

事例  
研究

# あなたの実験イメージを具現化するプロメガの解析ツールと受託サービス タンパク質相互作用解析のスーパーモデルケース

ご協力：東京大学医科学研究所 抗体・ワクチンセンター 谷口 博昭 先生

タンパク質相互作用（Protein-Protein interaction, PPI）解析は、個々のタンパク質機能だけでなく細胞内タンパク質ネットワーク、さらには細胞内プロセスを解明する上で重要な研究手法です。共免疫沈降（Co-IP: Co-immunoprecipitation）法、プルダウンアッセイ法、ファウースタンブロットリング法、表面プラズモン共鳴法など様々なタンパク質相互作用解析法が開発され、研究内容に合わせて最も説得力があり効率的な方法が選択されてきました。今回ご紹介する事例では従来の方法に加え、タンパク質タグである HaloTag® を用いたプルダウンや新技術 NanoBRET® を

取り入れた結果、新規な相互作用タンパク質候補の取得ならびにこれまで困難だった生細胞内における相互作用の定量的解析が可能となり、*in vitro* から生細胞での PPI 検出～機能解析まで多角的な検討に成功しています。

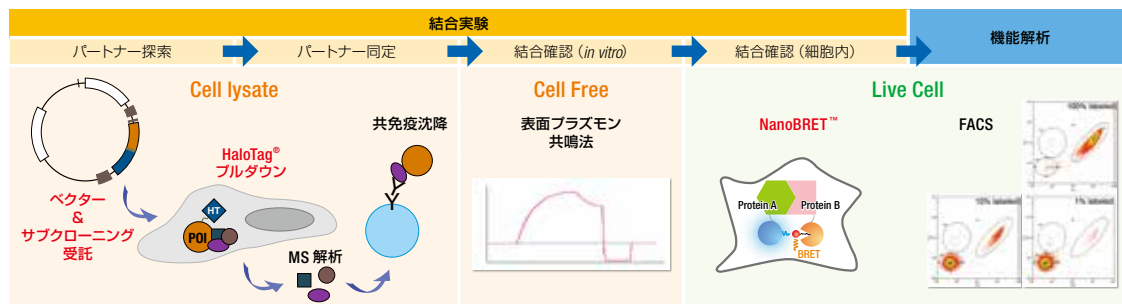
HaloTag®, NanoBRET® は ORF クローンや実験受託サービスもあり、煩雑な部分をスキップできます。タンパク質相互作用の解析ツールのひとつとして是非ご活用ください。

## 今回の参考文献

- PRDM14 directly interacts with heat shock proteins HSP90α and glucose-regulated protein 78. Moriya, *et al.*, *Cancer Science*. 2018;109:373–383.

## 論文概要

PRDM14 は様々な癌において過剰発現しており、乳癌細胞および肝癌細胞において PRDM14 発現の阻害により、癌の悪性形質を減じることが報告されている。薬物治療において PRDM14 の結合パートナーの同定、機能解析は重要である。ここでは、PRDM14 と相互作用するタンパク質の同定および機能解析を行った。乳癌細胞において Halo-PRDM14 を発現、プルダウンおよび質量分析により 13 の相互作用タンパク質の候補を得た。さらに Co-IP によって 2 つの候補 GRP78 および HSP90α が確認された。表面プラズモン共鳴法による分析は、これら 2 つのタンパク質が *in vitro* で PRDM14 と直接相互作用することを示し、また、NanoBRET® アッセイにより生細胞でも実際に相互作用していることを確認した。さらに、PRDM14 発現の抑制と HSP90 阻害剤や GRP78 阻害薬との併用で、がん幹細胞性と関連のある CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 細胞および Side Population (SP) 細胞の割合が阻害剤単独に比して有意に減少する。これらの結果は HSP90α, GRP78 による腫瘍形質維持に PRDM14 が深くかかわることを示す。



## 論文著者インタビュー



東京大学 医科学研究所  
抗体・ワクチンセンター  
谷口 博昭 先生

### 生細胞アッセイの重要性

蛋白質相互作用の各種パラメータは非細胞系アッセイで詳細に得ることが可能です。それと同時に蛋白質相互作用が実際に生細胞内で生じることの実証が「蛋白質機能の同定」、「創薬開発」においては前提です。プロメガの NanoBRET® 法は初心者でも比較的簡便な手法であり、また、発光を用いるため非常に鋭敏なシグナルが得られるので、蛋白質相互作用の生細胞アッセイには適しています。

### 今後の展望

NanoBRET® 法は、従前の細胞死を指標とした系ではなく、「生細胞」での蛋白質相互作用を指標とした無・低毒性の新規薬剤のスクリーニングの基盤となる可能性を秘めております。今後、NanoBRET® 法による評価系の最適化やハイスループット化を前提に、低分子化合物ライブラリーとの組み合わせを検討しています。この系を実現するための、製薬企業、大学のスクリーニング部門等のパートナーを募集しています。

## 技術解説

### HaloTag®

蛍光イメージングやタンパク質精製など多様なアッセイが可能な多機能タグです。プルダウンでは従来法で得られなかった新規相互作用タンパク質候補が見つかった実績があります。

### NanoBRET®

非常に明るいルシフェラーゼ NanoLuc® と HaloTag® を利用した BRET で、生細胞でのタンパク質相互作用を高感度かつ定量的に検出できる実験方法です。

## 関連製品

| 製品名                                 | サイズ   | カタログ番号 | 価格(¥)   |
|-------------------------------------|-------|--------|---------|
| HaloTag® Mammalian Pull-Down System | 10 ml | N3030  | 26,000  |
| NanoBRET™ PPI MCS Starter System    | 1 セット | N1811  | 180,000 |
| NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System | 1 セット | N1821  | 150,000 |

HaloTag ORF クローンや NanoLuc® ベクターへのサブクローニング受託については [www.promega.co.jp/e-Service/](http://www.promega.co.jp/e-Service/) をご覧ください。