

GloMax® プレートリーダーで実現できる
魅力的なアッセイをご紹介します！



Promega
KAWARABAN

2019年 春号

プレートリーダーを用いた 高次元な細胞ベースアッセイ (リアルタイム、マルチアッセイ & BRET)

・リアルタイムアッセイ

生命現象をリアルタイムで理解しよう！：プレートリーダーでシンプルに経時的アッセイをするためのコツとテクニック 2 ページ

・マルチプレックスアッセイ

GloMax プレートリーダーでちょい足しデュアルルシフェラーゼアッセイ
(タンパク質レベル、転写活性 & 細胞生存性試験のマルチアッセイ)

4 ページ

・細胞内タンパク質間相互作用検出 (BRET アッセイ)

タンパク質間相互作用：NanoBRET™ システム構築の実際 (CRAF-BRAF 相互作用モデル)

6 ページ

・プレートリーダー 貸出サービス & オンサイトセミナー

RentaMAX & オンサイトセミナー

8 ページ

生命現象をリアルタイムで理解しよう!:

プレートリーダーでシンプルに経時的アッセイをするためのコツとテクニック

概要

- アポトーシスや転写活性、タンパク質相互作用、タンパク質存在量などをリアルタイムに測定できるアッセイ
- プレートリーダーでリアルタイムアッセイをするためのマル秘テクニック
- プロメガのプレートリーダーと様々なリアルタイムアッセイ試薬で簡単に動的なバイオロジーを解析

はじめに

同一サンプルを用いて経時的に測定するリアルタイムアッセイは、データを効率的に収集して、薬剤化合物の細胞への長期的な影響を研究するための優れた手法です。これらのアッセイは細胞を溶解せずに生きたまま測定するので、同じサンプルを用いて複数のポイントで取得することができ、最適な測定タイミングを推測で決定する必要がなくなります。さらに、処理に対する応答についても同じ細胞集団で観察することができますので、アッセイのばらつきを低減することができます。

ここでは、GloMax® Discover とプロメガのリアルタイムアッセイを使用して得られる生物学的情報についてご紹介します。また、リアルタイムアッセイを成功へ導くための重要なヒントも含まれています。

リアルタイムでの細胞の健康状態のモニタリング

リアルタイムアッセイで測定することにより、より有用なデータを引き出すことができます。処理の影響を受けているかを判断するだけでなく、処理がいつ、どの程度素早く細胞に影響を与えたかを理解することができます。

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay では、アポトーシス表現型であるアネキシン V のホスファチジルセリン (PS) への結合、ならびに膜透過性の有無によるネクローシスの両方を同じウェルで長時間にわたりモニタリングすることができます。PS に標識アネキシン V タンパク質が結合すると発光シグナルが生成され、同時にネクローシス検出試薬は蛍光シグナルを生成します。これらのシグナルの経時的な変化を観察することで、アポトーシスまたはネクローシスが誘導されたかを判断することができます (図 1)。

細胞の状態をリアルタイムでモニタリングするアッセイは細胞、プレートだけでなく研究者の貴重な時間も節約することができます。エンドポイントアッセイではタイムポイントごとに多数の平行プレートが必要になりますが、リアルタイムアッセイはたった 1 枚のプレートのみで十分です。図 2 に示すように、7 枚のプレートを消費してカスパーゼ活性化を測定するエンドポイントアッセイ、RealTime-Glo™ Annexin V Assay では 1 枚のプレートだけでモニタリングすることができます。リアルタイムアッセイにより、1 ウェルあたりのデータ量が増え、生命現象をより深く理解できることを示しています。

リアルタイムで発光レポーター活性のモニタリング

ルシフェラーゼレポーターアッセイは通常、細胞を溶解して行われています。一方で細胞を溶解しないリアルタイムでのレポーター活性のモニタリングは、多種多様な細胞応答のダイナミクスをよりよく理解するためのオプションとなります。

NanoLuc® ルシフェラーゼは小さく、高感度な発光レポーター酵素であり、その基質は膜透過性を示します (NanoLuc® の詳細はかわら版 2016 年夏号および秋号をご覧ください)。生細胞アッセイに至適化された Nano-Glo® Live Cell Assay System は 2 時間までの実験において非常に明るいシグナルと広範なダイナミックレンジを示します。Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell Substrate と Nano-Glo® Vivazine™ Live Cell Substrate はプロメガの技術を用いて開発された新規基質であり、数日にわたる実験を可能にします。(図 3)。これらの基質により、研究者が求める様々な実験に対応することが可能となっています。

タンパク質不安定化ドメインが付加された NlucP レポーター (NanoLuc®-PEST) は、細胞内での半減期が短いレポーターであり、化合物処理後に

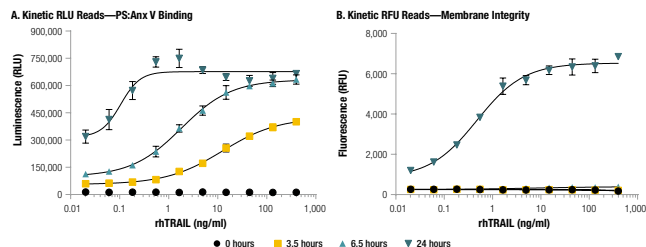


図 1. ホスファチジルセリン (PS: Anx) へのアネキシン V の結合と細胞膜完全性の消失のリアルタイムアッセイ

U937 細胞を、連続希釈した rhTRAIL および RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay Reagent の存在下、37°C /5% CO₂ でインキュベートした。バックグラウンドを差し引いた発光、RLU (ホスファチジルセリンへのアネキシン V の結合、パネル A) およびバックグラウンドを差し引いた蛍光、RFU (細胞膜の完全性、パネル B) を GloMax® Discover で 0、3.5、6.5、および 24 時間後に測定した。時間依存的な発光の増加 (ホスファチジルセリンへのアネキシン V の結合、パネル A) が時間依存的な蛍光の増加 (細胞膜完全性の消失、パネル B) よりも先に起こったことはアポトーシスに続き 2 次ネクローシスが起っていることを反映している。

