

タンパク質間相互作用 : NanoBRET™ システム構築の実際 (CRAF-BRAF 相互作用モデル)

概要

- がんに関与する CRAF および BRAF の NanoBRET™ タンパク質相互作用アッセイを構築
- タグの配置をはじめとする最適化の重要性
- 同じコンストラクトで細胞内 BRET に加えブルダウン発光検出も可能

はじめに

BRAF および CRAF のヘテロ二量体化は、Ras-Raf-MAPK 経路の活性化およびシグナル伝達をもたらし、発癌性に関わることから癌分野で広く研究されてきました。特異的な BRAF 変異は、下流の MEK/ERK シグナル伝達の恒常的な活性化を引き起こすため、二量体化に影響を及ぼす BRAF 阻害剤は癌治療に向けた臨床的関連性が示されています。細胞ベースの RAF キナーゼの 2 量体化アッセイは、GDC-0879 などの化合物の作用機序を理解することやこの相互作用を調節する化合物の同定に有用なツールになると考えられます。

細胞ベースのタンパク質相互作用研究のためのアプローチの 1 つとして生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) 法は極めて有用です。NanoBRET™ PPI アッセイでは BRET エネルギードナーとして NanoLuc® ルシフェラーゼを、蛍光 HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand (カタログ番号 G9801) で標識した HaloTag® タンパク質をエネルギーアクセプターとして生細胞におけるタンパク質相互作用を測定します。明るく青色シフトした NanoLuc® ドナーシグナルと赤色シフトした HaloTag® アクセプターシグナルは、スペクトルの重複を最小限に抑えた最適化されたペアとして、従来の BRET アッセイに比べて高いシグナル/バックグラウンド比を示します。目的のタンパク質は NanoLuc® ドナーまたは HaloTag® アクセプターでそれぞれ N 末端、C 末端の組み合わせでタグ付けを行い、最良の組み合わせ (4 種のバリエーションと 8 種類のドナー/アクセプターの組み合わせ) を見つけることにより最高のアッセイ性能が引き出されます。(8 クローンセット作成受託については次ページ参照)

ここでは、CRAF と BRAF タンパク質の相互作用をモニターする NanoBRET™ PPI アッセイの構築について説明します。GDC-0879 の存在下および非存在下で、可能性のあるすべてのドナー/アクセプターの組み合わせを体系的にスクリーニングしました。また、トランスフェクションにおけるドナーとアクセプターベクターの比率を最適化し、HaloTag® ブルダウンアッセイを用いて相互作用を検証しました。今回、2 つの細胞株、ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) と KRAS 遺伝子に変異があり、癌モデルとして阻害剤研究にも使われるヒト結腸がん細胞 (HCT116) で相互作用アッセイをテストしました。

タグ配置の最適化

CRAF-BRAF タンパク質相互作用について BRET ドナーおよびアクセプターの最適な組み合わせを決定するために、8 つのプラスミドの組み合わせを HCT116 細胞および HEK293 細胞でテストしました。タグの配置および実験方法は、NanoBRET™ Protein: Protein Interactionのマニュアル (TM439) に従いました。FuGENE® HD トランスフェクション試薬 (カタログ番号 E2311) を用いて HCT116 および HEK293 細胞へ 1:10 (1 µg:10 µg) のドナー/アクセプター比でベクターをコトランスフェクトしました。

HaloTag® NanoBRET 618 Ligand を含む、または含まない条件 (コントロール) で 96 ウェルプレートに細胞を播種しました。CRAF-BRAF 相互作用を誘導するために、細胞のサブセットを GDC-0879 10 µM で 2 時間処理しました。NanoBRET™ NanoGlo® 基質 (カタログ番号 N1571) を添加し、処理細胞および未処理細胞の両方についてドナーおよびアクセプターシグナルを GloMax® Discover (カタログ番号 GM3000) で測定しました。最良のアッセイウィンドウを得るために、NanoBRET™ シグナルを HaloTag® NanoBRET 618 Ligand を未添加のウェルに対して標準化しました。シグナルの倍率変化を処理細胞と未処理細胞との間で決定して、理想的なタグ配置を決定しました。

