

## テクニカルスタッフの ちょっと一言

いわゆる High Throughput Screening (HTS) で行われるアッセイは通常、1 サンプル (化合物) につき 1 well (N=1) で行います。N=2 あるいは N=3 で行われることは極めて稀です。

アッセイの結果、Hit かどうかの判断をします。たとえば阻害剤探索の場合、仮に Hit としてのクライテリア (判定基準) を 50% 阻害と設定した場合、45% 阻害を示したものを捨ててしまってもいいのかわ。もしかして N=3 でアッセイして平均したら 55% (45, 58, 62%) 阻害で、実は新規発見だったなんてことになるかもしれません。これぞまさに、**N=1 の恐怖**。

エヌイチ

このようなことをできる限り少なくするために、ばらつきの少ない、Z' の大きいアッセイ系であることが望ましいと考えられます。N=3 でアッセイした濃度依存性曲線から IC<sub>50</sub> 算出実験を 3 回行っての平均... とは対極です。

ばらつきの小さい実験を組み立てる一つの方法が、ホモジニアスなアッセイを作ること。ホモジニアスという言葉はあまり正確ではなく、add-read あるいは mix and measure が正しいかもしれません。濾過、洗浄といった分離操作の入らないアッセイ系です。

ホモジニアスなアッセイ系ですと、実験操作の観点からは、分注操作のばらつきのみがアッセイ系のばらつきの主因ですので、ばらつきが少ない系が構築できます。

ホモジニアスの他のメリットはアッセイ系のミニチュア化が容易になり、簡便化とスピードアップが可能になることです。ミニチュア化の最大のメリットは、一番貴重なサンプルを最低限にできるところにあります。こんな背景のもと、多くのホモジニアスなアッセイ手法が確立されています。

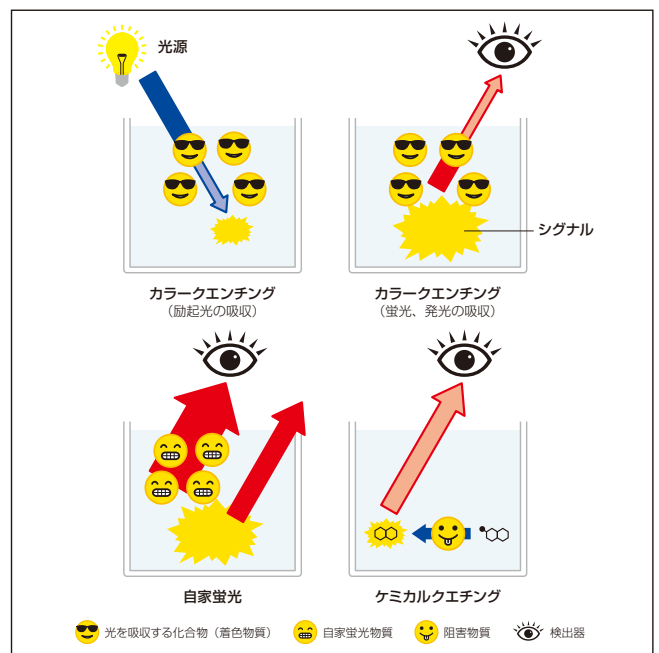
ところが、ホモジニアスアッセイの選択肢が増えるに従い、ホモジニアスアッセイにおける注意事項が、忘れ去られていることがあります。たとえば、1990 年代前半には普通に使われていたラジオアイソトープを用いたフィルトレーション法。濾過操作により、検出の段階ではサンプルは洗い流されていて存在しません。したがってサンプルは検出には影響を与えません。ところがホモジニアスなアッセイ系では、検出のステップでもサンプルが存在します。そこで何が起ころうか、を知っていることが重要です。

