

NanoLuc® ルシフェラーゼってすごい

ルシフェラーゼは感度の高さからレポーター酵素で最も汎用されるようになりました。プロメガではさらに研究に有効なツールとしてより高輝度で、分子量も小さい NanoLuc® を開発しました。NanoLuc® は深海エビ (*Oplophorus gracilirostris*) 由来のルシフェラーゼで、発光レポーターとして最適なパフォーマンスを発揮するために改変された分子量の小さな発光酵素 (19 kDa) です。このルシフェラーゼはホタルやウミシイタケのものより約 100 倍以上明るく、高レベルの発光を長時間維持するための新規な基質 furimazine を用いて測定します。100 倍の明るさは 1/100 の分子数のレポーター酵素でも十分に検出でき、分子量の小ささは標的タンパク質と融合させる場合においてもその機能への影響が最小限に抑えられることを意味します。これらの特長は細胞内で起こる現象をよりありのままに、細胞・タンパク質機能への影響を最小限に抑えた実験ツールとしての可能性を秘めています。今回は活用例として、タンパク質間相互作用 (PPI) へ応用した NanoBiT® システム、および分泌型 NanoLuc® についてご紹介します。

NanoBiT® : NanoLuc® 2 分子テクノロジー

PPI は細胞内のシグナル伝達ネットワークの必須要素です。セルフリーで PPI をモニタリングする方法は数多くありますが *in vivo* の状況を必ずしも反映しているとは言えません。細胞を用いた従来の検出法では細胞を溶解することなく、また特殊な装置を使わずに定量性のある検出をすることは容易ではありませんでした。プロメガは NanoLuc® ルシフェラーゼをベースにした、2 つのサブユニットシステムで生細胞内での PPI 検出を可能にする NanoLuc® 2 分子テクノロジー (NanoBiT: NanoLuc® Binary Technology) を開発しました。Large BiT (LgBiT; 18 kDa) および Small BiT (SmBiT; 11 アミノ酸ペプチド) のサブユニットをそれぞれ標的タンパク質との融合体として発現させ、PPI が起こるとサブユニットの相補性が促進され発光酵素として明るい光を生じます (図 1)。多くのスプリット系とは対照的に LgBiT:SmBiT の相互作用は可逆的でタンパク質間の迅速な解離も検出することができます。

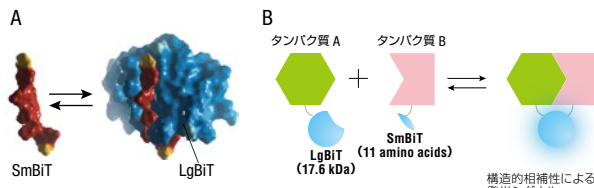


図 1. NanoBiT® の構造と再構成によるタンパク質間相互作用の測定原理

A: NanoBiT® を構成する Large BiT と Small BiT の構造。B: タンパク質 A と B にそれぞれ Large BiT と Small BiT を融合させて細胞内で発現させ、タンパク質 A と B が相互作用すると NanoBiT® が再構成されて発光を示す。

実験例として、ラパマイシン依存的に結合することが知られている 2 つのタンパク質 FKBP と FRB の相互作用を測定しました。NanoBiT® および従来型のホタルルシフェラーゼのスプリットの各サブユニットに FKBP および FRB を融合し、細胞内でラパマイシンの刺激に応答する相互作用の強さを発光測定しました。その結果、スプリットホタルルシフェラーゼに比べ、NanoBiT® の発光値はより広いレンジで結合の強さを示しました (図 2A)。ラパマイシン存在下、FKBP - FRB 結合に対する FK506 の効果をモニタリングしました (図 2B)。NanoBiT® はスプリットルシフェラーゼに比べ速やかなシグナルの低下が観察されました。このように、NanoBiT® は 2 分子の結合および分離を可逆的にかつ速やかにモニタリングできます。同じ実験はコントロールベクターセット (Cat# N2016) と検出試薬 (Cat# N2011) を用いて実施することができます。

