での PPI 検出～機能解析まで多角的な検討に成功しています。

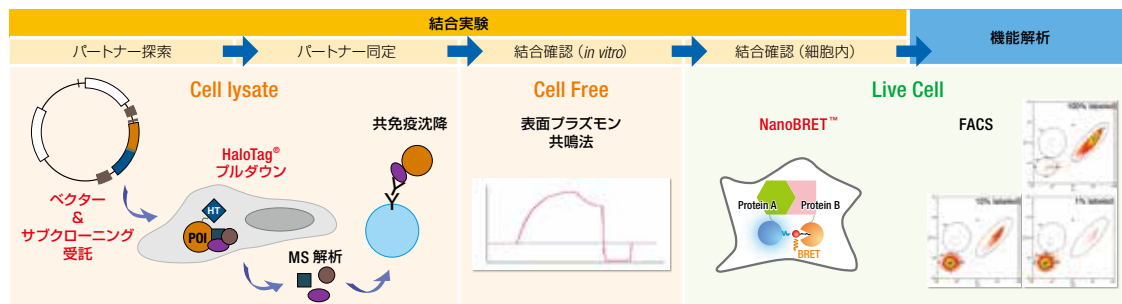
HaloTag®, NanoBRET® は ORF クローンや実験受託サービスもあり、煩雑な部分をスキップできます。タンパク質相互作用の解析ツールのひとつとして是非ご活用ください。

今回の参考文献

- PRDM14 directly interacts with heat shock proteins HSP90α and glucose-regulated protein 78. Moriya, *et al.*, *Cancer Science*. 2018;109:373–383.

論文概要

PRDM14 は様々な癌において過剰発現しており、乳癌細胞および肝癌細胞において PRDM14 発現の阻害により、癌の悪性形質を減じることが報告されている。薬物治療において PRDM14 の結合パートナーの同定、機能解析は重要である。ここでは、PRDM14 と相互作用するタンパク質の同定および機能解析を行った。乳癌細胞において Halo-PRDM14 を発現、プルダウンおよび質量分析により 13 の相互作用タンパク質の候補を得た。さらに Co-IP によって 2 つの候補 GRP78 および HSP90α が確認された。表面プラズモン共鳴法による分析は、これら 2 つのタンパク質が *in vitro* で PRDM14 と直接相互作用することを示し、また、NanoBRET® アッセイにより生細胞でも実際に相互作用していることを確認した。さらに、PRDM14 発現の抑制と HSP90 阻害剤や GRP78 阻害薬との併用で、がん幹細胞性と関連のある CD24⁺CD44⁺ 細胞および Side Population (SP) 細胞の割合が阻害剤単独に比して有意に減少する。これらの結果は HSP90α, GRP78 による腫瘍形質維持に PRDM14 が深くかかわることを示す。



論文著者インタビュー



東京大学 医科学研究所
抗体・ワクチンセンター
谷口 博昭 先生

生細胞アッセイの重要性

蛋白質相互作用の各種パラメータは非細胞系アッセイで詳細に得ることが可能です。それと同時に蛋白質相互作用が実際に生細胞内で生じることの実証が「蛋白質機能の同定」、「創薬開発」においては前提です。プロメガの NanoBRET® 法は初心者でも比較的簡便な手法であり、また、発光を用いるため非常に鋭敏なシグナルが得られるので、蛋白質相互作用の生細胞アッセイには適しています。

今後の展望

NanoBRET® 法は、従前の細胞死を指標とした系ではなく、「生細胞」での蛋白質相互作用を指標とした無・低毒性の新規薬剤のスクリーニングの基盤となる可能性を秘めております。今後、NanoBRET® 法による評価系の最適化やハイスループット化を前提に、低分子化合物ライブラリーとの組み合わせを検討しています。この系を実現するための、製薬企業、大学のスクリーニング部門等のパートナーを募集しています。

技術解説

HaloTag®

蛍光イメージングやタンパク質精製など多様なアッセイが可能な多機能タグです。プルダウンでは従来法で得られなかった新規相互作用タンパク質候補が見つかった実績があります。

