

# 発光タグ HiBiT による タンパク質発現解析新時代の幕開け

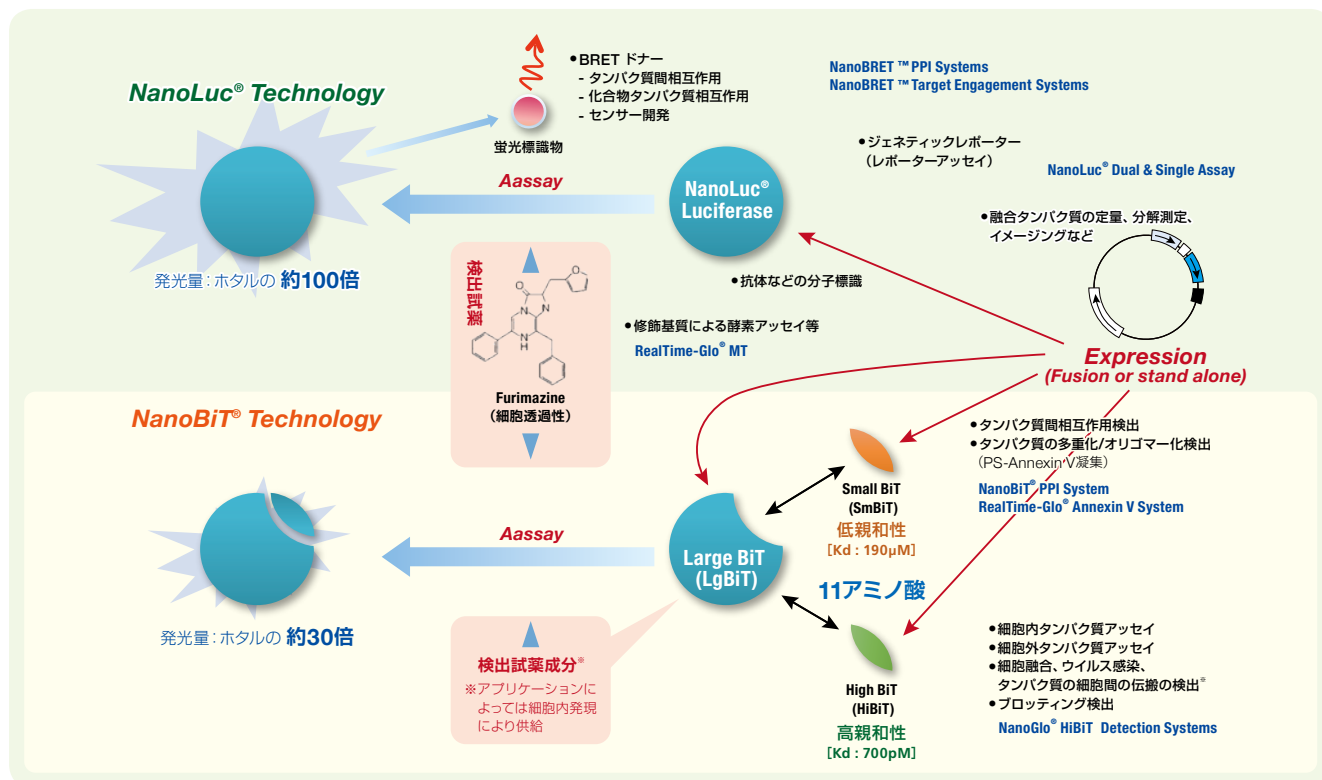
## FLuc から NanoLuc<sup>®</sup> そして NanoBiT<sup>®</sup> へ

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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> を 11 アミノ酸 (SmBiT または HiBiT) と 18KDa の LgBiT に分断した NanoBiT<sup>®</sup> 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: 低親和性の SmBiT および高親和性の 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 (EC<sub>50</sub>) は、一過性発現と比較し内在性発現では **10 倍以上高く** (EC<sub>50</sub> 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。

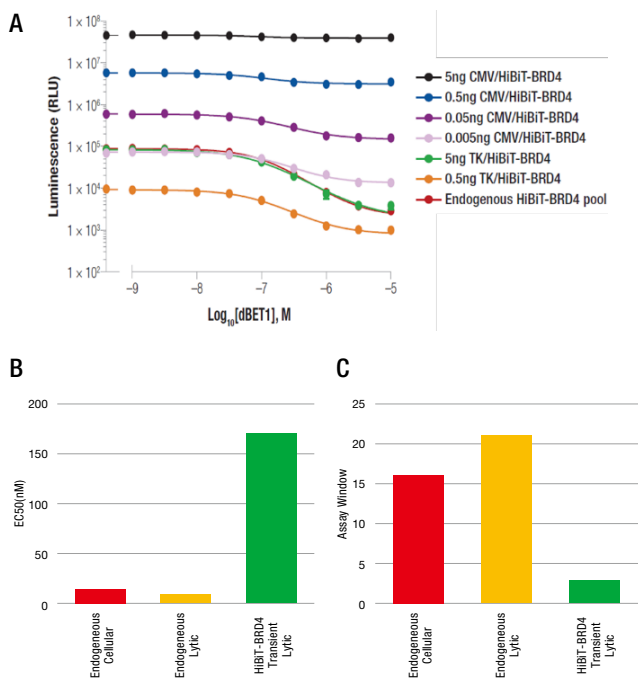


図 1 PROTAC dBET1 による HIBiT-BRD4 の分解誘導

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 EC<sub>50</sub> 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、EC<sub>50</sub> 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<sup>1)</sup> 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<sup>1)</sup>。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。

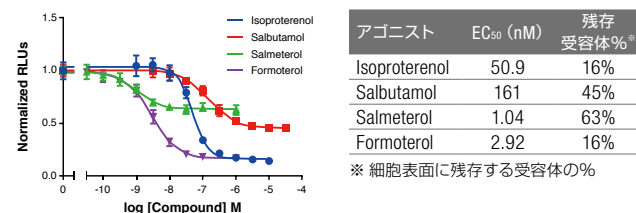


図 2 β2-adrenergic receptor (ADRB2) のエンドサイトーシス

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。

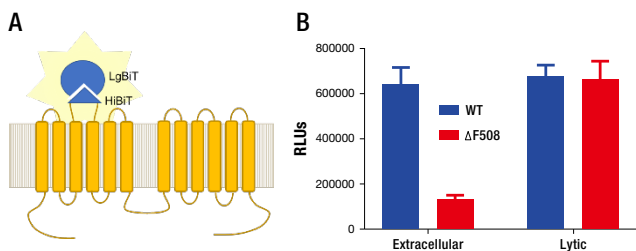


図 3 CFTR のエンドサイトーシス

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 オンラインセミナー & 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](http://www.promega.co.jp/promegaclub.html)

