

創薬ターゲットとしても大注目！

標的タンパク質分解をリアルタイムに検出！

古くから細胞内タンパク質分解の破綻が疾患を引き起こすことが知られており、特にアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患の原因として有名です。代表的なタンパク質分解系としてはオートファジーと並んでユビキチン-プロテアソーム系が挙げられます。がん細胞ではタンパク質分解系を阻害して異常タンパク質を蓄積させることにより細胞死を誘導することからプロテアソーム阻害剤がすでに抗がん剤として使用されています。また最近では標的タンパク質を強制的にユビキチン化し、分解促進する PROTAC などの標的タンパク質特異的分解誘導薬に注目が集まっており、創薬ターゲットとして今非常にホットな分野です。しかしながら、細胞内タンパク質分解をハイスループットで、さらにはリアルタイムでモニターすることが難しく、解決すべき課題の一つとなっていました。このセッションでは、プロメガが開発した発光リアルタイムタンパク質モニタリング法とその応用事例をご紹介します。

標的タンパク質特異的分解誘導薬とは

ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解は、ユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) による標的タンパク質のユビキチン化から開始します。これを利用し、標的タンパク質を E3 リガーゼと強制的に結合させてユビキチン化し、分解を促進する「標的タンパク質分解誘導薬」がいくつか開発されています。PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera) ¹⁾ や日本で開発された SNIPER (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein ERaser) ²⁾ が代表的な技術です。これらの標的タンパク質分解誘導薬は標的タンパク質に結合する分子と E3 リガーゼに結合する分子をリンカーでつないだ二機能性の低分子化合物で、本来は相互作用しないタンパク質同士を強制的に結合させることから「分子糊 (Molecular Glue)」とも呼ばれています (図 1A)。

これらタンパク質分解誘導薬では、標的タンパク質を過剰に発現させるとわずかな変化量をとらえることが困難になるため、内在性レベルでリアルタイムに測定できるアッセイ法が望まれます。また重要な創薬ターゲットであることから、簡便でスクリーニングに対応したアッセイ法であればより有用です。これまで基礎研究ではウェスタンブロットング、スクリーニングでは TR-FRET や AlphaLISA[®] などが使用されてきました。しかしこれら抗体を用いる検出法は、多くの場合内在性レベルの発現解析には検出感度が不十分です。さらにウェスタンブロットングは時間がかかり、操作も複雑であることがネックになっていました。

これらの点を解決するのが NanoLuc[®] テクノロジーを応用したアッセイです。ここでは HiBiT タグを用いて目的タンパク質の発現量を迅速・高感度に検出するアッセイ (図 1B)、および NanoBRET[™] を利用して PROTAC による目的タンパク質と E3 リガーゼの相互作用を検出するアッセイ (図 1C) をご紹介します。

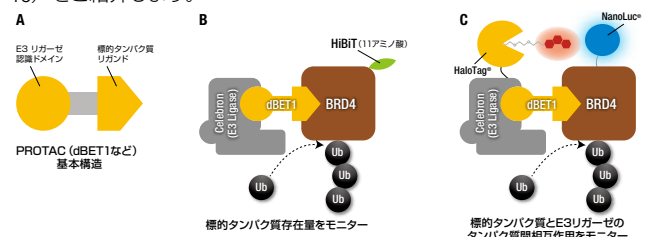


図 1. 標的タンパク質特異的分解誘導薬解析ツールの原理

A. PROTAC の模式図。B. HiBiT タグを付加した BRD4 タンパク質分解を発光値として直接にモニター。C. HaloTag[®] 付加 Celebrin と NanoLuc[®] 付加 BRD4 の相互作用を BRET によりモニター

高発光タグ HiBiT を用いたタンパク質ダイナミクス検出法

HiBiT は内在性レベルの発現量でも十分検出できる感度を持ち、かつサイズが非常に小さく (11 アミノ酸)、ゲノム編集で容易に標的タンパク質にノックイン (タギング) できることから、内在性レベルのタンパク質発現量解析に最適です (3 ページ参照)。検出操作も簡便であり、細胞に 1 種類の検出試薬 (LgBiT タンパク質と発光基質を含む) を添加するだけで発光します。ウェスタンブロットングのようにエンドポイント解析する場合、必要なのは HiBiT タグを付加した目的タンパク質、HiBiT 検出試薬とルミノメーターのみです (図 2)。HiBiT タグ付加標的タンパク質は発現量に気を付ければベクター (低発現用プロモーターを推奨。3 ページ参照) で外来性に発現させることも可能です。

