

# エピジェネティック制御タンパク質の『ライブセル解析ツール』

エピジェネティック制御にかかわるタンパク質は、主に DNA やヒストンをメチル化・アセチル化修飾する「ライター」酵素、これらの修飾を除去する「イレイサー」酵素、そして DNA・ヒストンの修飾部位と結合する「リーダー」タンパク質が知られており、これらが相互作用しながらエピジェネティックな制御機構を支えています。このうち「ライター」と「イレイサー」は酵素であるため、前回ご紹介したような精製酵素アッセイや細胞を用いて活性調節化合物の探索、解析が進められてきました (HDAC 阻害剤ポリノスタット [SAHA] など)。一方、酵素ではない「リーダー」タンパク質は解析手法が少なく、特にライブセルでの解析やスクリーニングに適した方法がありませんでした。本稿ではタンパク質間相互作用を検出する最新の NanoBRET™ 法によるエピジェネティック制御タンパク質のライブセル解析ツールをご紹介します。

## エピジェネティック制御因子のライブセルタンパク質間相互作用解析

酵素活性を持たないタンパク質の解析手法として特にライブセルでのタンパク質間相互作用解析は非常に有効な手段です。研究レベルでのタンパク質間相互作用解析は FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) の系が良く使われますが、細胞自身や薬剤の自家蛍光がバックグラウンドとなり、十分な定量性が得られません (かわら版夏号 p7)。この問題を解決するために優れた定量性に定評のある発光アッセイの利点を生かして、FRET のドナーの蛍光物質をルシフェラーゼにした BRET (Bioluminescence RET) に期待が寄せられました。しかしもともと低い発光シグナルの一部のエネルギーだけが転移した BRET シグナルは更に小さく、高感度な装置でも検出が難しい系となってしまうました。

この状況を一変させたのが、プロメガの非常に明るい NanoLuc® を利用した NanoBRET™ システムです。従来の BRET で問題だったシグナルの低さは NanoLuc® によって改善され (図 1)、また細胞や薬剤のもつ蛍光の影響がなく、発光法の特長である高い定量性があります。

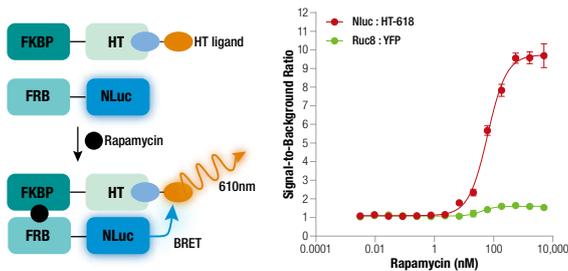
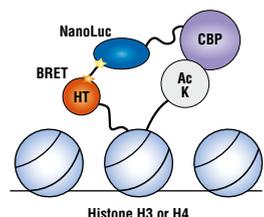


図 1. NanoBRET™ システムと従来法 BRET の比較  
ベクターを導入した細胞内で発現した NLuc 融合タンパク質 (FRB-NLuc) と低分子蛍光 618 リガンドが結合した HT (HaloTag®) 融合タンパク質 (FKBP-HT) が近接すると BRET が起こる (この系ではラパマイシンの添加により FRB: FKBP の相互作用が促進: 左図)。低分子蛍光 618 リガンドはタンパク質発現後に細胞へ添加する細胞透過性の蛍光試薬。FKBP-YFP と FRB-Rluc8 による BRET システムとのデータ比較 (右図)。

この NanoBRET™ システムを用いることにより、これまで解析が難しかった生細胞での全長タンパク質を用いたタンパク質間相互作用の解析が可能になりました。

図 2 にヒストンのアセチル化部位に結合するプロモドメインタンパク質の一つ、CBP とヒストンの NanoBRET™ アッセイ模式図を示しました。CBP は約 260kDa の巨大なタンパク質であり、従来の方法では全長 CBP とヒストンの相互作用を検出することは困難とされてきました。そのため CBP のプロモドメイン (BD) のみを使用して CBP-ヒストン結合阻害剤が探索され、SGC-CBP-30 が見つかったのですが、実はこの化合物は全長 CBP とヒストンの結合は阻害しないことが分かりました (図 3)。



生体内の CBP はもちろん全長タンパク質ですので、実際に薬として使えるかどうかはやはり全長タンパク質で評価することが重要です。また NanoBRET™ システムで新しい阻害剤を評価した論文もすでに多数報告されています。

