

ルシフェラーゼ遺伝子を応用した分泌タンパク質の解析



東京医科歯科大学
医歯学総合研究科
システム発生・再生医学分野
松島 隆英 先生

私は細胞内タンパク質の細胞内ダイナミクスに興味があり、細胞内あるいは細胞内から細胞外への各タンパク質の動態を様々なスクリーニング系を用いて解析を行っています。その中でも IL1 β を代表として一部の分泌タンパク質については分泌シグナルを持たず、かつ小胞体-ゴルジ体を経由せずに細胞外へと輸送されるという非古典的分泌経路に現在着目しています。私はこの経路をとる新規のタンパク質の同定とその分泌機構の解析を目的に研究を進めていますが、肝心の分泌機構の解析には細胞外の分泌タンパク質の定性・定量解析を行うことが必須となり、分泌タンパク質解析に一般的に利用される ELISA 法などでは新たに特異的な抗体が必要となるなど様々な問題が浮上してきました。そこで既存の手法に代わる分泌タンパク質の簡便かつ安価な定性・定量解析システムとしてルシフェラーゼ遺伝子を応用した単純な解析手法を考えました(図1)。既存のルシフェラーゼ遺伝子に加えて当時プロメガが新たに販売を開始した NanoLuc® を IL1 β に融合させた発現ベクターを使ってプレアッセイを試みた結果、IL1 β -NanoLuc® を遺伝子導入した細胞の培養液でのみ劇的な発光シグナルを確認することができました(図2)。この結果を踏まえて NanoLuc® を用いて非古典的分泌経路をとる新規のタンパク質の分泌解析を行ってきましたが、強制発現系では内在性タンパク質の分泌機構を正確に解析することが困難であるという新たな問題が出てきました。そのため現在はスプリット型 NanoLuc® として開発された極小発光タグである HiBiT を使用して、ゲノム編集技術を用いて作製した HiBiT タグ・ノックイン細胞とノックインマウスを用いて小胞体-ゴルジ体を経由しない細胞外への細胞内タンパク質の分泌機構の解析を進めています。

また上記の解析に加えて HiBiT - LgBiT の高親和性に着目し、どんな分子生物学解析にも対応できる「バーサタイル(万能) タグ」としての HiBiT 技術の可能性についても検討を進めており、その成果は 2017 年度生命科学系学会合同年次大会にて皆さんにご紹介したいと思っています。

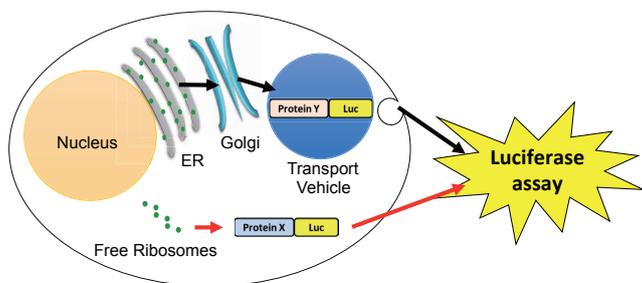


図 1. ルシフェラーゼ融合タンパク質による分泌解析システム

分泌タンパク質解析に一般的に利用される ELISA 法に代わる技術として目的タンパク質にルシフェラーゼを融合させた状態で細胞に発現させることで、ワンステップでタンパク質の分泌量を発光シグナルとして測定する。

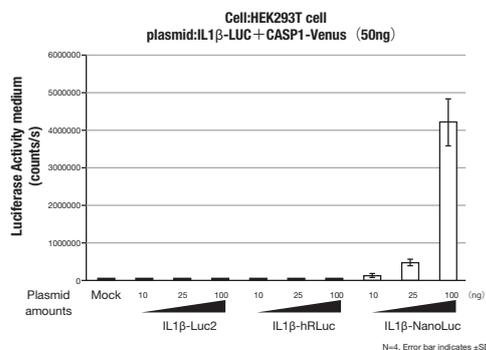


図 2. ルシフェラーゼ融合 IL1 β 発現細胞の培養液内でのルシフェラーゼ活性

HEK293T 細胞に各ルシフェラーゼ遺伝子を融合させた IL1 β 発現ベクターと Casp1-Venus 発現ベクターを遺伝子導入し、48 時間ごとに培養液を回収してルシフェラーゼアッセイを行った。IL1 β -NanoLuc® を遺伝子導入した細胞の培養液でのみ発現ベクター量依存的な発光の上昇を確認することができた。

結論

- ELISA に代る技術として NanoLuc®/HiBiT 融合タンパク質を用いたルシフェラーゼアッセイが有用である。
- 極小発光タグである HiBiT タグはゲノム編集によるノックインが容易である。
- HiBiT タグはバーサタイル(万能) タグ? (続きは 2017 年度生命科学系学会合同年次大会で)。

プロメガ学術部員の

目からウロコ

これまで良い抗体がなく実験が滞っていた方に朗報でした。HiBiT は抗体フリーで分泌タンパクを解析できる画期的なツールであるとご評価頂きました。さらにゲノム編集への応用において、その高輝度性、スクリーニングの簡便さから、内在性の遺伝子発現解析に相性抜群のタグであるとのコメントを頂きました。今後 HiBiT のポテンシャルをさらに引き出す万能タグとしてのツールを開発予定とのことでその進捗に期待です!



2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ランチョンセミナーで松島先生よりご講演の要旨

ルシフェラーゼ遺伝子を利用した発光システムはワンストップの作業で体内の分子の作用・挙動を検出可能なパラメーター(レポーター活性)に変換する手法であり、シグナル伝達解析やバイオセンサーなどといった様々な分子生物学的解析に利用されている。我々の研究室でもルシフェラーゼ遺伝子を応用した様々なスクリーニング系を開発してきた。その中でも近年では煩雑かつ高価な ELISA 解析に代わるシステムとして NanoLuc®/HiBiT 融合タンパク質を用いたハイスループットアッセイに対応可能な分泌タンパク質の定性・定量解析システムを開発して研究に利用している。特にスプリット型 NanoLuc® として開発された HiBiT タグは 11 アミノ酸の付加により目的タンパク質の発光定量を可能とした「極小」の発光タグであり、ゲノム編集による各遺伝子へのタグ付け(タグging)の際にも一般的に利用されているルシフェラーゼ遺伝子群と比較して利用しやすい特性がある。我々はその特性を利用して HiBiT タグ・ノックイン細胞とノックインマウスの作製をシステムティックに進め、小胞体-ゴルジ体を経由しない細胞外への細胞内タンパク質の分泌機構の解析を進めている。本発表では我々の研究成果を交えながらウエスタンブロットや免疫沈降、免疫染色といった分子生物学解析に広く利用されている FLAG などの既存のスマールタグに取って代わる「バーサタイル(万能) タグ」としての HiBiT 技術の可能性について論ずる。

12/7 神戸で行われる 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ランチョンセミナーでお待ちしております。