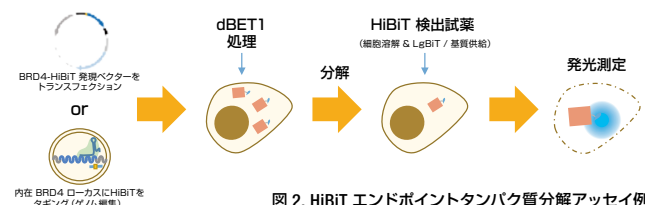


図 2. HiBiT エンドポイントタンパク質分解アッセイ例

一方リアルタイムモニタリングを行う場合は、HiBiT タグ付加標的タンパク質に加えて LgBiT タンパク質を安定的に発現させる必要がありますが、発光測定する際は Nano-Glo[®] Live Cell Reagent を添加するだけです。図 3 はゲノム編集で HiBiT を付加した BRD4 のリアルタイムモニタリング例です。このデータから 2 種類の PROTAC (dBTET1 or MZ1) 処理により 3 時間以内に BRD4 発現量が低下すること、また MZ1 の方が速やかに BRD4 量を低下させることが分かります。

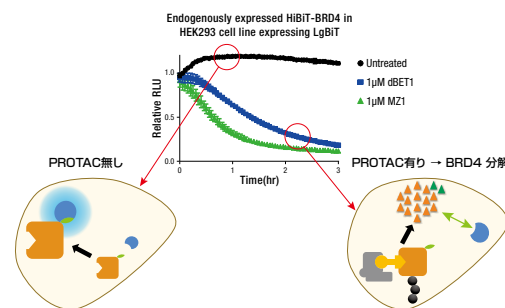


図 3. HiBiT リアルタイム タンパク質分解アッセイデータ

BRD4 遺伝子にゲノム編集で HiBiT をノックインし、さらに LgBiT を安定発現させた HEK293 細胞での BRD4 モニタリングデータ。PROTAC (dBTET1 および MZ1) 処理により BRD4 量が減少する様子を HiBiT 発光で検出した。

PROTAC によるタンパク質相互作用誘導解析

より詳細な解析を実施したい場合は、NanoBRET[™] テクノロジーを用いて、PROTAC による標的タンパク質と E3 リガーゼの相互作用誘導をモニターすることも可能です (図 1C)。図 4 は dBTET1 による BRD4 と Celebrin の相互作用カインेटクスを検出したデータです。dBTET1 添加後 1 時間ではほぼシグナルがプラトーに達し、BRD4 と Celebrin が結合したことを示しています。

新たなモダリティとしても注目されるタンパク質分解誘導の基礎的な実験にも利用できる HaloTag PROTAC 試薬 (HaloTag[®] 融合タンパク質分解誘導化合物) も開発中です。ご興味がある方はお問合せください。

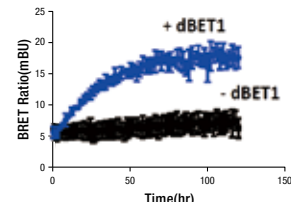


図 4. NanoBRET[™] を用いた dBTET1 による Celebrin-BRD4 相互作用のカインेटクス測定。

まとめ

NanoLuc[®] 最新技術により、生きた細胞でのタンパク質分解をリアルタイムに解析できるようになりました。特に内在性レベルでのタンパク質動態を追うことができる HiBiT でのモニタリングはユビキチン-プロテアソーム系の解析に限らず、他の系にも応用できるシンプルでフレキシブルな技術です。次のページではオートファジー解析への応用事例を紹介します。

参考文献

- 1) Sakamoto, Kathleen M. *et al.* PNAS 98.15 (2001): 8554–8559.
- 2) Itoh Y. *et al.* (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, 5820–5826

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 [®] Live Cell Assay System	100 回分	N2011	28,000
CMV LgBiT (KanR/HygR) Vector	-	カスタム品	80,000
NanoBRET [™] PPI MCS Starter System	1 セット	N1811	180,000
NanoBRET [™] PPI Flexi [®] Starter System	1 セット	N1821	150,000

*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 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)。