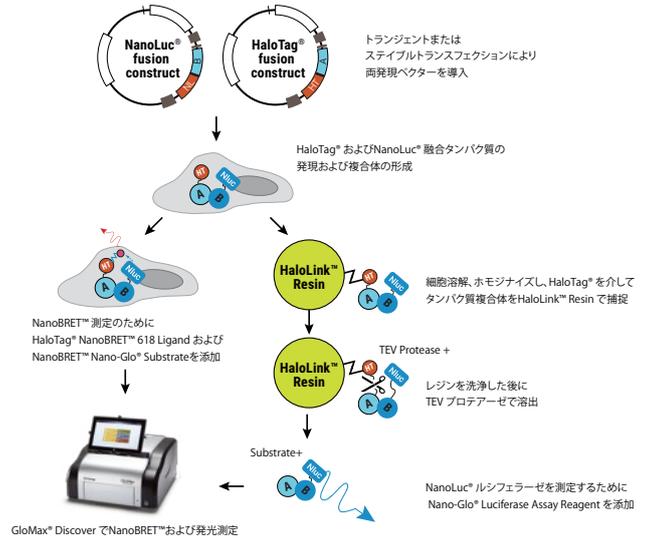


図 1. NanoBRET™ および HaloTag® Mammalian Pull-down System 変法の概要

HaloTag® および NanoLuc® 融合コンストラクトを細胞にコトランスフェクションし、細胞を溶解。HaloTag® 融合タンパク質は HaloLink™ Resin 上に固定され、TEV プロテアーゼで切断して溶出。共精製された NanoLuc® ルシフェラーゼタンパク質を定量

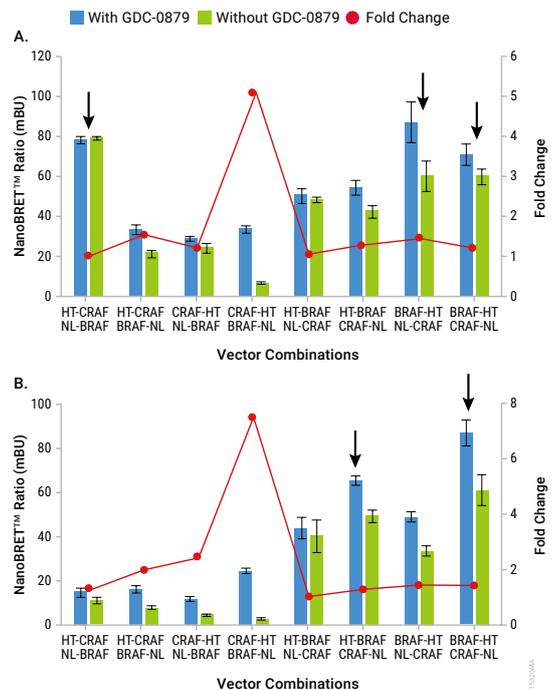


図 2. タグ配置の最適化

8 つのプラスミドの組み合わせから NanoBRET™ 比率と倍率変化を求めた。CRAF または BRAF の N 末端または C 末端に NanoLuc® (NL) または HaloTag® (HT) を融合させ HCT116 (パネル A) または HEK293 (パネル B) にドナー/アクセプター DNA 比 1:10 でコトランスフェクションし、GDC-0879 化合物 10 µM 有無で処理した。

トランスフェクションの最適化

BRAF-NanoLuc[®] および CRAF-HaloTag[®] ベクターをドナー / アクセプター比 1:1, 1:10, 1:100 および 1:1,000 で HCT116 および HEK293 細胞にコトランスフェクトしました。タグ配置の最適化において、GDC-0879 処理 (10 μM) または未処理のサンプルを GloMax[®] Discover で測定しました。各ベクター比について処理または未処理サンプル間の倍率変化を算出しました。

GDC-0879 用量反応曲線

CRAF-BRAF 相互作用の誘導を測定するために、CRAF-HaloTag[®] および BRAF-NanoLuc[®] ベクターを HCT116 および HEK293 細胞にコトランスフェクションし、GDC-0879 化合物で処理して用量反応曲線を作成しました。細胞をドナー / アクセプター比 1:1 または 1:10 でコトランスフェクションし、細胞を 0.001 μM ~ 10 μM の濃度幅の GDC-0879 化合物で 2 時間処理しました。NanoBRET[™] の測定およびシグナルの補正は前述と同様に行いました。