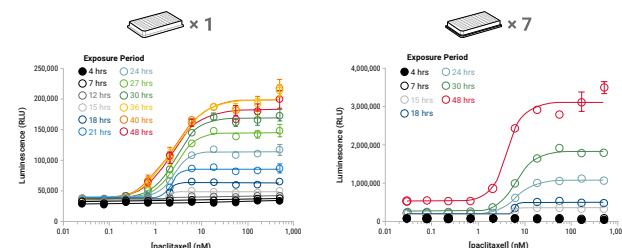


図 2. リアルタイムアッセイとエンドポイントアッセイによる経時的測定

左パネル (リアルタイムアッセイ): 各用量についてのデータは、RealTime-Glo® Annexin V Apoptosis Assay 試薬を 1 回添加した単一のアッセイプレートを用いて複数の時点で取得した。右パネル (エンドポイントアッセイ): エンドポイントアッセイを用いて 7 つの別々のプレートを用いて平行データを取得した。

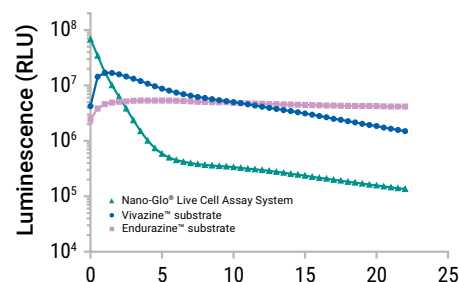


図 3. Nano-Glo® Endurazine™, Nano-Glo® Vivazine™ Substrates および Nano-Glo® Live Cell Assay System の発光特性

HEK293 細胞に PGK プロモーターより NanoLuc® ルシフェラーゼを発現するプラスミドをトランジェントにトランスフェクションし、表示時間に発光シグナル強度を測定した。

起こる転写反応の変化をダイナミックに測定することができます。図 4 では、cAMP 応答配列 (CRE) を有する NlucP および Nano-Glo® Vivazine™ Substrate を用いて、フォルスコリンによる細胞内 cAMP の増加に続く転写活性化の用量依存的なタイムコース実験に使用できたことを示しています。転写の動態の変化は 10 時間にわたり観察することができました。

Nano-Glo® Live Cell Substrate は、タンパク質の動態タンパク質のリアルタイムな定量を可能にする NanoBiT® レポーターテクノロジーでも使用することができます。図 5 では Nano-Glo® Endurazine™ および Vivazine™

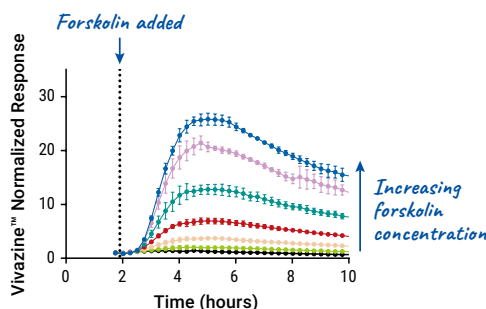


図 4. cAMP 応答配列 (CRE) プロモーターを有する NlucP 発現コンストラクトをトランジェントにトランスフェクションした HEK293 細胞

Vivazine™ substrate を 0 時間に添加し、GloMax® Discover、37℃で連続的に発光を測定した。約 2 時間後に様々な濃度のフォルスコリンを添加し、細胞内 cAMP 濃度上昇による NlucP の発現を誘導した。グラフはウェルごとに補正された 10 時間にわたるデータ。この基質により cAMP レベル増加に応じた CRE レポーター活性の用量依存的な上昇を検出した。

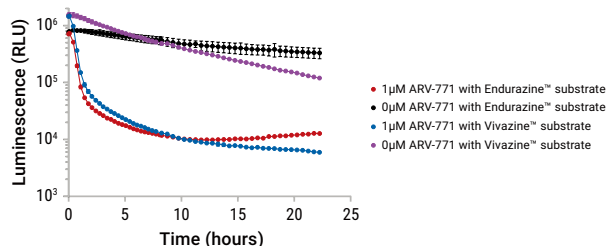


図 5. 内因性 BRD4 レベルの動的モニタリング

LgBiT を安定に発現する HEK293 細胞を CRISPR-Cas9 で編集し、内在性の BRD4 ローカスで HiBiT-BRD4 融合タンパク質を発現する細胞を作成した。ARV-771 (BRD4 標的デグレイドー [PROTAC]) による処理の後に Endurazine™ および Vivazine™ で HiBiT-BRD4 融合タンパク質の発現レベルをモニタリングした。

Substrate を用いて、LgBiT 発現細胞内での HiBiT タグタンパク質の発現レベルをリアルタイムにモニタリングしています (HiBiT の詳細はかわら版 2017 秋号をご覧ください)。内在的な発現条件でモニタリングするために図 5 の実験ではゲノム編集技術により HiBiT タグを BRD4 ローカスの N 末端へ導入しました。BRD4 を標的として分解する化合物 ARV771 を処理し、BRD4 タンパク質量の変化を発光シグナルにて定量しました。高感度な HiBiT タグを活用することで、BRD4 タンパク質量のリアルタイムな追跡が可能となることを示しています。

リアルタイム生細胞アッセイのキーポイント

これまでに示した結果はどれもエキサイティングですが、リアルタイムの生細胞アッセイを実施する上にはいくつかの検討事項があります。多くの研究者は、実験用培養プレートに CO₂ ガス、湿度および温度制御されたインキュベーターに保存し、測定する時間にプレートをプレートリーダーに移します。これは最も経済的なアプローチですが、課題があります。手でプレートを移動させる場合、測定前にプレートのふたを取り外すことによって効率よくシグナルを得ることができますが、インキュベーターからプレートを取り出す時間が長いほど、結果のばらつきが大きくなります。また、プレートの蓋を外した際の微生物による汚染を懸念する研究者もいます。

