

SLAS2017 プロメガポスター概要

#1276 Autophagic Flux Assay for HTS Measured with a Plate-Reading Luminometer

2016年にノーベル賞医学・生理学賞の受賞となったオートファジーを評価するシステムです。

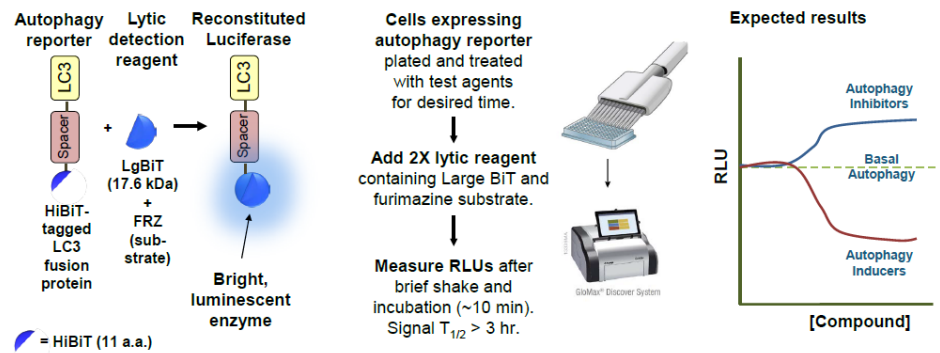
オートファジーは細胞内のタンパク質等の分解に深く関与しており、オートファジーの破綻が疾患に結びつく事が分かってきています。

このシステムには相補的な NanoLuc ルシフェラーゼの結合システム NanoBiT (NanoLuc Binary Technology) の原理を応用した、多機能発光タンパクタグ HiBiT の技術が活用されています。

オートファジーのマーカーである LC-3 タンパクと HiBiT を融合タンパクとして細胞内に発現させます。

オートファジーが進むと LC-3 タンパクが分解されるため、システムに付属する試薬を用いて、セルライゼートを作製。HiBiT-LC-3 の発光の変化よりオートファジーの活性を評価します。

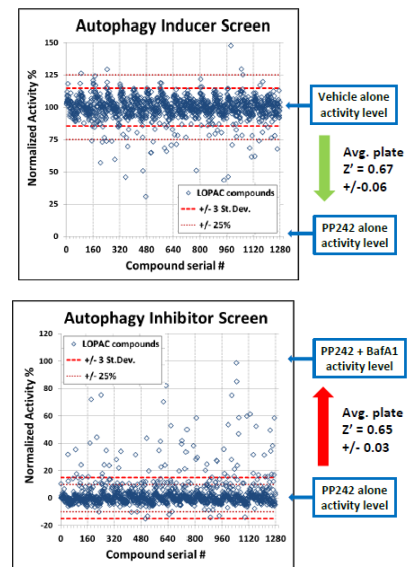
(HiBiT の詳細に関しては#1282 A Peptide Tag for the Simple and Sensitive Bioluminescent Quantification of Proteins をご覧ください)



これまでのオートファジー評価法では、下記のデメリットがありました。

- ・ 蛍光測定となり、定量化が難しい
 - ・ 測定するには機器を選ぶ
- 一方で Autophagic Flux Assay には下記のメリットがあります。
- ・ 発光測定となるためウェル全体の測定が可能
 - ・ 定量が容易
 - ・ 特殊な機器は必要なく、プレートリーダーでの測定が可能。

High Throughput Screening(HTS)のモデルケースも示しており、オートファジー活性を制御する因子の探索等にも活用可能です。



SLAS2017 プロメガポスター概要

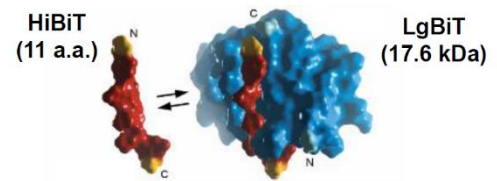
#1282 A Peptide Tag for the Simple and Sensitive Bioluminescent Quantification of Proteins