蛍光法でのホモジニアスアッセイの場合、もっとも問題になるのが化合物の**自家蛍光**です。蛍光法は感度が高い測定法ですが、これは目的とする蛍光物質以外のもの、つまり、サンプル自体の蛍光にも感度が高いことを意味します。阻害剤の場合、薬剤の入ったウェルのシグナルが、コントロールよりもはるかに高いといった結果になることさえあります。医薬品候補となる化合物は一般的に低波長に吸収があり、蛍光も比較的波長が短いため長波長の蛍光物質を検出に用いるのも自家蛍光を回避する一法です。この他蛍光の問題点を工夫した技術もありますが、蛍光物質あるいは測定装置が特殊なものになります。

## これから創薬を始める方へ [Vol. 3]

エヌイチ  
~ N=1 の恐怖! ~

次は**クエンチング**です。励起光が蛍光物質に届くまえに、あるいは蛍光 / 発光が検出器に届くまえにサンプルが光を吸収してしまういわゆる**カラークエンチング**。これは光吸収の問題で、吸光度測定が蛍光に比較して感度が悪いのと同様、サンプルの濃度が高い場合に影響を受けます。このカラークエンチングは測定前にウェルの色を見ると予想がつくことがあります。



もう一つが**ケミカルクエンチング**。検出反応系への影響 (多くの場合は阻害) です。たとえば検出反応に酵素を用いていれば、検出酵素阻害剤の影響です。ある目的の酵素の阻害剤探をする際、目的の阻害剤が存在するのであれば、検出に用いる酵素の阻害剤がないとは言い切れません。また検出系の反応時間等も長ければながいほど、影響が出る可能性も高まります。こういった問題は、サンプルの濃度は当然のこと、ライブラリーの性格にも依存するかもしれません。

こうしたことによる偽陽性は、求める活性ではないことを確認できるカウンターアッセイにより排除されるわけですが、偽陰性を最低限にすべく、やはり少しでも優れたアッセイ系が望まれます。

冒頭の「**N=1 の恐怖!**」から逃れるための一つの方法として、ホモジニアスアッセイをとりあげましたが、系を構築するにあたり、化合物の影響を十分認識せずにアッセイ系を構築し、実際にスクリーニングをはじめたらサンプルの影響に気がつくことがないように。せめて、「**N=1 の不安**」にしてスクリーニングを始めたいものです。

エヌイチ



プロメガクラブ：研究のボトルネック解消をお手伝い  
6つの会員特典あり、会員の声を反映しさらに進化を続けています。

会員 特価

新製品トライアル

入会方法はとっても簡単! 入会費・年会費はもちろん不要

限定品

イベント優先招待

まずは検索

プロメガクラブ

検索

RentaMax

ポイントプログラム



### プロメガクラブ瓦版のバックナンバー

これから創薬を始める方へ [Vol. 2]  
~ セルベースアッセイを始めるまえに ~

[www.promega.co.jp/pclub/kawara2/](http://www.promega.co.jp/pclub/kawara2/)



### なにになーに?!

ライフサイエンスの実験手法、用語など、今さら聞けないトピックスをほたるんとエビピンがまんがで解説!

[www.promega.co.jp/naninani/](http://www.promega.co.jp/naninani/)

# 最新 NanoLuc 技術だからできた 生細胞内タンパク質分子間相互作用とは？

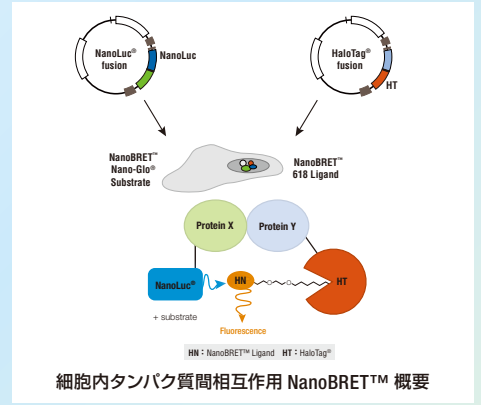
BRET

細胞内におけるタンパク質分子間相互作用 (PPI: protein-protein interaction) は、細胞分裂から細胞外刺激への応答など、すべての重要なイベントに関与しています。PPI をセルフリーの実験系で構築することが可能ですが、細胞内におけるタンパク質の環境とはかけ離れたものであり、やはり細胞内での PPI を観察することが重要になります。加えて近年、PPI は創薬の重要な標的として見直されており、細胞内 PPI の観察のニーズが高まってきました。

