

## カインेटリック解析でみえるもの [Vol. 9] ～ 細胞実験にタイムラインを～

細胞内では様々な反応が時々刻々とダイナミックに起こっています。数時間単位で変化する反応もあれば、分単位、秒単位で起こる反応もあります。細胞を用いた実験では、これらの反応後の1点の測定時間に絞ったエンドポイントアッセイが一般的です。系としてはシンプルですが、その反応が起こる過程をリアルタイムに検出・観察することにより、これまで見ていなかった現象が見えてくるかもしれません。

### 細胞生存性・毒性

細胞の毒性評価手法は MTT アッセイ法をはじめ、様々な改良が加えられ進化しています。近年、単にエンドポイントの細胞毒性を測定するだけでなく、経時変化を検出対象に加えることにより、より正確な毒性評価することが重要であると考えられてきています。図1では、ある細胞種に対する様々な薬剤の毒性評価を行っています。薬剤添加後の各タイムポイントにおいて、薬剤の potency と efficiency 両項目を合わせた activity area を毒性の指標として数値化しています。薬剤添加後 47 時間目のエンドポイントでは同等の毒性を示す薬剤でも、初期のタイムポイントでは毒性の大きさが異なることが分かります。つまり、タイムコースを測ることにより、薬剤の毒性をより正確に評価/分類できるということです。

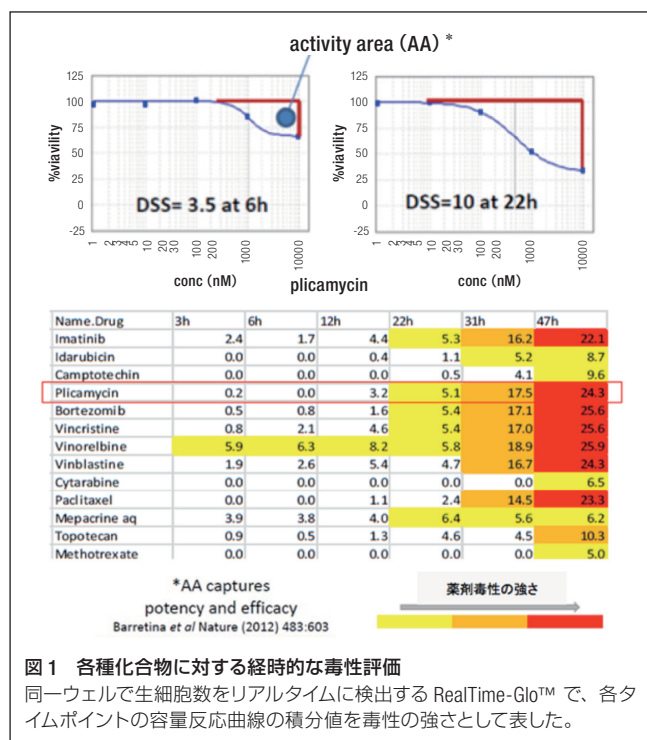


図1 各種化合物に対する経時的な毒性評価  
同一ウェルで生細胞数をリアルタイムに検出する RealTime-Glo™ で、各タイムポイントの容量反応曲線の積分値を毒性の強さとして表した。

### タンパク質間相互作用 (Protein-protein interaction, PPI)

このようなリアルタイムな実験系は、細胞内の分子間相互作用の解析にも有効です。細胞内では複数のタンパク質が相互に作用し、シグナルパスウェイの方向を決定したり、タンパク質自身の分解を促進したりと、その相互作用は細胞の運命を決定づける重要な役割を果たしています。PPI 解析の手法としては、プルダウンアッセイや免疫沈降法など、定性的な手法が主流です。これらの手法はエンドポイントであり、さらに一旦細胞を溶解させるので、生細胞中のダイナミックな変化を反映していない可能性があります。図2では、NanoBiT™ テクノロジーを利用して、生細胞における GPCR シグナルに関わる 2 タンパク質  $\beta$  2-adrenagic Receptor (ADRB2) と  $\beta$ -arrestin 2 (ARRB2) および Arginine vasopressin receptor 2 (AVPR2) と ARRB2 の相互作用をリアルタイムに定量しています。各受容体に対する Agonist 刺激により、数秒～数分でこれらの結合を誘導していることが分かります。また、AVPR2 と ARRB2 の相互作用は ADRB2 と ARRB2 の相互作用に比べ、緩やかに進行していることが分かります。このように、細胞内のシグナル伝達系など、数秒～数分で反応が起こる系ではカインेटリックアッセイは重要な要素となります。