プロメガは相補的な NanoLuc ルシフェラーゼの結合システム NanoBiT (NanoLuc Binary Technology) の原理を応用した、多機能発光タンパクタグ HiBiT を開発しました。HiBiT は 11 アミノ酸からなるタグです。目的タンパクに HiBiT タグを付加し、相補的な LgBiT と発光基質タグを試薬として添加することにより発光します。これを利用し、細胞溶解液中またはブロットティングメンブレン上の目的タンパクの定量、生細胞での細胞膜タンパクや分泌タンパクの定量、細胞融合やウイルス感染の定量など、様々なアプリケーションへの応用が可能です。また HiBiT のサイズの小ささから、CRISPR などのゲノム編集への応用も期待されます。

特長

- ・ HiBiT (11 amino acids)
- ・ High affinity association with LgBiT ($K_D = 700 \text{ pM}$)
- ・ Applications:

- 1) **HiBiT Lytic Assay:** 細胞溶解液中の目的タンパクの定量
- 2) **HiBiT Blotting:** ブロットティングメンブレン上の目的タンパクの検出 < 3 minutes
- 3) **HiBiT Extracellular Assay:** 生細胞での細胞膜タンパク、分泌タンパク発現量の定量
- 4) **HiBiT Intracellular Assay:** 生細胞での細胞内タンパク定量、細胞融合、ウイルス感染定量など



#1346 Bioluminescent Assays Facilitate Screening for Effectors of Glucose Metabolism

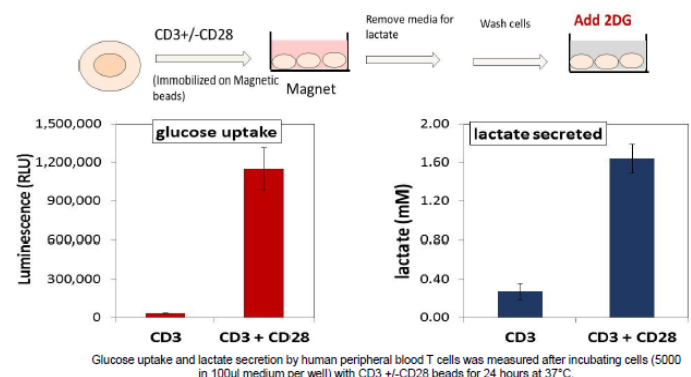
代謝活性や代謝経路の変化やがん、肥満・糖尿病、神経、発生、免疫など幅広い分野で注目を得ている領域です。今回、解糖系の主要な代謝産物であるグルコースと乳酸の測定に特化した種々のアプリケーションが発表されました。

このポスターでは主に下記の 4 つのデータを示しています。

- ・ 脂肪様細胞に分化誘導した細胞(3T3-L1 MBX)でのインスリン刺激によるグルコース取り込み能の変化
- ・ がん細胞株のグルコース消費と乳酸の分泌の測定
- ・ 活性化した T 細胞の解糖系の評価
- ・ High Throughput Screening(HTS)のモデルケース

HTS のモデルケースでは、384well plate にて 1280 化合物(LOPAC1280)を用いて解糖系に影響を与える化合物を乳酸の分泌量で評価しています。

発光での測定は優れたシグナル、S/B 比を示し、幅広いアッセイに対応可能であることを示しています。



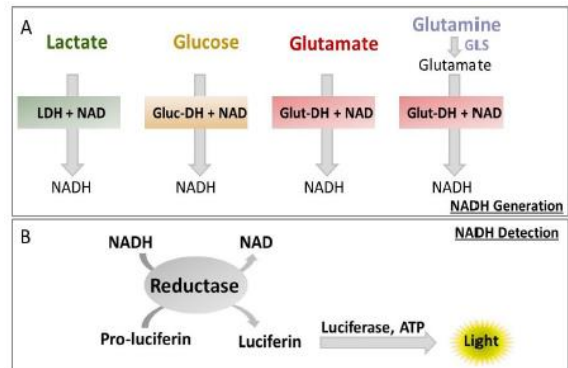
SLAS2017 プロメガポスター概要

#1160 Cell Metabolism HTS assays: Glucose, Lactate, Glutamine, and Glutamate detection.

グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸は細胞における主要な栄養因子であるとともに、これらの因子の細胞内外のバランスの変化は細胞の性質に大きな影響を及ぼします。プロメガでは発光測定技術を元に、これらの細胞内外の因子を測定する技術(LGGG アッセイ; Lactate 測定アッセイ、Glucose 検出アッセイ、Glutamine 検出アッセイ、Glutamate 検出アッセイ)を確立しています。

今回はこの技術を活用し、384wellでの細胞外のHTSモデルおよび、細胞内のHTSモデルを示しました。

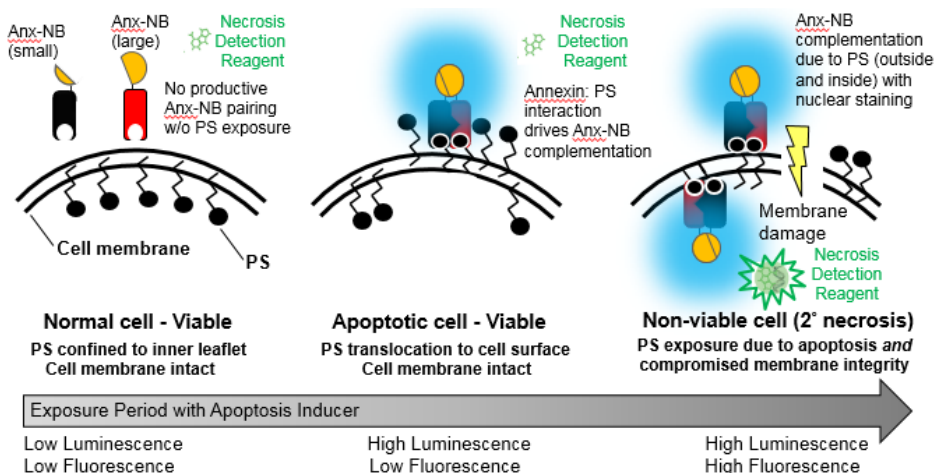
加えて、HTSでは化合物による細胞への影響が懸念事項になります。LGGGアッセイは発光での生細胞試験と組み合わせる事も可能であり、発行測定の良さを活かし、384well フォーマットなどでの高感度な測定が可能です。



#1143 A Real-Time, Bioluminescent Annexin V Assay for the Assessment of Apoptosis

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis Assayはリアルタイムにアポトーシスを検出するキットです。従来のAnnexin Vを利用したアポトーシス検出法と、プロメガの相補的なNanoLuc ルシフェラーゼの結合システム NanoBiT (NanoLuc Binary Technology) の原理を組み合わせたシステムです。アポトーシスネガティブの状態では膜非透過のAnnexin V-NanoLuc融合タンパク (Anx-NB (small)& Anx-NB (large)) 間では相補結合しないため発光は生じませんが、アポトーシスにより生じるphosphatidylserine(PS)が膜外側に転移する現象により、PSとAnnexin V-NanoLucが結合し、更にNanoBiTの相補結合が生じ、発光します。培養開始時の1回添加のみで48時間

