

# タンパク質解析実験の「お悩み」解決！ HiBiT テクノロジー



プロメガは抗体不要でタンパク質定量が可能な画期的な発光タグシステムを開発しました。HiBiT システムは 11 アミノ酸のペプチドタグと、それに高い親和性で結合する相補的な NanoLuc<sup>®</sup> ルシフェラーゼ断片 (LgBiT ; 17.6kDa) と基質を用いた、発光法によって目的タンパク質を検出する技術です (下表)。相補的に結合した LgBiT と HiBiT は NanoBiT<sup>®</sup> Luciferase となり、従来のホタル、ウミシイタケルシフェラーゼの 30 倍以上の発光輝度を有します。

すでに実用化されているタンパク質検出タグとして、エピトープタグ (His、c-Myc、FLAG 等) や GFP 等の蛍光タンパク質が知られています。これらは簡便性、親和性、アプリケーション、ランニングコストの面で長所と短所があるため、実験により使い分ける必要がありました (下表)。HiBiT システムはタンパク質定量に関して、これら多くの点で高い性能を持ち、これまで難しいとされた様々な実験系を実現できる世界初の新規発光タグシステムです。ここではタンパク質の解析実験における様々な「お悩み」に対し、HiBiT がどのように解決できるかについてご案内します。

## タンパク質の検出法比較表

	HiBiT システム	抗体	エピトープタグ	蛍光タンパク質
POI 機能への影響	POI 機能への影響小	POI 機能への影響なし	POI 機能への影響小	POI 機能への影響大
ありのまま	内在性に近い発現が可能 (ゲノム編集によるタグの導入が容易) 遺伝子組み換え作業あり	内在性発現 遺伝子組み換え作業なし	内在性に近い発現が可能 (ゲノム編集によるタグの導入が容易) 遺伝子組み換え作業あり	発現ベクターによる強制発現 (ゲノム編集による導入は困難) 遺伝子組み換え作業あり
検出	発光 簡単 (ステップ数少) → 多検体処理も容易	発光、蛍光、発色 非常に煩雑 (ステップ数多) 固定化必要 (ELISA, 免疫染色)	発光、蛍光、発色 煩雑 (ステップ数多) 固定化必要 (ELISA, 免疫染色)	蛍光 簡単 (0 ステップ)
ランニングコスト	検出試薬	1次抗体 & 検出用抗体が必要、基質	検出用抗体が必要、基質	なし
用途	定量 (ライセート & 生細胞 [経時的定量も可能 <sup>1)</sup> ])	○ (ELISA)	○ (ELISA)	× (高バックグラウンド、低感度)
プロットング	○	○	○	N/A
イメージング	○ (生細胞 <sup>2)</sup> )	△ (免疫染色)	△ (免疫染色)	◎ (生細胞 <sup>3)</sup> )

※ POI : 標的タンパク質。N/A : Not Applicable。 1) 細胞内タンパク質の場合、LgBiT タンパク質の安定発現が必要 (膜タンパク質や分泌タンパク質の場合は不要)  
2) オリジナル社の LV200 などの発光イメージングシステムが必要 3) 励起光による光毒性



タンパク質を検出するための良い抗体が見つかりません…

抗体を用いた検出は時間ばかりかかってうんざり…



**HiBiT は抗体を必要としません！**

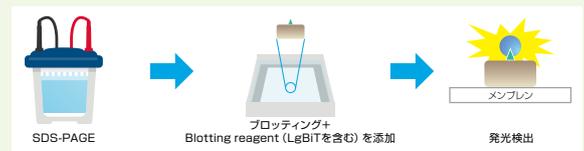
比較対象 抗体 エピトープタグ

抗体を使う実験は、内在性タンパク質を検出する目的においては極めて重要であるものの、一般的にとっても面倒で時間のかかる作業です。目的タンパクに対して特異性の高い抗体を見つけるのは、コストも時間もかかり一苦労です。さらにその実験では、長時間のインキュベーション、ブロッキング、洗浄、二次抗体検出が必要です。HiBiT は検出試薬を細胞に加え、タンパク質を検出するだけです。例えば細胞内タンパク質定量では、HiBiT Lytic Assay 試薬 (細胞溶解剤、LgBiT および NanoLuc<sup>®</sup> 基質を含む) を添加後 10 分間で測定が完了します。プロットングメンブレン上でのタンパク質検出では、細胞を溶解し、SDS-PAGE 泳動、メンブレン転写します。メンブレンに HiBiT Blotting assay 試薬 (LgBiT および NanoLuc<sup>®</sup> 基質を含む) を添加するだけで、目的タンパク質をバンドとして検出する操作は 30 分以内に完了します。

### 細胞ライセートのタンパク質定量 (HiBiT Lytic Assay)



### プロットングメンブレン上でのタンパク質定量 (HiBiT Blotting)



タグ自身がタンパク質を台無しにしないかと心配でたまりません…

比較対象 エピトープタグ 蛍光タンパク質

**HiBiT はわずか 11 アミノ酸です！**

大きなタンパク質タグがタンパク質の機能を妨げる可能性があります。小サイズであることは、タンパク質タグとして最適です。タンパク質の発現や機能への影響を最小限に抑えることができます。