これらの懸念を克服するためのアプローチの 1 つは、CO₂ ガスと温度を制御できるプレートリーダーを使用することです。この場合、環境条件を気にすることなく簡単に測定できますが、湿度は制御されないため 2 つの問題を引き起こします。まず、外側ウェルでの蒸発が起こりえるため、96 ウェルプレートの内側 60 ウェル程度しか使えずスループットを制限してしまいます。第二に、湿度管理のために蓋をして測定すると、ウェル間クロストークが増大し、感度も低下します。また、実験を通して結露が蓋に付着することもあり、アッセイの測定値に悪影響を及ぼします。

シンプルに対処できる方法として、光学的に透明でガス透過性を有するプレートシールを使用する方法が挙げられます。これらのシールを用いれば、プレートの蓋を通さず測定できるためウェル間のクロストークが抑えられ、しかもシールにより周囲の環境から各ウェルを防護することができます (図 6)。さらに、pH 変化に耐性があり、細胞を生存維持させる CO₂ 非依存性培地の使用も有用です。CO₂ 非依存性培地を使用す

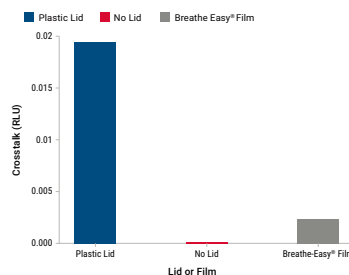


図 6. 蓋とシールを用いた際のクロストーク

Coring plates (Cat.# 3917) に付属するプラスチック製の蓋は、ブリーズイージー (株式会社 TOHO, 注文コード 0765050) あるいは蓋なしに比べ非常に高いクロストークを示した。Breathe-Easy® Film は蓋なしに比べるとわずかなクロストークが認められた。

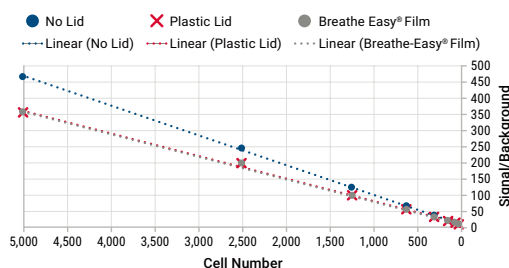


図 7. GloMax® Discover で、37℃で 24 時間、CO₂ 非依存培地で連続希釈した K562 細胞の細胞数にともなう シグナル / バックグラウンド

5,000 細胞 / ウェルを 20 細胞 / ウェルまで 2 倍希釈で調整した。同様のシグナル / バックグラウンドレベルおよび感度が、ブリーズイージー (株式会社 TOHO, 注文コード 0765050) および 96 ウェルプラスチック蓋の両方について観察された。

ることで、短時間であればアッセイの変動を心配せずに手でプレートをインキュベーターから出し入れしたり、環境制御機能の無いプレートリーダーでも使用することもできます (図 7)。

結論

プロメガは GloMax® を始めとするプレートリーディングルミノメーターだけで実施できるリアルタイム生細胞分析を、動的に変化するバイオロジーを簡単かつ経済的に調べる新たな手段として研究者に提供しています。

	サイズ	カタログ 番号	価格 (¥)	特別価格 * (¥)
リアルタイム (生細胞) アポトーシスアッセイ				
RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis Assay	100 回分	JA1000	68,000 ➡	47,600
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	100 回分	JA1011	80,000 ➡	56,000
リアルタイム (生細胞) 細胞生存試験				
RealTime-Glo MT Cell Viability Assay	100 回分	G9711	21,000 ➡	14,700
NanoLuc® リアルタイム (生細胞) アッセイ				
Nano-Glo® Live Cell Assay System	100 回分	N2011	28,000 ➡	19,600
Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell Substrate	0.1 ml	N2570	30,000 ➡	21,000
Nano-Glo® Vivazine™ Live Cell Substrate	0.1 ml	N2580	30,000 ➡	21,000
Nano-Glo® Extended Live Cell Substrate Trial Pack	0.2 ml	N2590	38,000 ➡	26,600

* N2590 には N2570 と N2580 のセット品です。

*2019 年 8 月 23 日受注分まで

リアルタイムアッセイに最適なプレートフィルムをプレゼント!

上記のリアルタイムアッセイ製品ご注文先着 100 名様に、ブリーズイージーフィルム (注文コード 0765050) サンプル 5 枚セットをプレゼントいたします。ブリーズイージーフィルムは酸素や CO₂ のガス交換が可能なフィルムです (材質: ポリウレタン、UV 透過性: ~30 nm)

TOHO

日本総販売元: 株式会社トーホー

TEL: 03-3654-6611

URL: www.j-toho-kk.co.jp



GloMax プレートリーダーでちょい足しデュアルルシフェラーゼアッセイ (タンパク質レベル、転写活性 & 細胞生存性試験のマルチアッセイ)

概要

- 簡便なタンパク質レベル、転写活性、細胞生存性のマルチアッセイ
- デュアルルシフェラーゼアッセイの新しい利用法
- GloMax® Discover のデュアル自動インジェクターによりマルチアッセイを効率化

はじめに

デュアルレポーターアッセイは、同じ細胞サンプル中に発現する複数のレポーター酵素またはレポーター融合タンパク質を測定することにより細胞内の有用な情報を簡便にモニタリングすることができます。一般的なデュアルレポーターアッセイの実験フォーマットでは、片方のルシフェラーゼを転写活性に応じて発現する実験レポーターとして使用し、もう片方は恒常的プロモーターを用いた内部コントロールとして実験データを補正することによりデータの質を向上させます。Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter (NanoDLR™) Assay System は、シンプルなプロトコル (添加→測定→添加→測定) で同じサンプルに含まれる NanoLuc® ルシフェラーゼ (Nluc) およびホタルルシフェラーゼ (Fluc) を高感度に連続して測定することができます。従来のホタルとウミシイタケルシフェラーゼによるデュアルアッセイシステムに比べ、第一レポーター (ホタル) の消光効果の向上と第二レポーター (NanoLuc®) の高い発光レベル (図 1) により NanoDLR™ はより高感度で正確な測定が可能となり、2 つのルシフェラーゼを実験レポーターとして使用するアプリケーションへの応用が広がりました (標的タンパク質存在量 [NanoLuc®] + 転写応答または 2 つの転写応答)。この場合、第 3 の細胞情報として細胞生存マーカーを測定することはレポーターアッセイに細胞の健全性に関する情報を加えることができるため、化合物の毒性によるレポーター活性の低下などを考慮にいたった正確な分析が可能になります。