NanoBRET®

非常に明るいルシフェラーゼ NanoLuc® と HaloTag® を利用した BRET で、生細胞でのタンパク質相互作用を高感度かつ定量的に検出できる実験方法です。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HaloTag® Mammalian Pull-Down System	10 ml	N3030	26,000
NanoBRET™ PPI MCS Starter System	1 セット	N1811	180,000
NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System	1 セット	N1821	150,000

HaloTag ORF クローンや NanoLuc® ベクターへのサブクロニング受託については www.promega.co.jp/e-Service/ をご覧ください。

コンサルティング & 貸出プログラム

MAX れんたるを開始しました！



「機器がないから…」

大丈夫です、ご相談ください！

今すぐ実験計画に
MAX れんたるを入れよう！！

MAX れんたるは、プロメガのルミノメーターなどを一定期間お貸出しするプログラム（有償）で、試薬 / 機器の両面からのサポート・コンサルティングも行います。

※アプリケーションによっては機器で使用する試薬を予め購入いただく必要があります。また、本サービスのご利用には プロメガクラブ（無償）へのご入会が必要です。

こんな方におすすめ

始めてみませんか、生物発光アッセイ 生物発光を使ったアッセイ系の立ち上げをサポート

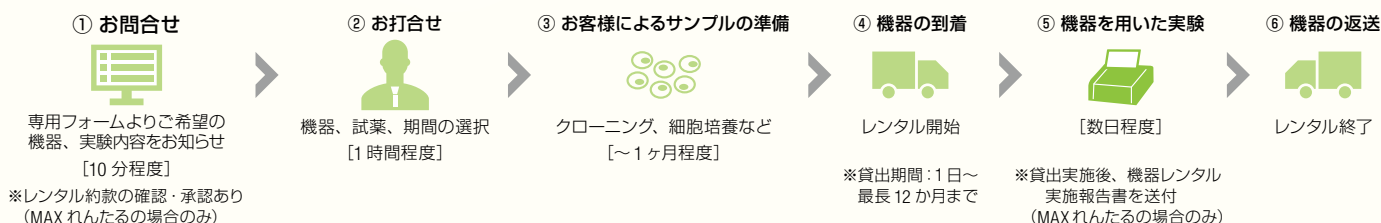
- 簡便で高感度な発光アッセイを試してみたい方に
- 発色法の細胞生存・毒性試験を行っている方に
- 蛍光の酸化ストレスアッセイを行っている方に

機能	アプリケーション
発光	レポーター & 各種アッセイ
蛍光	BRET、FRET、GFP & 各種アッセイ
吸光	ELISA、タンパク質定量
マルチプレックス フォーマット	2 項目以上を同一プレートで測定 チューブ形式 / マルチウェル (6-384) 形式

料金

ルミノメーター・マルチプレートリーダー		
マルチプレートリーダー GloMax® Discover Systems	ルミノメーター (96 ウェル) GloMax® Navigator System	ルミノメーター (シングル) GloMax® 20/20 Luminometer
日額 ¥ 23,000 (レンタル型番: E5301)	日額 ¥ 12,000 (レンタル型番: E5302)	日額 ¥ 6,000 (レンタル型番: E5303)

貸出しの流れ



MAX れんたる / RentaMAX の詳細については www.promega.co.jp/rentamax/ をご覧ください。

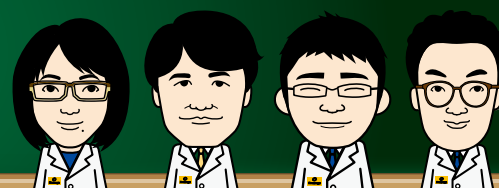
プロメガ学術部員による

訪問セミナー

弊社学術部員が皆様の研究室を訪問し、HiBiT の系構築、ゲノム編集の基礎、ルシフェラーゼ反応を応用したさまざまなアッセイ法などを解説します。セミナー内容の詳細は下記サイトまで。

www.promega.co.jp/onsite_seminar/

プロメガクラブ オンサイトセミナー



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2018年4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