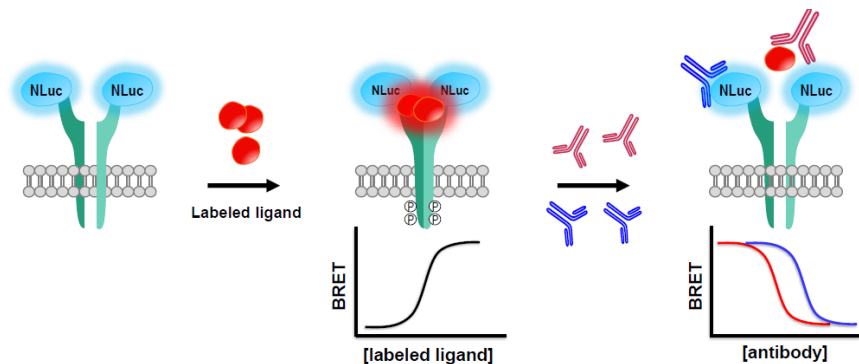
までのリアルタイム測定が可能です。また、膜非透過型核酸結合蛍光色素とともに使用することで、ネクローシス検出のマルチアッセイも可能です。本ポスターではアポトーシス、ネクローシスのリアルタイムマルチアッセイ、48時間のリアルタイムデータ、Caspase-Gloとの相関、発光イメージングのデータを掲載しています。



SLAS2017 プロメガポスター概要

#1212 Cell-Based BRET Assays for Quantifying Antibody Mediated Blocking of Receptor-Ligand Interactions

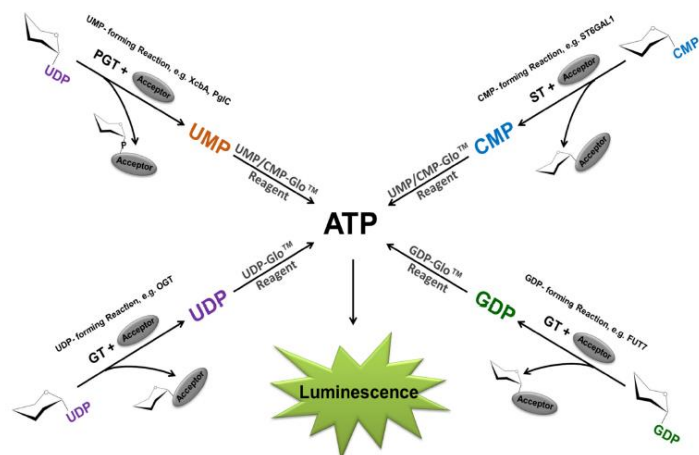
抗体医薬を用いた疾患治療は創薬におけるトレンドとなっています。抗体医薬として使用される抗体には、特定の受容体とリガンドのブロッカーとして働く作用機序のものがあります。このような抗体のスクリーニングのため、BRET 法を用いて生細胞で迅速に定量できるシステムを開発しました。



受容体タンパクに NanoLuc 発光タンパク、リガンドに蛍光 Dye を付加し、それらの結合を BRET により定量化します。リガンドへの蛍光ラベルは通常ランダムに付加する方法が一般的で、これにより受容体結合に対する阻害が生じていました。今回紹介しているリガンドの選択的な付加方法を用いることにより蛍光付加による結合阻害を最小限に抑えることができます。本ポスターでは上記方法により付加した蛍光リガンドと、膜受容体タンパク EGF, PDGFB, VEGF-A165 の結合に対する、各種抗体医薬の阻害作用を評価しています。本システムにより、抗体医薬の初期スクリーニングおよびその開発への応用が期待されます。

#1243 Screening for glycosyltransferase activity inhibitors with homogeneous bioluminescent nucleotide detection assays

糖転移酵素 (GT) は様々な生物学的プロセスにおいて中心的な役割を果たす重要な酵素であり、糖尿病・炎症・感染症などの分野では魅力的な創薬ターゲットです。しかし従来のアッセイ方法はスクリーニングに適しておらず、創薬開発が遅れていました。このポスターでは、糖転移反応の産物である UDP、GDP、UMP、CMP などのヌクレオチドを ATP に変換し、発光で検出する新たな糖転移酵素アッセイ法を紹介します。簡便、高感度なアッセイであり、基礎研究からスクリーニングまで幅広い目的に使用できます。