デュアルレポーターによるタンパク質量および転写活性の測定

本稿では、同じウェルで 2 つの実験レポーターと細胞生存性を組合わせたマルチアッセイについてご紹介いたします。発光強度の高い NanoLuc® ルシフェラーゼであれば、調節タンパク質などシグナル経路上流のタンパク質に融合させてタンパク質の存在量を測定することができ、これとホタルルシフェラーゼをレポーターとした転写活性測定を組合わせたデュアルルシフェラーゼアッセイを行うことができます。細胞のストレス応答では、重要な調節タンパク質の安定性の変化、それに続く下流の転写調節をとまいません。多くの応答経路では、重要な転写因子の濃度および局在性は厳密に制御されています (表 1)。例えば、基底条件下での低酸素誘導因子-1A (HIF1A) はユビキチンを介した分解によって低レベルに保たれています。低酸素条件下になると、ユビキチン化は大幅に抑制され、核内で HIF1A が蓄積されるため、さまざまな遺伝子の転写が活性されます。NanoLuc® ルシフェラーゼの小ささと明るい光はタンパク質レベルの変化を測定するための融合パートナーとして理想的です。NanoLuc® アッセイが高感度であることは、タンパク質の発現量が低く、より生理的なレベルでも測定でき、生物学的関連性の高い結果が得られることを意味します。さらに、化合物に対する毒性プロファイリングを得るために細胞ストレスに応答する 2 つの応答配列 HSE (熱ショック) と ARE (酸化ストレス) による転写活性の変化についても実験をおこないました。

細胞生存試験の追加

NanoDLR™ 発光測定はさらに CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay を用いた蛍光法による細胞生存性試験とのマルチアッセイを行うことができ、1 つのサンプルからより完全な細胞応答プロファイルを得ることができます。このアッセイでは生細胞に由来する生プロテアーゼ活性により基質が蛍光産物に変換され、これが生細胞の数に比例します。このアッセイは細胞溶解剤を含む NanoDLR™ 試薬を添加する直前に行います。GloMax® Discover はマルチプレックスアッセイおよびインジェクターベースのプロトコルを簡略化し、タイムコース実験を簡便に行うことができます。

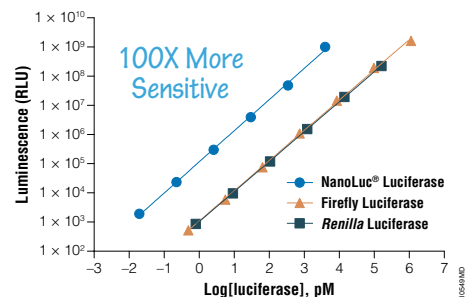


図 1. 各ルシフェラーゼの発光レベルの比較

NanoLuc® はホタルまたはウミシイタケルシフェラーゼよりも約 100 倍の発光レベルを示す。

表 1. パスウェイ活性化に応じて変化する主要なシグナル調節タンパク質の細胞内寿命

標的タンパク質	T _{1/2} 通常時 (分)	T _{1/2} 誘導時 (分)	誘導因子
HIF1 α	50	200-250	低酸素
I κ B α	100	5	TNF αおよびその他の炎症性サイトカイン
p53	20	300-400	遺伝毒性ストレス (UV/ 化株物質による DNA ダメージ, 他)
Nrf2	10-15	30-40	酸化ストレス
β - カデニン	<60	>200	Wnt
FOXO	>300	<60	成長因子
PDCD4	300	<60	インシュリン/PI3K
c-Jun	<60	>200	ストレス
c-Myc	20	300-400	ストレス
c/EBP	<60	>300	LiCl

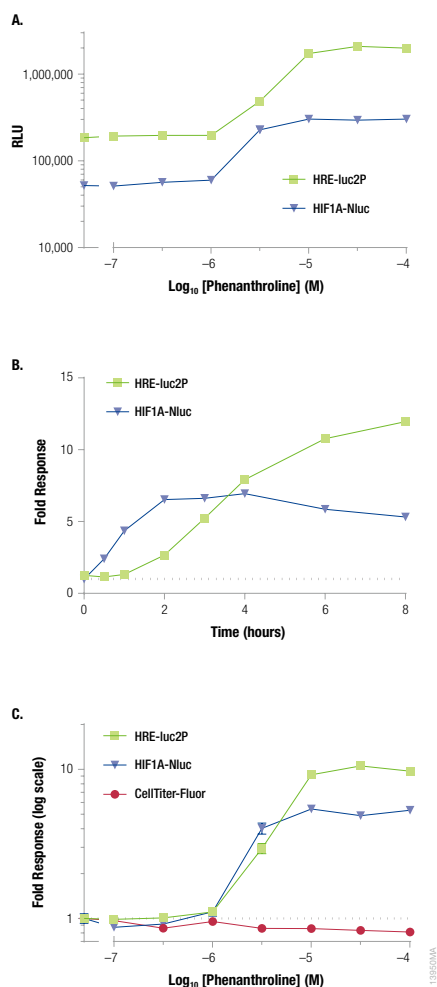


図 2. HEK293 細胞のフェナントロリンによる処理後の用量反応とタイムコース
 パネル A: 単一の時点における用量反応では、フェナントロリン濃度依存的な HIF1A-Nluc 融合タンパク質の蓄積およびレポーター遺伝子 luc2P によって測定される低酸素応答の活性化が示された。パネル B: 100 μ M フェナントロリンの添加後の経時的なレポーター測定値を未処理細胞と比較した発光の倍率変化としてプロットした。タイムコース実験では、HIF1A の蓄積とそれに続く核内転写活性化との間に生じる遅れが明示されている。パネル C: 細胞を CellTiter-Fluor™ 試薬とともにインキュベートし、NanoDLR™ アッセイを行う前に蛍光を測定することにより、NanoDLR™ に細胞生存率測定を追加したマルチプレックスアッセイを実施した。この時点での CellTiter-Fluor™ 測定では高濃度のフェナントロリンで若干の毒性を示した。エラーバーは 6 回反復実験の SEM を表す。