さらに、NanoBiT® は Small BiT の 11 アミノ酸というサイズにより、融合タンパク質への活性への影響を最小限にするだけでなく、タンパク質-ペプチドの相互作用や、タンパク質や抗体用のタグとしての利用など、様々な応用アプリケーションへの可能性が秘められています。

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
NanoBiT® システム			
スターターキット (クローニングベクター、コントロール、検出試薬)			
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 システム	N2014	180,000
NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	1 システム	N2015	180,000
コントロールベクターセット			
NanoBiT® PPI Control Pair (FKBP, FRB)	1 セット	N2016	75,000
検出試薬			
	100 回分	N2011	28,000
Nano-Glo® Live Cell Assay System	1,000 回分	N2012	180,000
	10,000 回分	N2013	1,530,000

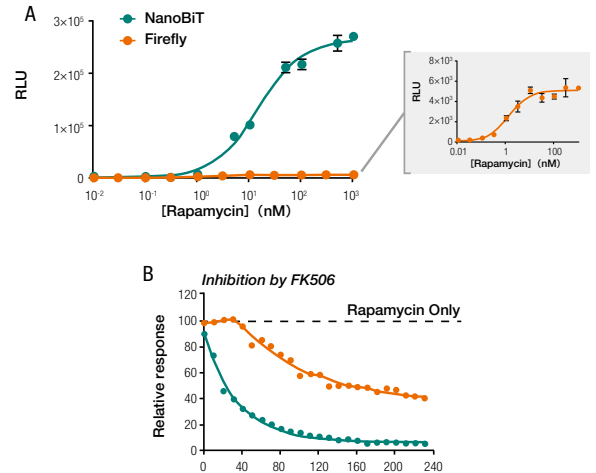


図 2. FRB:FKBP 相互作用の概要と NanoBiT® とスプリットルシフェラーゼの比較

A: NanoBiT® またはスプリットルシフェラーゼを細胞内で発現させ、ラパマイシン濃度依存的な相互作用の強さを定量化した。B: FKBP と FRB の結合を阻害する FK506 をラパマイシン存在下で添加し、添加後 (t=0) の時間と発光値の関係を示した。

分泌型 NanoLuc®

プロメガでは NanoLuc® を使用する実験の多様性を広げるため、分泌型 NanoLuc® (secNluc) もご用意しております。NanoLuc® の N 末端に分泌シグナルとして IL-6 シグナルペプチドを付加することにより、細胞外に NanoLuc® を分泌させます。secNluc は細胞外に分泌されるため、培地をサンプリングすることにより、細胞を溶解することなく、NanoLuc® の発光を測定することができます (図 3)。

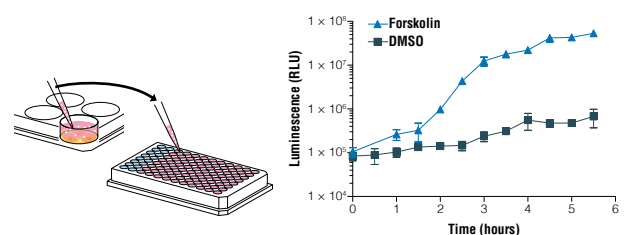


図 3. 培養上清を用いた分泌 NanoLuc® アッセイ

NanoLuc® ルシフェラーゼ (secNluc) の CRE 応答性発現を 6 時間フォルスコリン誘導あるいは DMSO コントロールの細胞で測定した。培地交換を t=0 で行った。分泌アッセイフォーマットによりレポーターの活性化カインेटクスを細胞溶解することなく測定できた。

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
NanoLuc® レポーターベクター			
分泌型 NanoLuc® レポーターベクター			
pNL1.3 [secNluc] Vector	20 µg	N1021	73,000
pNL3.3 [secNluc/minP] Vector	20 µg	N1051	73,000
pNL2.3 [secNluc/Hygro] Vector	20 µg	N1081	73,000
pNL1.3.CMV [secNluc/CMV] Vector	20 µg	N1101	73,000

◎ キャンペーン対象製品: 詳細については 8 ページをご覧ください。

今すぐ始めたいけど装置が無い? そんな時は...
www.promega.co.jp/rentamax/