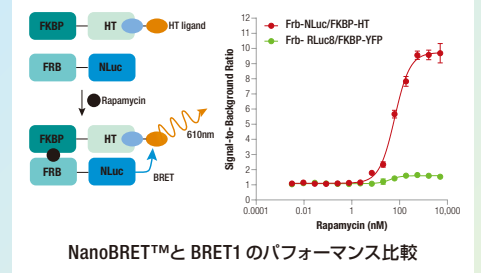
細胞内 PPI の観察のひとつにプルダウンアッセイが用いられてきましたが、細胞の溶解および洗浄操作により細胞環境が破壊されることが問題となります。また蛍光共鳴エネルギー転移法 (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) は、細胞内での PPI を観察することができます。これはある組み合わせの二つの蛍光物質を利用して、ドナーが光励起により得たエネルギーを近接したアクセプターに転移することによりアクセプターが発光するというものです。この FRET を利用して生細胞における PPI 検出が可能となりました。しかし、励起光による自家蛍光は高いバックグラウンドを引き起こすばかりでなく、評価化合物の自家蛍光、また励起光による光退色による感度の低下、あるいは光細胞毒性などの影響が問題になりました。X<sup>†</sup>らは、この FRET のドナーをルシフェラーゼに置き換えた生物発光共鳴エネルギー転移法 (BRET: Bioluminescence RET) 法を発表しました。ドナーにルシフェラーゼを用いることにより、励起光を用いることなく、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により得られたエネルギーを近接したアクセプターに転移します。しかしドナーとアクセプターのスペクトルのオーバーラップが大きい、発光が十分でない、アクセプターの特許および測定装置の特異性などの問題であまり使われることがありませんでした。

Promega では、BRET エネルギードナーとして独自の高発光ルシフェラーゼ NanoLuc<sup>®</sup> を、エネルギーアクセプターとして NanoBRET<sup>™</sup> 618 Ligand で標識された HaloTag<sup>®</sup> タンパク質を利用した NanoBRET<sup>™</sup> を開発しました。これにより本来の細胞内環境下で感度および再現性の高いタンパク質間相互作用の検出を現実的なものになりました。完全長のタンパク質を低レベルで発現させることにより、真の細胞生理を反映するタンパク質相互作用のモニタリングやスクリーニングに利用することができます。さらに、NanoBRET<sup>™</sup> を発展させて、タンパク質-低分子量間相互作用の検出にも応用し、Kinase、HDAC などのタンパク質に対する薬剤の結合を細胞内で観察する Target Engagement assay を確立しました。これを利用することにより、細胞内タンパク質に結合した薬剤のレジデンスタイムの計測への応用も可能になりました。

\* PNAS Vol. 96, 151-156 1999



細胞内タンパク質間相互作用 NanoBRET<sup>™</sup> 概要



NanoBRET<sup>™</sup> と BRET1 のパフォーマンス比較

## NanoBRET<sup>™</sup> Assay 生体内に近い創薬スクリーニング・ 阻害剤スクリーニングを実現

期間: 2015.9.28 ~ 12.20

NanoBRET<sup>™</sup>  
プレデザインキット  
のここがおすすめ!!

- 生細胞内でのタンパク質間相互作用を高感度に検出
- プレデザイン NanoBRET<sup>™</sup> 製品キットですぐ開始
- 薬剤評価スクリーニングに最適

がん研究・エピジェネティクス研究  
ご自身で目的の相互作用ペアを作製  
できる Starter kit もご用意。  
今なら 30% OFF

会員限定!