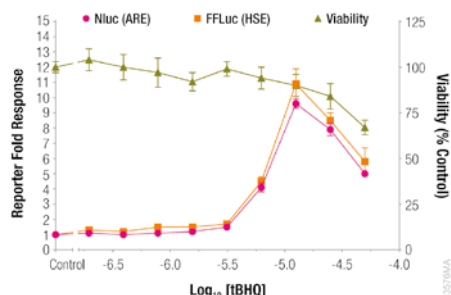


図 3. 同一サンプルより得られた細胞生存性、抗酸化応答性 (ARE) および熱ショック
 応答性 (HSE) の測定
 HepG2 に pNL [NlucP/ARE/Hygro] および pGL4.41 [luc2P/HSE] をトランスフェクションし、tBHQ で処理した。O/N インキュベーションした後、CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay で細胞生存性を測定した後、さらに HSE および ARE 応答性を NanoDLR™ Assay で測定した。

結論

ストレス応答経路の多くの転写因子は分解によりその活性が制御されており、下流の転写活性とともに同じシグナル経路上のパスウェイポイントを調べることは生物学的理解を深めます。また、化合物による毒性プロファイリングを調べるために 2 種類のストレス応答を分析することは化合物の毒性スクリーニングなどに有用です。Nano-Glo® Dual Luciferase Reporter (NanoDLR™) Assay を使用して、NanoLuc® 融合タンパク質によるタンパク質蓄積と luc2P レポーター遺伝子上流の制御プロモーター上の転写因子活性の組み合わせまたは 2 種類の制御プロモーターを用いたデュアルシフェラーゼアッセイを行いました。フェナントロリン処理後のタイムコース実験では、HIF1A 転写因子の蓄積と下流の転写活性化との間にタイムラグが生じていることが示されました。また、tBHQ 添加によるストレス分析ではヒートショック (HSE) および抗酸化 (ARE) 応答配列を強く活性化しました。

さらに、NanoDLR™ で両方のレポーターを実験レポーターとして使用する場合に、テスト化合物によって引き起こされる毒性モニタリングに細胞生存性試験を追加することは有用で、発光アッセイと CellTiter-Fluor™ Assay の蛍光アッセイをマルチプレックス化することで実現できます。GloMax® のデュアルインジェクターを使用することで、試薬の追加と測定を自動化できます。図 2 のように化合物の用量反応をアッセイする場合、タイムポイントごとにインキュベーターからプレートを取り出してルミノメーターにセットする、といったアッセイフォーマットを飛躍的に単純化できます。2 つの実験レポーターと細胞生存性を組み合わせたマルチプレックスアッセイは 1 つのサンプルより得られる情報量を飛躍的に増加させます (図 3)。

製品名	サイズ	カタログ 番号	価格(¥)	特別価格 + (¥)
デュアルアッセイ試薬 + コントロールベクター				
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pNL 1.1.TK Bundle	1 セット	N1521	80,000	56,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pNL1.1 PGK Bundl	1 セット	N1531	80,000	56,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pGL4.54 luc2/TK	1 セット	N1541	80,000	56,000
Nano-Glo® Dual-Luciferase®/pGL4.53 [luc2/PGK] Bundle	1 セット	N1551	80,000	56,000
デュアルアッセイ試薬				
Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay	10 ml	N1610	40,000	28,000
細胞生存試験				
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10 ml	G6080	17,500	12,250
トランスフェクション				
FuGENE® HD Transfection Reagent	1 ml	E2311	65,000	45,500
ViaFect™ Transfection Reagent	0.75 ml	E4981	60,000	42,000
レポーターベクター				
pGL4.42 [luc2P/HRE/Hygro] Vector	20 μ g	E4001	73,000	51,100
pNL1-HIF1a [CMV/neo] Vector System	20 μ g	N1381	73,000	51,100
pGL4.41 [luc2P/HSE/Hygro] Vector	20 μ g	E3751	73,000	51,100

*2019 年 8 月 23 日受注分まで

上記以外のルシフェラーゼ
 レポーターベクターについては
 こちらの選択ガイドを
 ご覧ください。



レポーター実験を始めたい方は
 “なにになーに” が超おすすめ!

www.promega.co.jp/naninani/

- ・レポーターアッセイってなにになーに?
- ・トランスフェクションってなにになーに?
- ・細胞認証ってなにになーに?
- ・細胞生存性アッセイってなにになーに?
- ・NanoLuc ってなにになーに?

最新号 ルミノメーターってなにになーに?