(キーポイント)

- 簡便：酵素反応後、検出試薬を 1:1 で混合、60 分後に発光測定するだけ
- 高感度：ヌクレオチド数 nM から数十 μ M の広いアッセイレンジ
- HTS 対応：384-well plate にも対応
- Non-RI、HPLC 不要でルミノメーターだけで測定可能

SLAS2017 プロメガポスター概要

#1211 Bioluminescent succinate detection enables inhibitor screening of 2-oxoglutarate dioxygenase target class of enzymes

Succinate-Glo は、代謝産物として Succinate (コハク酸) を生じる脱メチル化酵素のアッセイシステムです。

このポスターでは、JumonjiC ヒストン脱メチル化酵素での事例に加え、タンパク質・DNA・RNA

の水酸化酵素 / 酸化還元酵素の測定事例を紹介しています。酵素活性測定に加えて酵素速度論的解析

や、阻害剤の阻害様式の検討 (Fe(II)または 2-oxoglutarate 競

合的か) にも使用可能です。

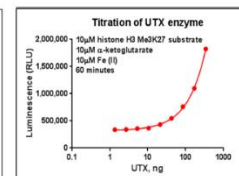
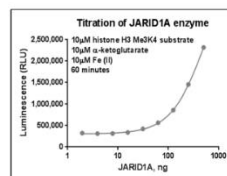
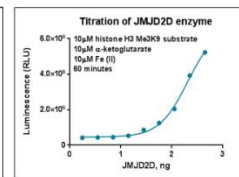
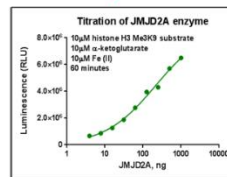
(キーポイント)

(キーポイント)

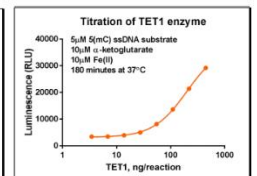
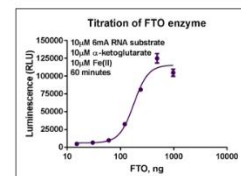
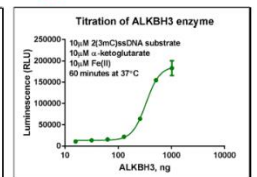
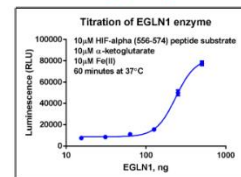
(キーポイント)

- ヒストン、DNA、RNA、その他タンパク質の脱メチル化酵素アッセイ (産物として Succinate を生じるもの)
- 高感度: Succinate として 200nM ~ 15 μ M、ng オーダーの酵素量でアッセイ可能
- HTS 対応: 384-well plate にも対応
- Succinate-Glo 試薬は化合物による偽陽性・偽陰性が少なく、化合物スクリーニングにも最適

JMJC Histone Lysine Demethylases



Protein, DNA and RNA Hydroxylases/Dioxygenases



#1210 Bioluminescent kinase profiling systems for characterizing small molecule kinase inhibitors

Kinase Selectivity Profiling Systems は、ADP-Glo™ Kinase Assay テクノロジーをベースにした easy-to-use のキナーゼ選択性プロファイリングシステムです。各システムにはキナーゼ、基質のペアが含まれており、使いやすい 8 チューブストリップフォーマットで提供されるため研究室で簡単にプロファイリングを行えます。

このポスターでは脂質キナーゼである PI3K ファミリーのプロファイリングデータと、FDA 承認薬 16 種を用いたプロファイリング事例を紹介します。

(キーポイント)

- Kinome を網羅: 合計 112 種のヒト由来キナーゼプロファイリングを In-house で実施可能
- 高い信頼性: データのブレが少ない小分け使い切りタイプ
- アッセイ条件最適化済み: 全キナーゼで S/B > 10 のシグナルが出る条件に最適化