今なら

750,000 円

↓

525,000 円

プレデザインキット

製品名	カタログ番号	プロメガ会員特価
<b>プレデザインキット</b>		
NanoBRET <sup>™</sup> KRas/BRaf Interaction Assay	N1880	750,000 円 ↓ 525,000 円
NanoBRET <sup>™</sup> cMyc/MAX Interaction Assay	N1870	
NanoBRET <sup>™</sup> BRD 4/Histone H3.3 Interaction Assay	N1830	
NanoBRET <sup>™</sup> BRD 4/Histone H4 Interaction Assay	N1890	
NanoBRET <sup>™</sup> BRD 9/Histone H3.3 Interaction Assay	N1840	
NanoBRET <sup>™</sup> BRD 9/Histone H4 Interaction Assay	N1900	
NanoBRET <sup>™</sup> BRPF1/Histone H3.3 Interaction Assay	N1860	
NanoBRET <sup>™</sup> BRPF1/Histone H4 Interaction Assay	N1910	
NanoBRET <sup>™</sup> CBP/Histone H3.3 Interaction Assay	N1850	
<b>スターターキット</b>		
NanoBRET <sup>™</sup> PPI MCS Starter System	N1811	100,000 円 → 126,000 円
NanoBRET <sup>™</sup> PPI Flexi <sup>®</sup> Starter System	N1821	150,000 円 → 105,000 円

\* 上記すべての製品に p53/MDM2 が positive control として含まれます。

※ご注文の際は、必ず会員 ID 番号を明記ください。

左記以外の組み合わせも多数!

シグナル伝達関連・膜タンパク質・RNA  
結合タンパク質・その他エピジェネクス  
関連等。ご興味のある方は、弊社テク  
ニカルサービス (03-3669-7980) まで  
お問合せください。\*キャンペーン対象外

NanoBRET<sup>™</sup> には Discover がおすすめ!!

機器のない方は、無料機器貸出しサービス  
Rentamax をご利用ください。

詳しくはこちらから [www.promega.co.jp/rentamax/](http://www.promega.co.jp/rentamax/)

GloMax<sup>®</sup> Discover



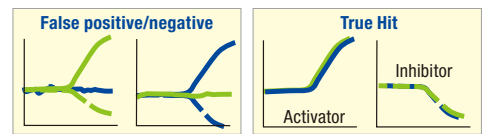
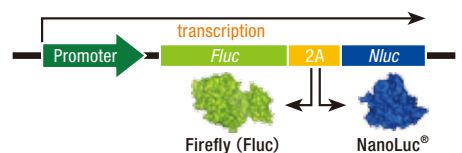
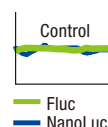
NanoLuc<sup>®</sup> レポーターアッセイをもっと高品質に! スクリーニングをされている方におすすめ!  
アクチベーター・インヒビター探索で偽陽性を見逃したくない方へ

## Fluc & Nluc のタンデムベクター

化合物スクリーニングにおける一つの大きな問題点として、偽陽性があります。レポーターアッセイにおいては、化合物がレポータールシフェラーゼの酵素活性あるいは細胞内安定性に影響を与えることにより偽活性を示すことが知られています。そこで Fluc と Nluc をタンデムに並べたベクターを開発、これを利用し、Fluc、NanoLuc<sup>®</sup> 活性を同時に測定することにより、Activator および Inhibitor 探索において、効率的に Hit 化合物を同定することができます。Fluc と Nluc はリボソームスキップ機構を引き起こす短い P2A 配列を挟んでおり、融合することなく、独立して発現します。

製品名	サイズ	カタログ番号	プロメガ会員特価
pNL Col1 [luc2-P2A-NlucP/Hygro] Vector	20 µg	N1461	95,000 円 ↓ 66,500 円
pNL Col2 [luc2-P2A-NlucP/minP/Hygro] Vector	20 µg	N1471	
pNL Col3 [luc2-P2A-NlucP/CMV/Hygro] Vector	20 µg	N1481	
pNL Col4 [luc2-P2A-NlucP/PGK/Hygro] Vector	20 µg	N1491	

※ご注文の際は、必ず会員 ID 番号を明記ください。



期間: 2015.9.28 ~ 12.20

**BMB2015**  
ランチョンセミナー

生細胞内タンパク質分子間相互作用研究に新技術登場!