図 2. NanoBRET™ による Histone - CBP 結合検出

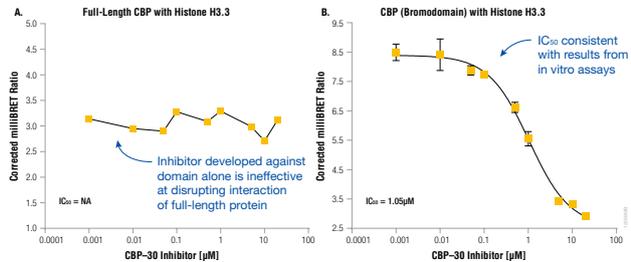


図 3. CBP の構造および全長 CBP / CBP プロモドメイン-ヒストン結合における阻害剤の効果

## エピジェネティック制御因子のライブセルにおける“化合物相互作用解析”

ところで、セルフリーアッセイで見つけた阻害剤はどのような手法で解析していますか? IC<sub>50</sub> やタンパク質との解離定数 (Kd) を測定するだけでよいのでしょうか? 近年、薬剤の有効性に標的タンパク質との結合の非平衡状態での結合-解離が影響すること、特に Residence time (滞留時間) が重要な指標となることが明らかになってきました。また、単なるタンパク質との結合・解離速度だけでなく膜透過速度やプロドラッグの場合は細胞内での代謝速度も合わせて検討する必要があり、ここでもセルフリーアッセイからライブセルアッセイへとニーズがシフトしています。ライブセルでの Residence time 測定に有用なのが、BRET を用いた細胞内蛍光標識化合物結合試験 (Target Engagement, 図 4) です。Target Engagement では BRET シグナルの増加速度によりタンパク質と化合物の解離速度が分かります。

図 4 では、HDAC1-NanoLuc® 融合タンパクを発現させた細胞にあらかじめ、SAHA、Mocetinostat、FK228 処理を行い、洗浄後に Tracer (SAHA 誘導体) を添加して BRET を測定しました。HDAC1 との解離が速ければ BRET シグナルが速く増加します。SAHA は Tracer 添加 20 分後にほぼプラトーに達しました。これは Tracer の膜透過時間と一致しており、SAHA の早い解離を示しています。一方、Mocetinostat は解離が遅いものとして報告されていますが、BRET シグナルもゆっくりと増加しています。また、プロドラッグである FK228 は、Mocetinostat よりもさらにゆっくりとした解離が観察されました。FK228 はがん細胞に対してゆっくりと長く生理活性を示すことが知られており、NanoBRET™ の結果もこの性質に一致したものとなっています。

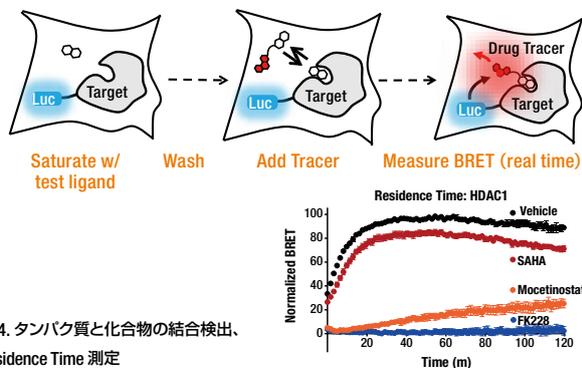


図 4. タンパク質と化合物の結合検出、Residence Time 測定

前回に続き、今回はライブセルでのアッセイに焦点を当てました。エピジェネティクス研究は発展がめざましい分野の一つであり、今後も新たなターゲットが続々と見つかることでしょう。プロメガも独自テクノロジーを生かした新たなアッセイを提供し続けます。次なる新テクノロジーをお楽しみに!

### 今ならエピジェネティクス関連タンパク質を含むペアセット

47 種を特別価格でご提供! (2016 年 12 月 22 日まで)

詳しくは [www.promega.co.jp/kawarabancamp/](http://www.promega.co.jp/kawarabancamp/) をご覧ください。

### エピジェネティクス関連キット 100 種以上!

プロメガでは 100 近いエピジェネティクス関連タンパク質ペアのアッセイが構築済みなのですぐにアッセイを始められます (QR コードよりご覧ください)。

\*関連する論文など詳細についてはお問合せください。