タンパク質間相互作用：NanoBRET™ システム構築の実際 (CRAF-BRAF 相互作用モデル)

概要

- がんに関与する CRAF および BRAF の NanoBRET™ タンパク質相互作用アッセイを構築
- タグの配置をはじめとする最適化の重要性
- 同じコンストラクトで細胞内 BRET に加えプルダウン発光検出も可能

はじめに

BRAF および CRAF のヘテロ二量体化は、Ras-Raf-MAPK 経路の活性化およびシグナル伝達をもたらし、発癌性に関わることから癌分野で広く研究されてきました。特異的な BRAF 変異は、下流の MEK/ERK シグナル伝達の恒常的な活性化を引き起こすため、二量体化に影響を及ぼす BRAF 阻害剤は癌治療に向けた臨床的関連性が示されています。細胞ベースの RAF キナーゼの 2 量体化アッセイは、GDC-0879 などの化合物の作用機序を理解することやこの相互作用を調節する化合物の同定に有用なツールになると考えられます。

細胞ベースのタンパク質相互作用研究のためのアプローチの 1 つとして生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) 法は極めて有用です。NanoBRET™ PPI アッセイでは BRET エネルギードナーとして NanoLuc® ルシフェラーゼを、蛍光 HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand (カタログ番号 G9801) で標識した HaloTag® タンパク質をエネルギーアクセプターとして生細胞におけるタンパク質相互作用を測定します。明るく青色シフトした NanoLuc® ドナーシグナルと赤色シフトした HaloTag® アクセプターシグナルは、スペクトルの重複を最小限に抑えた最適化されたペアとして、従来の BRET アッセイに比べて高いシグナル/バックグラウンド比を示します。目的のタンパク質は NanoLuc® ドナーまたは HaloTag® アクセプターでそれぞれ N 末端、C 末端の組み合わせでタグ付けを行い、最良の組み合わせ (4 種のバリエーションと 8 種類のドナー/アクセプターの組み合わせ) を見つけることにより最高のアッセイ性能が引き出されます。(8 クローンセット作成受託については次ページ参照)

ここでは、CRAF と BRAF タンパク質の相互作用をモニターする NanoBRET™ PPI アッセイの構築について説明します。GDC-0879 の存在下および非存在下で、可能性のあるすべてのドナー/アクセプターの組み合わせを体系的にスクリーニングしました。また、トランスフェクションにおけるドナーとアクセプターベクターの比率を最適化し、HaloTag® プルダウンアッセイを用いて相互作用を検証しました。今回、2 つの細胞株、ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) と KRAS 遺伝子に変異があり、癌モデルとして阻害剤研究にも使われるヒト結腸がん細胞 (HCT116) で相互作用アッセイをテストしました。

タグ配置の最適化

CRAF-BRAF タンパク質相互作用について BRET ドナーおよびアクセプターの最適な組み合わせを決定するために、8 つのプラスミドの組み合わせを HCT116 細胞および HEK293 細胞でテストしました。タグの配置および実験方法は、NanoBRET™ Protein-Protein Interaction のマニュアル (TM439) に従いました。FuGENE® HD トランスフェクション試薬 (カタログ番号 E2311) を用いて HCT116 および HEK293 細胞へ 1:10 (1 µg:10 µg) のドナー/アクセプター比でベクターをコトランスフェクトしました。

HaloTag® NanoBRET 618 Ligand を含む、または含まない条件 (コントロール) で 96 ウェルプレートに細胞を播種しました。CRAF-BRAF 相互作用を誘導するために、細胞のサブセットを GDC-0879 10 µM で 2 時間処理しました。NanoBRET™ NanoGlo® 基質 (カタログ番号 N1571) を添加し、処理細胞および未処理細胞の両方についてドナーおよびアクセプターシグナルを GloMax® Discover (カタログ番号 GM3000) で測定しました。最良のアッセイウィンドウを得るために、NanoBRET™ シグナルを HaloTag® NanoBRET 618 Ligand を未添加のウェルに対して標準化しました。シグナルの倍率変化を処理細胞と未処理細胞との間で決定して、理想的なタグ配置を決定しました。

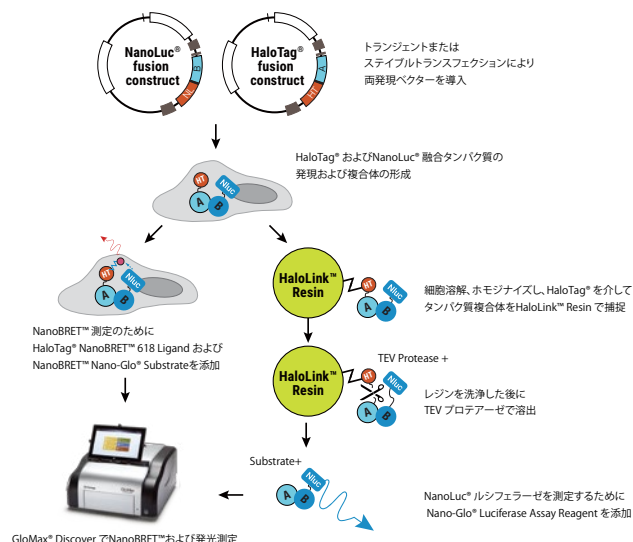


図 1. NanoBRET™ および HaloTag® Mammalian Pull-down System 変法の概要

HaloTag® および NanoLuc® 融合コンストラクトを細胞にコトランスフェクションし、細胞を溶解。HaloTag® 融合タンパク質は HaloLink™ Resin 上に固定され、TEV プロテアーゼで切断して溶出。共精製された NanoLuc® ルシフェラーゼタンパク質を定量

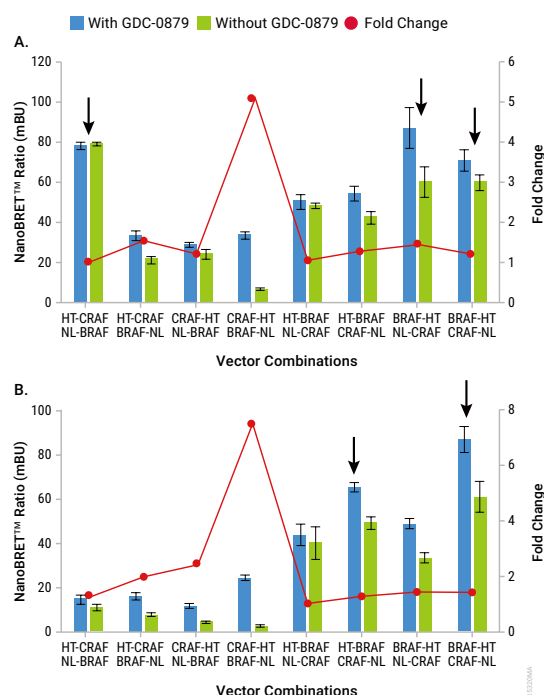


図 2. タグ配置の最適化

8 つのプラスミドの組み合わせから NanoBRET™ 比率と倍率変化を求めた。CRAF または BRAF の N 末端または C 末端に NanoLuc® (NL) または HaloTag® (HT) を融合させた HCT116 (パネル A) または HEK293 (パネル B) にドナー/アクセプター DNA 比 1:10 でコトランスフェクションし、GDC-0879 化合物 10 µM 有無で処理した。