現在使用しているタンパク質検出法では感度が低く定量的な検出ができません…

HiBiT は極めて高感度です。わずか 1amol の HiBiT でも検出できます！

比較対象 抗体 エピトープタグ 蛍光タンパク質

HiBiT の発光は NanoLuc® ルシフェラーゼの発光に由来しています。NanoLuc の発光値は従来のホタル、ウミシイタケルシフェラーゼの発光の 100 倍以上です。また、ルシフェラーゼによる発光測定は GFP などの蛍光タンパクによる検出に比べ、10,000 倍以上の定量感度があります。また、一般に ELISA、ウエスタンの検出は、それぞれ fmol、pmol オーダーが限界と言われていますが、プレートリーダーでの測定では、わずか 1amol の HiBiT- 目的タンパクを検出できます (図 1)。

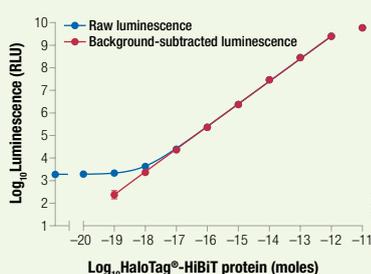


図 1. HiBiT 融合タンパク質の検出感度と直線性  
精製 HaloTag®-HiBiT タンパクを Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent により検出した。少なくとも 7 桁のリニアダイナミックレンジを示した ( $r^2 = 0.9982$ )。



私の研究対象のタンパク質は極めて発現レベルが低く検出ができません…

HiBiT はゲノム編集の応用で内在性レベルの発現を定量化できます！

比較対象 抗体 エピトープタグ 蛍光タンパク質

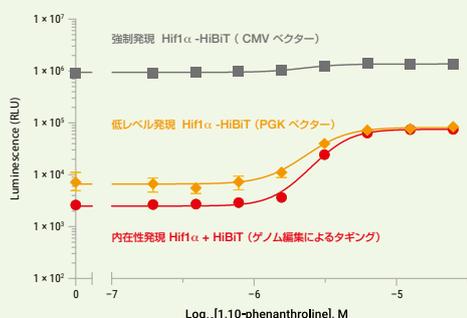


図 2. phenanthroline による HIF1 $\alpha$ -HiBiT の安定性評価

CMV あるいは TK プロモーターを利用して HIF1 $\alpha$ -HiBiT を細胞内に一過性発現あるいはゲノム編集による内在性 HIF1 への HiBiT タグ付けにより発現させ、phenanthroline によるタンパク安定性を発光検出により評価した。

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 (図 2)。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のが一因であると推察されます。

これまでの検出  
強制的に発現させて、  
低い応答性 (変化量) をなんとか検出  
重要な変化を見落としがち

プロメガなら  
本来の低レベルで発現させて、  
高い応答性 (変化量) を高感度に検出  
重要な変化をキャッチ！

内在性発現レベルの検出が可能

低発現のタンパク質の場合、発現ベクターで過剰発現というアーティファクトを伴う実験をせざるを得ませんでした。本来はできるかぎり内在レベルでの発現が望まれます。HiBiT の活用により、これまでタンパク質を過剰発現でしか見ることができなかった現象を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。

CRISPR/Cas9 を利用して、目的の内在性タンパク質にレポータータグをつけようとしていますが、プラスミドドナーを作ることが面倒ですし、挿入効率が低すぎます。

HiBiT はプラスミドドナーを必要としません！

比較対象 蛍光タンパク質

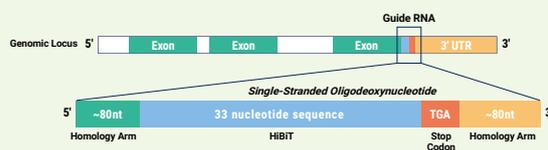


図 3. CRISPR/Cas9 による HiBiT のノックインの際のドナーオリゴのデザイン

GFP のような大きなレポーターは CRISPR/Cas9 でのノックインにはとても難易度が高いです。大きなレポーターにはプラスミドドナーや長い配列のドナーが必須です。プラスミドの構築の手間とコストが生じます。あるいは長い人工配列を使用した場合も、2 本鎖 DNA を使う必要があり、ノックイン効率が悪く、組み換えの重複が生じやすくなります。HiBiT は 1 本鎖のオリゴテンプレートを使って挿入することができます。サイズが小さいので、効率よくノックインすることができ、またオリゴの作製コストも抑えられます。

HiBiT 配列 (33 bases) の利用には Web 上での簡単なライセンス内容の承認登録が必要です ([www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/](http://www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/))。出張セミナー「やってみよう! HiBiT ノックイン実験」も承っております。詳細については [www.promega.co.jp/onsite\\_seminar/](http://www.promega.co.jp/onsite_seminar/) をご覧ください。

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10 ml	N3030	26,000
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	10 ml	N2420	28,000
Nano-Glo® HiBiT Blotting System	100 ml	N2410	36,000
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2371	73,000
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2381	73,000
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20 µg	N2361	73,000

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2391	73,000
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2401	73,000
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector	20 µg	N2411	73,000
pBiT3.2-C [TK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000
pBiT3.2-N [TK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000
pBiT3.3-C [PGK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000
pBiT3.3-N [PGK/HiBiT/Blast] Vector	-	カスタム品	80,000

\*カタログ番号が「カスタム品」となっている製品のご注文については [promega.formstack.com/forms/casorder](http://promega.formstack.com/forms/casorder) よりお申込みください (プロメガクラブへの入会が必要です)。