## NanoBiT 新規な 2 分子相補システムを用いた 細胞内タンパク質分子間相互作用のモニタリング

発光

演者: Brock F. Binkowski, Ph.D.  
(Promega Corporation, Sr. Research Scientist)

本セミナーは、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) のランチョンセミナーです。

発表日 : 12月2日(水) 12:45 ~ 13:45 (ランチョンセミナー)

会場 : 第3会場(神戸ポートピアホテル本館 B1F 偕楽2)

プログラム No. : 2LS3

### 講演内容

タンパク質間相互作用 (PPI) は細胞内のシグナル伝達ネットワークの必須要素です。In vitro で PPI をモニタリングする方法は数多くありますが、細胞内で検出する方法はそれほど多くありません。我々は NanoLuc® ルシフェラーゼをベースにした 2 つのサブユニットシステムで細胞内での PPI 検出を可能にする NanoLuc® 2 分子テクノロジー (NanoBiT: NanoLuc® Binary Technology) を開発しました。Large BiT (LgBiT; 18 kDa) および Small BiT (SmBiT; 11 アミノ酸ペプチド) のサブユニットをそれぞれ標的タンパク質との融合体として発現させると、PPI が起こりサブユニットの相補性が促進され、発光酵素として明るい光を生じます。同様のアプローチであるシンプルに分割された酵素やタンパク質 (スプリット系) とは異なり、LgBiT は単独のサブユニットとして構造安定性を最適化し、SmBiT は PPI 用の特別なペプチドライブラリーより選別しました。結果として、従来のスプリット系と比べて大幅な活性低下を示さず、かつ親和性の低いサブユニットペアが得られました。多くのスプリット系とは対照的に LgBiT: SmBiT の相互作用は可逆的でタンパク質間の迅速な解離も検出することができました。細胞透過性の NanoLuc 基質 (フリマジン) を含む非細胞溶解性の検出試薬 Nano-Glo® Live Cell Assay System を用いてリアルタイムで生細胞内での PPI ダイナミクスを追跡することができます。スプリット系に対する利点としては、より優れた感度 (生理レベルに近い発現でも観察可能)、可逆性、片側の融合物がペプチド・低分子である点、構造安定性の高いタンパク質ドメイン、非細胞溶解アッセイフォーマットによるリアルタイム測定、自己会合を防ぐために低減されたサブユニットの親和性などが挙げられます。本セミナーでは NanoBiT テクノロジーの開発や数多くの PPI への応用についてご紹介いたします。

事前申込み開始! お申込みはこちらから↓

[http://promega.formstack.com/forms/lanchon\\_2015](http://promega.formstack.com/forms/lanchon_2015)



### プロメガセミナー & 交流会 招待状

## Promega Dynamic Connection

～ 高次元細胞アッセイ技術の展望 ～

日時: 2015 年 12 月 2 日 16:30 ~ (予定)

場所: 神戸ポートアイランド内会場

毎年 BMB/ 分子生物学会期間に開催している年に一度のセミナー & 交流会 Promega Dynamic Connection、今年は神戸にて開催いたします。

Promega Dynamic Connection...異分野の先生方同士の共同研究推進を目的とした会として始まり、今年で 6 回目となります。毎年様々な分野の先生方 60 名ほどが参加され、先生同士・弊社本社スタッフも交え活発な交流が交わられています。実際に、共同研究という形で多数の有益な繋がりが生まれています。今年も有益な時が過ぎますよう、企画しておりますので、ご興味のある方は、ぜひ左記 URL よりお申込みください。

お申込みはこちらから↓

[http://promega.formstack.com/forms/pdctouroku\\_2015](http://promega.formstack.com/forms/pdctouroku_2015)

プロメガクラブ会員を対象としたキャンペーンおよびプログラムです。  
ご利用になる際は、ホームページよりプロメガクラブにご登録し、  
プロメガクラブ ID 番号を取得してください。  
会員特典を利用する場合は、必ず ID 番号を明記ください。