トランスフェクションの最適化

BRAF-NanoLuc[®] および CRAF-HaloTag[®] ベクターをドナー / アクセプター比 1:1、1:10、1:100 および 1:1,000 で HCT116 および HEK293 細胞にコトランスフェクトしました。タグ配置の最適化において、GDC-0879 処理 (10 μ M) または未処理のサンプルを GloMax[®] Discover で測定しました。各ベクター比について処理または未処理サンプル間の倍率変化を算出しました。

GDC-0879 用量反応曲線

CRAF-BRAF 相互作用の誘導を測定するために、CRAF-HaloTag[®] および BRAF-NanoLuc[®] ベクターを HCT116 および HEK293 細胞にコトランスフェクションし、GDC-0879 化合物で処理して用量反応曲線を作成しました。細胞をドナー / アクセプター比 1:1 または 1:10 でコトランスフェクションし、細胞を 0.001 μ M ~ 10 μ M の濃度幅の GDC-0879 化合物で 2 時間処理しました。NanoBRET[™] の測定およびシグナルの補正は前述と同様に行いました。

HaloTag[®] プルダウンアッセイ

CRAF、BRAF タンパク質相互作用を検証するために、HaloTag[®] Mammalian Pull-Down assay (カタログ番号 G6509) (図 1) の変法を用いた後に、生物発光で検出しました (Steffen and Méndez-Johnson 2019, tpub_206)。HCT116 細胞に選択された HaloTag[®] および NanoLuc[®] 融合ベクターをドナー / アクセプター比 1:1 でコトランスフェクションし、細胞を濃度 0、1 μ M または 10 μ M の GDC-0879 で処理しました。HaloTag[®] 融合タンパク質を含む細胞溶解液を HaloLink[™] Resin (カタログ番号 G1912) とともにインキュベーションした後、ProTEV Plus (カタログ番号 V6101) で消化しました。共精製された NanoLuc[®] 融合タンパク質のシグナルを Nano-Glo[®] Luciferase Assay (カタログ番号 N1110) を用いて検出しました。

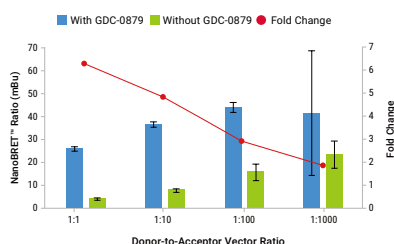


図 3. ベクター比率の最適化

NanoBRET[™] 比率と倍率変化は CRAF-HaloTag[®] と BRAF-NanoLuc[®] プラスミドを比率を変えて (ドナー / アクセプター比: 1, 1:10, 1:100 または 1:1,000) HCT116 にコトランスフェクションした [10 μ M GDC-0879 処理 (+/-)] (n = 4)。

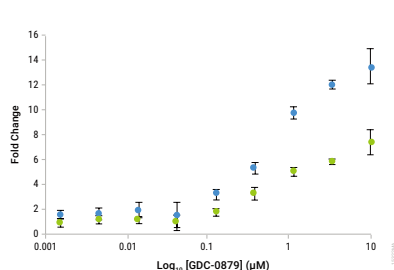


図 4. GDC-0879 用量反応曲線

様々な濃度の GDC-0879 化合物で NanoBRET[™] CRAF-BRAF 相互作用シグナルの倍率変化を示す。HCT116 細胞ヘドナー / アクセプターを DNA 比率 1:1 または 1:10 でコトランスフェクションし、表示濃度の GDC-0879 で処理した (n = 4)。

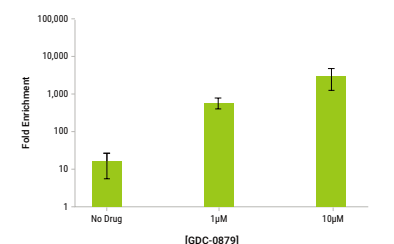


図 5. BRAF-NL の HaloTag[®] プルダウン

0、1 μ M または 10 μ M GDC-0879 の存在下で CRAF-HT および BRAF-NL を共発現する HCT116 細胞での NanoLuc[®] ルシフェラーゼ活性の濃縮倍率 (n = 3)。

結果

GDC-0879 阻害剤存在下で HCT116 および HEK293 でそれぞれ 8 種類のベクターの組み合わせをテストした結果、最高の NanoBRET[™] シグナルが得られた組み合わせは細胞種により異なり、図 2 で矢印により示しました。しかし、阻害剤の処理の有無で最大の倍率変化を示したベクターの組み合わせは、最も高いシグナルが得られた組み合わせとは異なるという点は重要です。特異的な CRAF-BRAF 相互作用は化合物で処理した場合に起こるため、基底レベルが最も低い NanoLuc[®] と HaloTag[®] 融合体の

組み合わせである CRAF-HaloTag (CRAF-HT C 末端融合体) と BRAF-NanoLuc (BRAF-NL C 末端融合体) が化合物処理により最大の倍率変化と最良のアッセイウィンドウを示しました。このため以降の実験では CRAF-HT および BRAF-NL の組み合わせを使用しました。

未結合のドナー量を最小限に抑え、NanoBRET[™] シグナルのダイナミックレンジを最大にするために、コトランスフェクションするドナーとアクセプターベクター比率を最適化しました。細胞の一部は GDC-0879 で相互作用を誘導しました。最大の倍率変化が得られたドナー / アクセプター比は 1:1 でした (図 3)。

