

Emerald Lucを用いたスプリットルシフェラーゼによるタンパク質相互作用検出系の構築とGPCRリガンドスクリーニングアッセイへの応用

株式会社Probe X 三浦 研二

はじめに

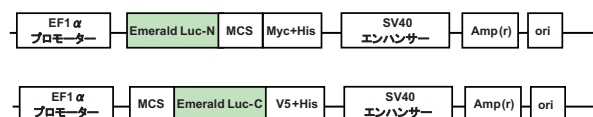
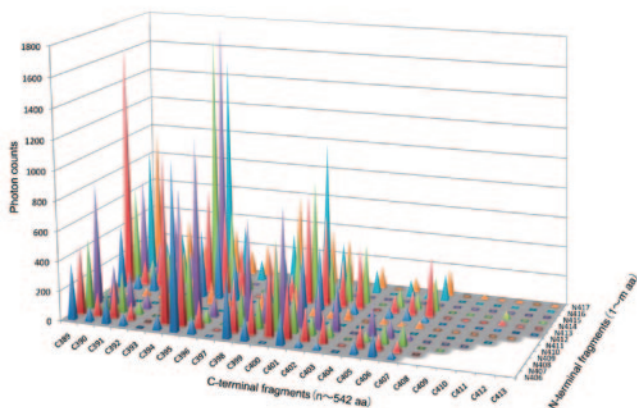
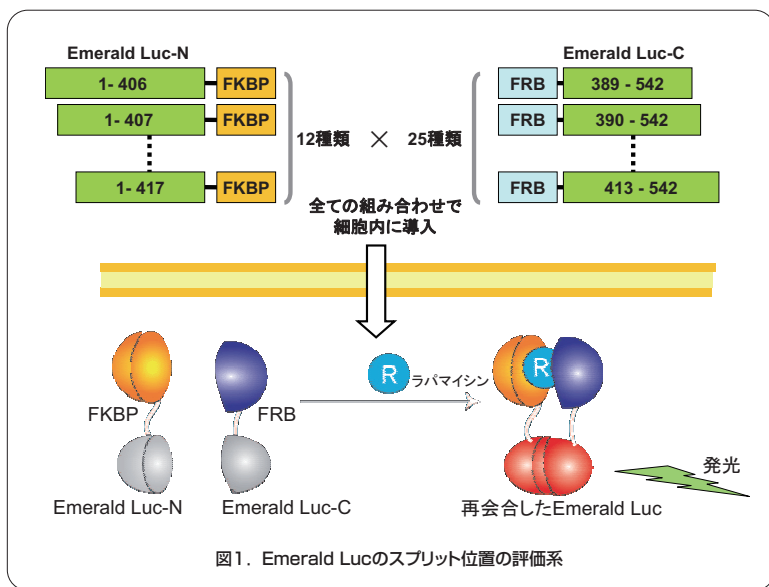
ルシフェラーゼリポーターアッセイは、*in vitro*アッセイ、セルベースアッセイ、*in vivo*イメージングなどに幅広く応用可能な基盤技術として発展を続けています。東洋紡が販売するEmerald Lucリポーターアッセイシステムは、発光強度が強くしかも長時間安定な発光を得ることができる特長があります。このたび、ProbeXではこのEmerald Lucを用いたスプリットルシフェラーゼによるタンパク質相互作用検出システムを開発し、販売を開始しました。スプリットルシフェラーゼとは、ルシフェラーゼ分子を2つの分子に分割（スプリット）し活性を失わせたものです。それらが再会合すると活性が復元することを利用し、時空間レベルでタンパク質相互作用を検出することができます。

1. Emerald Lucを用いたスプリットルシフェラーゼの構築

スプリットルシフェラーゼを構築する場合は、 β -ガラクトシダーゼのような他のタンパク質相補型システムと異なり、スプリット位置に重なりを持たせることが必要であることが知られています。しかし、強い発光を得るための最適な切断位置については詳細な知見がありませんでした。そこで、ProbeXではEmerald Lucについて種々の切断位置でスプリットした分子を作製し、網羅的な解析を行いました（文献1）。N-末端側分子として、1から406番目のアミノ酸までの分子をはじめとして一つずつアミノ酸を伸ばして、1から417番目のアミノ酸までの12種類の長さの異なる分子を発現する遺伝子を構築しました。また、C-末端側分子として、389番目のアミノ酸からC-末端までをはじめとして、やはり一つずつアミノ酸の長さを変えて413番目までのアミノ酸から

C-末端までの25種類の長さの異なる分子を発現する遺伝子を構築しました。そして、相互作用するタンパク質として、N末端側分子とFKBP、C末端側分子とFRBの融合タンパク質を発現するDNAをそれぞれ作製しました。これらの全ての組み合わせ全300通りをHEK293細胞にトランスフェクションし、ラバマイシン刺激によりFKBPとFRBの相互作用を惹起し、スプリットルシフェラーゼが会合して示す発光強度を測定しました（図1）。その結果、N末端側1-415アミノ酸（以後Emerald Luc-Nとします）C末端側394-542アミノ酸（以後Emerald Luc-Cとします）の組み合わせが最も強い発光を与えることがわかりました（図2）。