クラブ会員の方に

## プロメガ社員がオススメする今注目の製品！

### 血漿からのセルフリー DNA 自動精製システム Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit

新製品  
No.1

- 高純度で精製可能
- カスタムで 4 mL 血漿にも対応
- 圧倒的に簡便 (前処理不要でダイレクトイン)



機器をお持ちでない方  
機器をご購入を検討中の方

機器をお貸しいたします  
(RentaMax プログラム)

がん研究者・診断検査分野ですすでに大評判！



### シングルセルからの全ゲノム DNA 増幅法 MALBAC Single Cell WGA Kit

新製品  
No.2

- シングルセルからの全ゲノム DNA 配列を均等に増幅
- 簡便・迅速な操作性  
(1チューブ、3ステップ、4時間で完了)
- 単一細胞からの増幅成功率は約 95%



ゲノムの 90% 以上の遺伝子座を増幅でき、ゲノムカバー率が最も優れています。

次世代シーケンサー (NGS) を用いた SNP 解析に！

## 秋のキャンペーン情報

期間：～ 2015.12.20 まで

**RentaMAX** (機器無料貸し出しサービス)  
**ありがとうキャンペーン**

会員特典

- 自動核酸精製装置 Maxwell® を購入すると、  
今なら連続作業に便利なカセットラックが  
もう1台付いてくる
- ルミノメーター・マルチプレートリーダーを購入すると、  
今ならルミノメーター性能判定用ライトプレートが付いてくる

13～15万円相当

詳しくは、こちらから ▶ [www.promega.co.jp/rentamax\\_arigato](http://www.promega.co.jp/rentamax_arigato)

**秋 わくわくキャンペーン**

会員はさらにお得

- 大人気 核酸精製 定量 増幅製品 が、**30% OFF** ～
- 1細胞からの全ゲノム DNA 増幅法 ～ MALBAC Single Cell WGA Kit ～  
50 回分 (Cat.no JYGK001B) **210,000 円** → **今なら 10 回分**  
が付いてくる！

詳しくは、こちらから ▶ [www.promega.co.jp/waukwaku\\_camp](http://www.promega.co.jp/waukwaku_camp)

**細胞アッセイ試薬年末キャンペーン**

会員はさらにお得

- 細胞の生死、代謝アッセイ試薬からレポーターアッセイ用  
ベクター、定量試薬まで
- 室温保存可能な使い易い細胞生存試験  
CellTiter-Glo® 2.0 も対象

詳しくは、こちらから ▶ [www.promega.co.jp/cellcamp/](http://www.promega.co.jp/cellcamp/)

お待たせしました！

**Flexi® クローン特別キャンペーン**

全ユーザー対象

- Flexi® ORF、Flexi® HaloTag®、Flexi® NanoLuc® クローンが  
**20～30%OFF**
- 新しい pH センサーを含む HaloTag® 蛍光リガンドもキャンペーン

詳しくは、こちらから ▶ [www.promega.co.jp/clones/](http://www.promega.co.jp/clones/)

**NanoDual Reporter Assay  
スターターセット**

全ユーザー対象

今なら  
内部標準ベクター + 定量試薬

こんな方におすすめ！

- 内部標準をより安定にしたい！
- 最高の感度・応答性を求めたい

**39,000 円**

詳しくは、こちらから ▶ [www.promega.co.jp/nanovspecial\\_starter.html](http://www.promega.co.jp/nanovspecial_starter.html)

**STOP! 細胞認証**

**ヒト細胞認証**

全ユーザー対象

～ JCRB 細胞バンクによる細胞認証！

今なら5検体で  
**10%OFF**

多くのジャーナルで論文投稿時に必要になっています。  
今ならマイコプラズマ簡易検査が付いてきます！

詳しくは、こちらから ▶ [www.promega.co.jp/hca/](http://www.promega.co.jp/hca/)

プロメガクラブウェブサイト： <http://www.promega.co.jp/promegaclub.html>

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

## プロメガ株式会社

本社 〒103-0011  
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル  
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011  
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室  
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2015年9月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店