HaloTag[®] プルダウンアッセイ

CRAF, BRAF タンパク質相互作用を検証するために、HaloTag[®] Mammalian Pull-Down assay (カタログ番号 G6509) (図 1) の変法を用いた後に、生物発光で検出しました (Steffen and Méndez-Johnson 2019, tpub_206)。HCT116 細胞に選択された HaloTag[®] および NanoLuc[®] 融合ベクターをドナー / アクセプター比 1:1 でコトランスフェクションし、細胞を濃度 0, 1 μM または 10 μM の GDC-0879 で処理しました。HaloTag[®] 融合タンパク質を含む細胞溶解を HaloLink[™] Resin (カタログ番号 G1912) とともにインキュベーションした後、ProTEV Plus (カタログ番号 V6101) で消化しました。共精製された NanoLuc[®] 融合タンパク質のシグナルを Nano-Glo[®] Luciferase Assay (カタログ番号 N1110) を用いて検出しました。

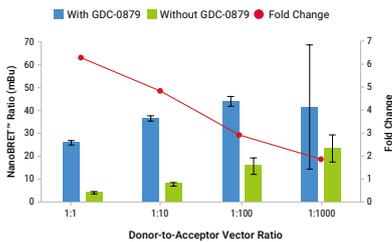


図 3. ベクター比率の最適化

NanoBRET[™] 比率と倍率変化は CRAF-HaloTag[®] と BRAF-NanoLuc[®] プラスミドを比率を変えて (ドナー / アクセプター比: 1, 1:10, 1:100 または 1:1,000) HCT116 にコトランスフェクションした [10 μM GDC-0879 処理 (+/-)] (n = 4)。

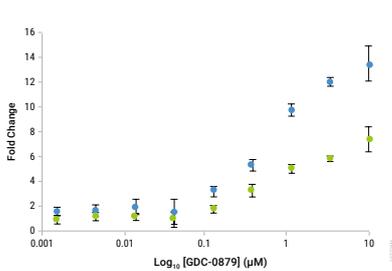


図 4. GDC-0879 用量反応曲線

様々な濃度の GDC-0879 化合物で NanoBRET[™] CRAF-BRAF 相互作用シグナルの倍率変化を示す。HCT116 細胞ヘドナー / アクセプターを DNA 比率 1:1 または 1:10 でコトランスフェクションし、表示濃度の GDC-0879 で処理した (n = 4)。

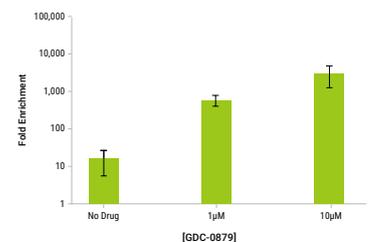


図 5. BRAF-NL の HaloTag[®] プルダウン

0, 1 μM または 10 μM GDC-0879 の存在下で CRAF-HT および BRAF-NL を共発現する HCT116 細胞での NanoLuc[®] ルシフェラーゼ活性の濃縮倍率 (n = 3)。

結果

GDC-0879 阻害剤存在下で HCT116 および HEK293 でそれぞれ 8 種類のベクターの組み合わせをテストした結果、最高の NanoBRET[™] シグナルが得られた組み合わせは細胞種により異なり、図 2 で矢印により示しました。しかし、阻害剤の処理の有無で最大の倍率変化を示したベクターの組み合わせは、最も高いシグナルが得られた組み合わせとは異なるという点は重要です。特異的な CRAF-BRAF 相互作用は化合物で処理した場合に起こるため、基底レベルが最も低い NanoLuc[®] と HaloTag[®] 融合体の

組み合わせである CRAF-HaloTag (CRAF-HT C 末端融合体) と BRAF-NanoLuc (BRAF-NL C 末端融合体) が化合物処理により最大の倍率変化と最良のアクセイウインドウを示しました。このため以降の実験では CRAF-HT および BRAF-NL の組み合わせを使用しました。