このEmerald Luc-NとEmerald Luc-Cのそれぞれについて、目的のタンパク質との融合タンパク質を発現させるベクターを構築しました（図3）。これらを用いることにより、様々なタンパク質の相互作用を検出する系を構築することができるようになりました。



2. GPCRリガンドアッセイ系への応用

GPCRは様々な生体内のシグナル伝達に関与し、創薬の標的分子として注目を集めています。GPCRは細胞外ドメインにリガンドが結合すると細胞内ドメインに β -アレシチンが結合しシグナルが伝達されます。ProbeXでは、このGPCRと β -アレシチンの相互作用とスプリットルシフェラーゼを組み合わせたGPCRリガンドアッセイ系を構築しました(文献1)。図4に示すように、目的とするGPCRのC末端にEmerald Luc-Cを融合した遺伝子、および β -アレシチンのN末端にEmerald Luc-Nを融合した遺伝子を作製して、両者を同時に細胞内に発現させます。この細胞にリガンドを添加すると、GPCRと β -アレシチンの相互作用によりスプリットルシフェラーゼが再会合し、発光が起こります。SSTR2についてのアッセイ系を構築し、リガンドとしてソマトスタチンを添加したところ、濃度に対して用量依存性の曲線を描くことができました(図5)。また、抗体組織染色法により分子の分布を調べると、リガンド刺激前のGPCR+Emerald Luc-C分子は細胞膜に、Emerald Luc-N+ β -アレシチン分子は細胞質にそれぞれ分布していましたが、リガンド添加により細胞質にあったEmerald Luc-N+ β -アレシチンは細胞膜に集まることを観察されました。また、その後、GPCRが細胞質に移行することも観察されました(図6)。これはルシフェラーゼ融合タンパク質を利用したアッセイ系がGPCR- β -アレシチン複合体の生体内の挙動を反映していることを示唆しています。

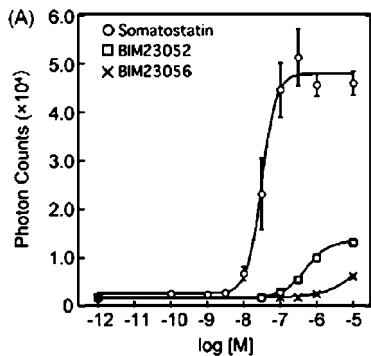
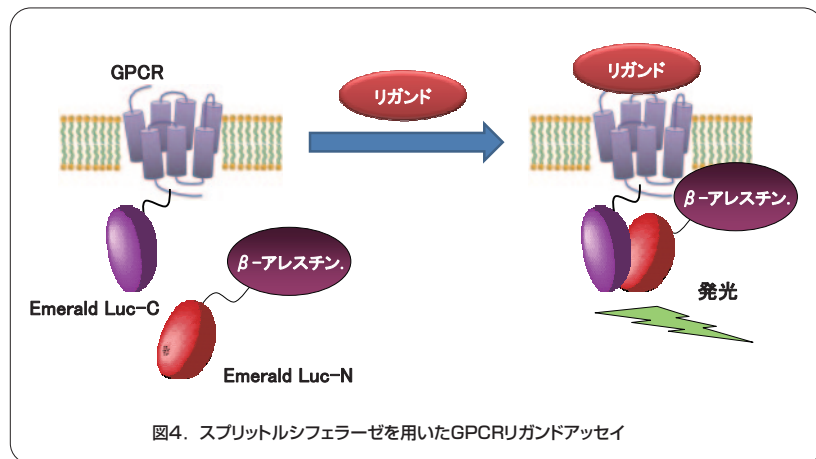
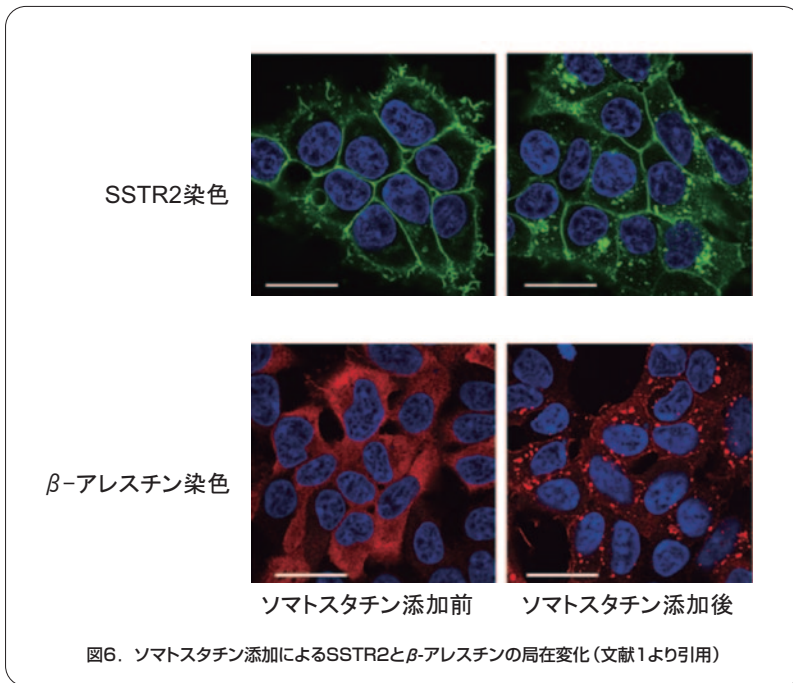