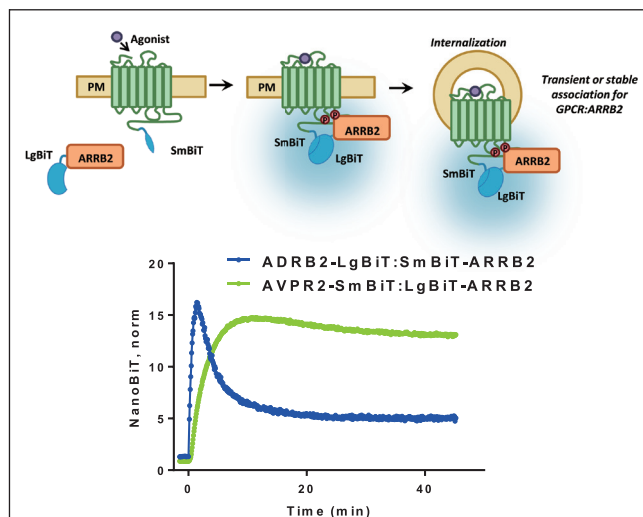


図2 NanoBiT™ を用いた GPCR シグナルタンパク質のリアルタイム相互作用解析

ADRB2、ARRB2、AVPR2 に Large BiT (LgBiT)、Small BiT (SmBiT) を融合し、細胞内で発現させた。ADRB2-ARRB2 および AVPR2-ARRB2 それぞれの相互作用を促進する薬剤添加後、これらの結合状態をリアルタイムに測定した。NanoBiT™ system とは、NanoLuc® luciferase を LgBiT と SmBiT に分割し、それぞれに目的タンパク質との融合タンパク質を細胞内に発現させ、相互作用が起こった場合のみ LgBiT と SmBiT が結合し、正常な Luciferase として働くシステム。

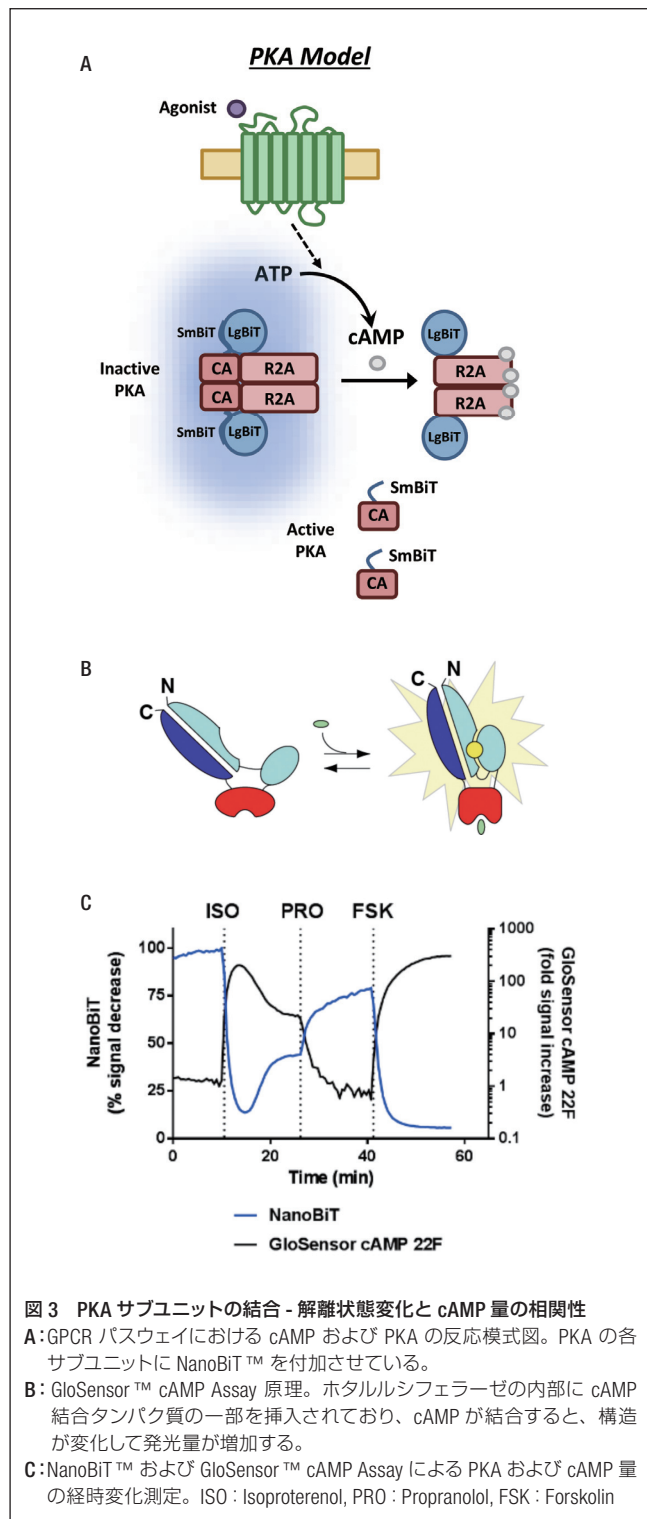


図3では、プロテインキナーゼ A (PKA) のサブユニットが GPCR パスウェイのセカンドメッセンジャーとしての cAMP 量の変化により、結合-解離する状態の変化(図3A)を、NanoBiT™ system を用いてリアルタイムに定量化しています。

また、このパスウェイで働くセカンドメッセンジャーとしての cAMP 量変化も、プロメガの GloSensor™ cAMP Assay により、リアルタイムで検出することができます(図3B)。図3Cのカイネティックアッセイの結果から、cAMP 量の変化が、PKA の状態変化に逆相関していることがわかります。このような迅速かつ可逆的な反応は、エンドポイントアッセイでは検出することは困難です。カイネティックアッセイを行うことにより、生細胞中の現象を正確に評価することが可能になります。

実験手法の進歩とともに、実験系とはいえ、より生体内に近い系が求められてきています。エンドポイントアッセイでは見えていなかった現象が明らかになるかもしれません。細胞実験にタイムラインを入れてみてはいかがでしょうか。