CRAF と BRAF のヘテロ二量体化における GDC-0879 の影響を調べるために、様々な濃度の化合物で NanoBRET[™] 実験を行いました。図 4 ではベクター比 1:1 および 1:10 での用量反応曲線を示しています。先の実験と同様に最大のダイナミックレンジはベクター比 1:1 で得られ、同様の反応が両細胞株で観察されました。これらのデータは、最も効率的な NanoBRET[™] アッセイを行うためにはタグの位置とベクター比の両方を最適化する必要があることを示していました。さらに、最適化された NanoBRET[™] PPI Assay は、化合物モジュレーターに対して反応するタンパク質相互作用を高感度に検出できる方法であることを示しました。

最後に CRAF-BRAF の相互作用を確認するために、HaloTag[®] および NanoLuc[®] タンパク質ならではの利点を利用して、HaloTag[®] Mammalian Pull-Down の変法および NanoLuc[®] 融合体の検出を行いました。HCT116 細胞は二量体化を促進させるために様々な濃度の阻害剤で処理しました。タンパク質をプルダウンし、切断した後、Nano-Glo[®] Luciferase Assay を用いて CRAF-HT とともに共精製された BRAF-NL を検出しました。ルシフェラーゼのシグナルは HaloTag[®] コントロールベクターと比較しました。GDC-0879 を添加しない場合 HaloTag[®] ベクターコントロールと比べ約 10 倍の BRAF が観察されました (図 5)。GDC-0879 濃度の増加とともに、BRAF の濃縮倍率も上昇しました。これらのデータは、NanoBRET[™] アッセイで測定されたエネルギー転移の結果が BRAF-NL および CRAF-HT 融合タンパク質間の物理的な相互作用によるものであることを裏付けました。

まとめ

CRAF-BRAF 相互作用を用いて構築された NanoBRET[™] タンパク質間相互作用アッセイを紹介しました。誘導剤や阻害剤の存在下で、タグの位置やベクターのコトランスフェクション比率の受容性を示しました。同じ融合体セット CRAF-HT と BRAF-NL が HCT116 と HEK293 の両細胞で最も高い倍率変化を示していたことは特筆すべき結果でした。さらに、GDC-0879 用量依存的にヘテロ二量体化が促進されることを示しました。NanoBRET[™] テクノロジーのもう 1 つのユニークな特長は、HaloTag[®] および NanoLuc[®] が高い応用性を有しており、CRAF-BRAF のエネルギー転移が 2 つのタンパク質間の物理的な相互作用によるものであることを検証するために HaloTag[®] プルダウンの変法および NanoLuc[®] 定量法を利用できることです。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)	特別価格 * (¥)
NanoBRET[™] 検出試薬 + 空ベクターセット				
NanoBRET [™] PPI MCS Starter System	1 セット	N1811	180,000	126,000
NanoBRET [™] PPI Flexi [®] Starter System	1 セット	N1821	150,000	105,000
NanoBRET[™] アッセイ試薬				
NanoBRET [™] Nano-Glo [®] Substrate	50 μ l	N1571	52,000	36,400
HaloTag [®] NanoBRET [™] 618 Ligand	20 μ l	G9801	55,000	38,500
プルダウン関連試薬				
HaloTag [®] Complete Pull-Down System	1 セット	G6509	175,000	122,500
HaloLink [™] Resin	5 ml (settled resin 1.25 ml)	G1912	35,000	24,500
ProTEV Plus	1000 u	V6101	24,500	17,150
Nano-Glo [®] Luciferase Assay	10 ml	N1110	24,000	16,800

*2019 年 8 月 23 日受注分まで

クローンを作製する時間が無いという方に朗報です!

NanoBRET[™] に利用できる 8 クローンの作製受託サービスも承っています。詳細については www.promega.co.jp/pdf/nanoppi_construction_kgt.pdf をご覧ください。

RentaMAX & オンサイトセミナー

RentaMAX: GloMax® プレートリーダーを無料でお貸しします!

(貸出期間はご利用になるプロメガ試薬量などにより異なります。)



GloMax® の機能紹介

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	2項目以上を同一プレートで測定
リアルタイム	カインティクス & ループ プロトコル
フォーマット	チューブ形式 / マルチウェル (6-384) 形式

詳細、お申込みについては

www.promega.co.jp/rentamax/



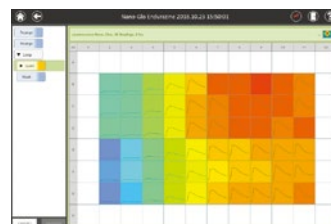
直観操作 & プリインストールされたプロトコル

GloMax は直観的な操作が可能なプレートリーダーで、多くのプロメガアッセイプロトコルがプリインストール済みなので、誰でも簡単に操作することができます。

試薬 / 機器の両面からのサポート

アッセイ法の選択、ベクターの構築・受託のご相談から機器による検出までフルサポート・コンサルティングを行います。

- 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
- レポーターアッセイを一から始めたい方に



シグナルの強さがヒートマップで一目瞭然!

RentaMAXの流れ

① お問い合わせ



専用フォームよりご希望の機器、実験内容をお知らせ
[10 分程度]

② お打合せ



機器、試薬、期間の選択
[1 時間程度]

③ お客様によるサンプルの準備



クローニング、細胞培養など
[~ 1 ヶ月程度]

④ 機器の到着



レンタル開始

⑤ 機器を用いた実験



⑥ 機器の返送



レンタル終了

オンサイトセミナー:

みなさまの研究室に向いてプロメガテクノロジー、アプリケーションに関するセミナーを行います。

もちろん無料

その他のセミナータイトル
およびお申込みについては

www.promega.co.jp/onsite_seminar/



2019 セミナーメニューからのおすすめ

- ルミノメーターだけでできる! アッセイ概論
- 高次元細胞実験~ 3 次元培養、リアルタイム解析、長時間モニタリングへの応用
- 抗体医薬品開発における発光技術の応用

全 20 種類のセミナータイトルをご用意しています。



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2019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