

## 出会いは別れより難し [Vol. 13]

### セルフリー系 PPI はシンプルだけに

たんぱく質分子間相互作用 (PPI) の実験を考えると、Binding assay を思い出します。Binding assay というと、受容体とそのリガンドの結合ですが、リガンドが大きい場合は、そのまま PPI といえます。

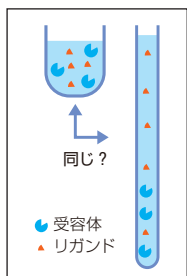
昔 RI を用いて Binding assay を行っている際に、結合様式を考えるうえで、いくつかの計算式を用いました。Binding assay で得られる 50% 阻害濃度  $IC_{50}$  は相対的なものなので、それを絶対的な値  $K_d$  あるいは  $K_i$  を算出するのに、Cheng-Prusoff の式 (式 1) が多用されています。 $K_d$  は、実験に用いる Ligand 濃度と、その Ligand の  $K_d$  に依存するという公式です。ところが、このもとをたどる (BBRC 66(2)1965 687-) と受容体の濃度も関係しているのです (式 2)。

$$IC_{50} = Ki \left( 1 + \frac{L}{Kd} \right) \dots \text{(式 1)} \quad L: \text{遊離リガンド濃度}$$

$$IC_{50} = Ki \left( 1 + \frac{L_f}{Kd} + \frac{R_f}{Kd} + \frac{3}{2} + \frac{LR}{Kd} \right) - IR \dots \text{(式 2)}$$

$L_f$ : リガンド総濃度  $R_f$ : 受容体総濃度  
 $LR$ : リガンド・受容体複合体濃度  $IR$ : 阻害剤・受容体複合体濃度

従って、Cheng-Prusoff の式が成り立つのは受容体濃度が無視できるほど低い、という前提があると私は考えています。昔はリコンビナントの受容体などなかったため、必然的に受容体濃度は低く、無視できました。ところが、今や受容体濃度が無視できないほど放り込むことができます。いつの間にか計算式が一人歩きをしてしまい、Cheng-Prusoff の式に従っているから大丈夫と考えられているようで仕方がありません。また Ligand-Receptor binding は、通常 Ligand を標識します。またシグナルの方向も明確です。一方、単に PPI というと、シグナルの方向性を考慮しないことがほとんどです。これらの式は、リガンドや受容体は濃度で示されており、前提としてどちらも均一に存在するというのが前提です。実験中に用いていた受容体である膜画分は、イン



キュベーション中に試験管の底に沈んでいきます。ふと思ったことは、正確には受容体は均一ではない。それどころか、細く長い試験管で実験したら、どうなるのでしょうか。このあたりも前提を無視しかねない状況です。もちろん結合を見るだけであれば、問題ありません。一方で、これを逆にとって実験の検出に利用することもできます。たとえば完全に均質系だと高濃度にしにくいものが、何かに固相化することにより局所的に高濃度になることで、親和性が低いものでも検出感度が上がりうる、というものです。

### 細胞内 PPI はセルフリーとは違う

PPI については、本来の結合が細胞内で起きている場合は、やはり細胞内で検出することも重要です。特に PPI 阻害剤などを考えるうえでは、膜透過性も同時に結果に反映されます。さらに対象のタンパク質は細胞内に均一に存在することは考えにくく、またセルフリーの試験管内とは全く異なる環境での会合を見ることができます。ところが、FRET や BRET は目的のたん

ぱく質をリコンビナントとして細胞内に発現させることにより、検出対象を細胞内に入れることができるという反面、細胞内の濃度をコントロールすることがきわめて難しい。そもそも細胞内で均一に存在すること自体がありえない。ここも細胞の実験のむずかしいところで、数式が入り込みにくいと考えています。

ところで、これは細胞内に限った話ではないですが、解離することよりも結合していることの証明は難しいと考えています。それは解離を観察するということが、結合を観察できていることが前提であるからかもしれません。まして細胞内でどのくらいの親和性をもって結合しているか、となるとセルフリーの感覚からすると想像できません。しかし、薬剤が細胞内 PPI を解離させる、あるいは会合させないということについては、細胞内薬剤濃度が細胞外と同一あるいは相関するという前提のもと、薬剤の強度を **定量性を持って** 見るすることができます。

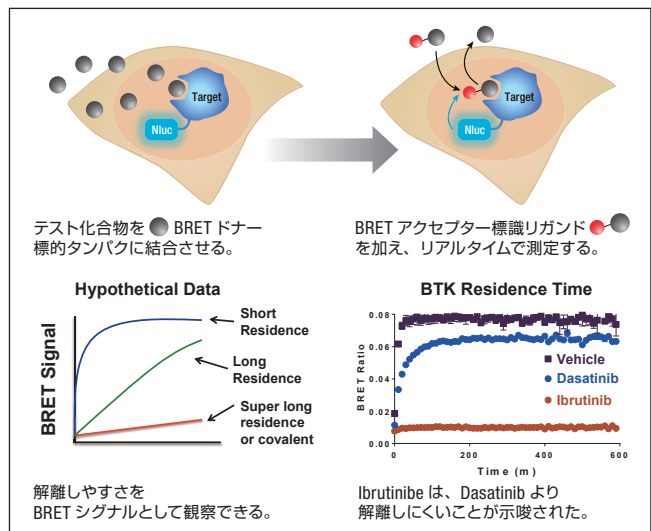
### 細胞内での薬剤の効果を評価する 別れ際が重要

さらに以前も記述しましたが、薬剤の薬効が細胞内での解離のしやすさと関連することが示唆されてきました。解離というのは、Ligand-Receptor binding 実験でいえばフリーのリガンドがない状態で行われますので、基本薬剤濃度に依存しません。そういった意味から、細胞内での薬剤の解離のしやすさ (滞留の程度) を見るができるようになったことは、薬剤開発のお手伝いができると考えられます。

出会いを見つけるよりも、別れの方がわかりやすい。これは分子や細胞レベルでも同じなのでしょう。

さて弊社では、タンパク質と低分子化合物の結合を細胞内で観察するためのキットを発売しました。まずは HDAC と Bromodomain のアッセイキットです。また、Kinase についてもカスタム品でご提供が可能です。内容は下記文献に詳細に記載されています。ご興味ある方はお問い合わせください。

Nature Communications 6 (2015), Article number: 10091



# 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

## テクニカルサービス

Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982  
 E-Mail : prometec@jp.promega.com