未結合のドナー量を最小限に抑え、NanoBRET[™] シグナルのダイナミックレンジを最大にするために、コトランスフェクションするドナーとアクセプターベクター比率を最適化しました。細胞の一部は GDC-0879 で相互作用を誘導しました。最大の倍率変化が得られたドナー / アクセプター比は 1:1 でした (図 3)。

CRAF と BRAF のヘテロ二量体化における GDC-0879 の影響を調べるために、様々な濃度の化合物で NanoBRET[™] 実験を行いました。図 4 ではベクター比 1:1 および 1:10 での用量反応曲線を示しています。先の実験と同様に最大のダイナミックレンジはベクター比 1:1 で得られ、同様の反応が両細胞株で観察されました。これらのデータは、最も効率的な NanoBRET[™] アッセイを行うためにはタグの位置とベクター比の両方を最適化する必要があることを示していました。さらに、最適化された NanoBRET[™] PPI Assay は、化合物モジュレーターに対して反応するタンパク質相互作用を高感度に検出できる方法であることを示しました。

最後に CRAF-BRAF の相互作用を確認するために、HaloTag[®] および NanoLuc[®] タンパク質ならではの利点を利用し、HaloTag[®] Mammalian Pull-Down の変法および NanoLuc[®] 融合体の検出を行いました。HCT116 細胞は二量体化を促進させるために様々な濃度の阻害剤で処理しました。タンパク質をプルダウンし、切断した後、Nano-Glo[®] Luciferase Assay を用いて CRAF-HT とともに共精製された BRAF-NL を検出しました。ルシフェラーゼのシグナルは HaloTag[®] コントロールベクターと比較しました。GDC-0879 を添加しない場合 HaloTag[®] ベクターコントロールと比べ約 10 倍の BRAF が観察されました (図 5)。GDC-0879 濃度の増加とともに、BRAF の濃縮倍率も上昇しました。これらのデータは、NanoBRET[™] アッセイで測定されたエネルギー転移の結果が BRAF-NL および CRAF-HT 融合タンパク質間の物理的な相互作用によるものであることを裏付けました。

まとめ

CRAF-BRAF 相互作用を用いて構築された NanoBRET[™] タンパク質間相互作用アッセイを紹介しました。誘導剤や阻害剤の存在下で、タグの位置やベクターのコトランスフェクション比率の受容性を示しました。同じ融合体セット CRAF-HT と BRAF-NL が HCT116 と HEK293 の両細胞で最も高い倍率変化を示していたことは特筆すべき結果でした。さらに、GDC-0879 用量依存的にヘテロ二量体化が促進されることを示しました。NanoBRET[™] テクノロジーのもう一つのユニークな長は、HaloTag[®] および NanoLuc[®] が高い応用性を有しており、CRAF-BRAF のエネルギー転移が 2 つのタンパク質間の物理的な相互作用によるものであることを検証するために HaloTag[®] プルダウンの変法および NanoLuc[®] 定量法を利用できることです。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)	特別価格 * (¥)
NanoBRET[™] 検出試薬 + 空ベクターセット				
NanoBRET [™] PPI MCS Starter System	1 セット	N1811	180,000	126,000
NanoBRET [™] PPI Flexi [®] Starter System	1 セット	N1821	150,000	105,000
NanoBRET[™] アッセイ試薬				
NanoBRET [™] Nano-Glo [®] Substrate	50 μl	N1571	52,000	36,400
HaloTag [®] NanoBRET [™] 618 Ligand	20 μl	G9801	55,000	38,500
プルダウン関連試薬				
HaloTag [®] Complete Pull-Down System	1 セット	G6509	175,000	122,500
HaloLink [™] Resin	5 ml (settled resin 1.25 ml)	G1912	35,000	24,500
ProTEV Plus	1000 u	V6101	24,500	17,150
Nano-Glo [®] Luciferase Assay	10 ml	N1110	24,000	16,800

*2019年8月23日受注分まで

クローンを作製する時間が無いという方に朗報です!

NanoBRET[™] に利用できる 8 クローンの作製受託サービスも承っています。詳細については

www.promega.co.jp/pdf/nanoppi_construction_kgt.pdf をご覧ください。