図5. SSTR2に対するソマトスタチンの用量反応曲線(文献1より引用)



3. ハイスループットスクリーニング系への応用

このGPCRリガンドアッセイ系をハイスループットスクリーニング(HTS)に適用するため、発光試薬とアッセイプロトコルの開発をおこないました。より高いS/B比を得るため、持続的に強い発光を可能とする試薬を東洋紡の協力を得て開発しました。すなわち、スプリットルシフェラーゼは、その発光強度に対する添加成分の影響が野生型ルシフェラーゼとは異なるため、スプリットルシフェラーゼ専用に成分調整を行ったSPLIT GLOW Cell Assay Reagentを開発しました。本試薬の発光は90分以上持続し(図7)、多数の検体を処理する場合でも、プレート内およびプレート間のバラツキを抑えることができます。また、96ウェルプレートに対応したプロトコルの最適化を行いました。この結果、ADBR2およびSSTR2のリガンドアッセイ系においていずれも、Z'が0.75以上となり、HTSに適用できることが示唆されました(表1)。

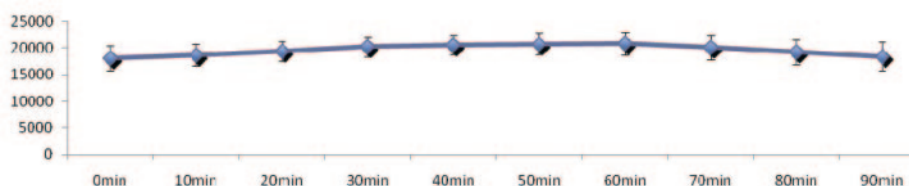


図7. SPLIT GLOW Cell Assay Reagentの発光持続性

表1. スプリットルシフェラーゼを用いたGPCRリガンドアッセイの性能

	シグナル値			Z'	
	平均	標準偏差	CV (%)		
SSTR2	陰性	1,072	132	12.3	0.77
	陽性	87,300	6,344	7.3	
ADRB2	陰性	510	67	13.1	0.78
	陽性	47,433	3,318	7.0	

4. ProbeXのスプリットルシフェラーゼタンパク質相互作用アッセイ系サービス

ProbeXでは種々のGPCRについてリガンドアッセイ用安定発現細胞株をご用意しております(表2)。ほとんどの細胞でS/B比は40以上となっており安定的にアッセイを行っていただけます。その他のGPCRについても、ProbeXにて安定発現細胞株の作製を受託いたします。また、GPCR-リガンドアッセイ系以外にも、Hif1 α およびHif1 β の会合のような細胞質タンパク質同士の相互作用検出などで実績があります。ご希望のアッセイ系を作製いたしますので、是非ご相談ください。

表2. ProbeXのGPCRリガンドアッセイ用安定発現細胞株

GPCR	Class	S/B	
		ARRB1	ARRB2
ADCYAP1R1	Gs	42.8	—
ADRA2A	Gi	—	11.8
ADRB2	Gs	74.4	71.9
AGTR1	Gq	271.0	9.8
AGTRL1	Gi	117.2	90.5
CCKBR	Gq	—	46.0
EDG1	Gi	47.5	32.4
EDG3	Gi	—	41.9
ENDRA	Gq	107.2	44.5
ENDRB	Gq	45.2	46.2
OPRM1	Gi	982.2	52.1
SSTR2	Gi	166.8	105.5

おわりに

ルシフェラーゼによる発光をリポーターとする検出系は、蛍光をリポーターとする検出系と異なり励起光を必要とせず、また長波長の光を利用できることから、*in vivo*イメージングにも適しています。ProbeXではスプリットルシフェラーゼタンパク質相互作用アッセイを*in vivo*イメージングに適用する取り組みも行っています。今後も本アッセイ系は多様な分野での活用が期待されています。

文献

1. N.Misawa, A.K.M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and T. Ozawa, *Anal. Chem.*, **82**, 2552-2560 (2010)

お問い合わせ先 株式会社 ProbeX
 東京都文京区本郷4丁目1番4号 コスモス本郷ビル4F
 tel : 03-5842-3204
 mail : info@probex.jp