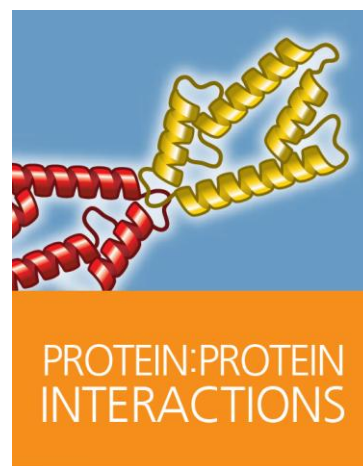


# Alpha Protein-Protein Interaction ユーザーガイド



## 目次

1. はじめに .....	3
2. アッセイ系の構築 .....	4
2.1 ビーズの選択 .....	4
2.1.1 AlphaLISA vs. AlphaScreen ビーズ .....	4
2.1.2 ビーズの種類 .....	4
2.2 バッファの選択 .....	9
2.2.1 一般 .....	9
2.2.2 Alpha に干渉する成分 .....	10
3. アッセイ系構築の条件検討 .....	12
(精製タンパク質を使った、タンパク質・タンパク質相互作用アッセイ) .....	12
アッセイ系の検討を始める前に: .....	12
3.1 タンパク質濃度曲線の作製 .....	12
3.2 抗体を使ってタンパク質相互作用を検出する時 .....	15
3.3 試薬の添加順序 .....	16
3.4 タンパク質・タンパク質相互作用の検証 .....	17
4. $K_d$ を求める .....	19
4.1 飽和曲線から $K_d$ を求める .....	19
4.2 競合曲線から $K_d$ を求める .....	20
5. 細胞ベースのアッセイ .....	22
5.1 タグ付きタンパク質を過剰発現させた、細胞ベースのタンパク質・タンパク質相互作用アッセイ .....	22
5.1.1 タグの種類と付加する位置 .....	23
5.1.2 発現ベクターの構築 .....	23
5.1.3 一過性発現 .....	23
5.1.4 細胞の前処理・刺激 .....	24
5.1.5 細胞溶解液の調製 .....	24
5.1.6 タンパク質発現量の確認 .....	25
5.1.7 共発現タンパク質の相互作用アッセイ .....	27
5.2 内在タンパク質の、細胞ベースタンパク質・タンパク質相互作用アッセイ .....	29
5.2.1 抗体ペアの選択 .....	29
5.2.2 抗体の標識 .....	29
5.2.3 細胞溶解液の調製 .....	30
5.2.4 タンパク質の発現量の確認 .....	30
5.2.5 内在タンパク質の相互作用アッセイ .....	30
5.3 タグなし組換えタンパク質の、細胞ベースタンパク質・タンパク質相互作用アッセイ .....	31
5.4 細胞ベースアッセイの参考文献 .....	32
Alpha タンパク質・タンパク質相互作用アッセイ;クイックスタートガイド .....	33
はじめに: .....	33
Biochemical Assay .....	33
Cell-based Assays .....	34
Lysis Buffer の選択 .....	34
目的タンパク質の発現確認 .....	34
細胞ベースの相互作用アッセイプロトコール .....	34
得られた相互作用シグナルの検証 .....	35
マイクロプレート .....	35
アッセイのスケールアップ、スケールダウン .....	35
References .....	36

## 1. はじめに

Alpha (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) は、マイクロプレート上で分子間の相互作用を検出する、ビーズを使ったテクノロジーです。この方法は、1996年に Ulman らによって LOCI 法として報告されました。パーキンエルマーは、研究用試薬として独占販売権を有し、ビーズおよび関連試薬を販売しています。

Alpha は、「混ぜるだけ」で洗浄操作を必要とせず、「ドナー」と「アクセプター」の 2 種類のビーズを使用します。このビーズに結合したタンパク質などの分子同士の相互作用によってビーズが近接し、片方のビーズからもう片方のビーズへと化学反応が進行し、発光シグナルが得られます。

ドナービーズには光感受性物質であるフタロシアニンが含まれ、これは 680 nm のレーザー光によって励起され、周囲の酸素分子を一重項状態に変換します。この一重項酸素の半減期は 4 マイクロ秒で、約 200 nm 水溶液中を拡散します。アクセプタービーズが分子間の相互作用によってドナービーズの 200 nm 以内に存在していると、ビーズに含まれている化学発光伝達物質チオキサンと一重項酸素が反応し光 (AlphaScreen ビーズでは 520-620 nm、AlphaLISA ビーズでは 615 nm) を発します。

ドナービーズとアクセプタービーズが近接していない時には、一重項酸素はアクセプタービーズと反応することなく速やかに基底状態に戻り、発光を得ることができません。

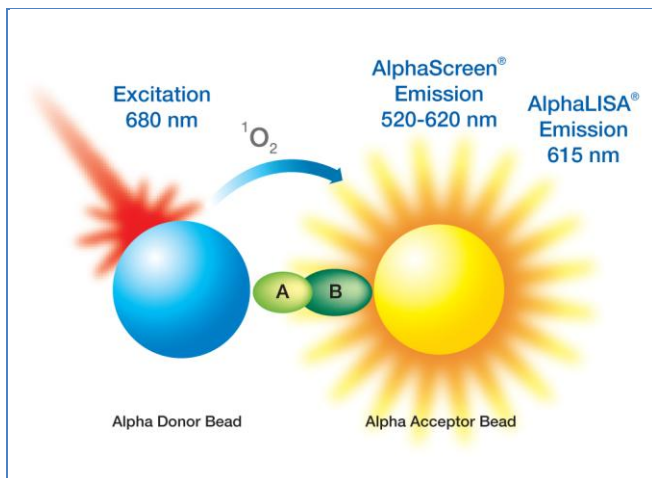


図 1: Alpha による分子間の相互作用検出の原理

ドナービーズ上に結合した分子 A と、アクセプタービーズ上に結合した分子 B が相互作用すると、シグナルが検出されます。ドナービーズは、1 秒間に 60,000 もの一重項酸素を発生させます。一重項酸素と反応したアクセプタービーズ内で生じる発光エネルギーは、同じくアクセプタービーズ内にある蛍光物質に転移され、光を発します。

以下では、タンパク質・タンパク質相互作用 (PPI) における Alpha の特長を記載します。

### 1. 分子サイズの大きなタンパク質も検出可能

一重項酸素は、最低 200 nm 水溶液中を拡散します。直径約 20 nm のヒト IgG を考慮すると、複数の抗体を介したイムノアッセイも構築可能です。

分子間相互作用を検出法として広く知られている FRET 法は、実際には約 9 nm がエネルギー転移の限界と言われています。また、FRET では双極子の配置も重要な要素ですが、異なる原理の Alpha は、これらの影響を受けません。

### 2. 多様な分子間相互作用を検出可能

上述のように、ドナーとアクセプター間の距離が広くてもシグナルを検出できるため、タンパク質・タンパク質、タンパク質・ペプチド、タンパク質・DNA (あるいは RNA) の相互作用アッセイも可能です。

さらに、タンパク質・糖鎖、タンパク質・低分子、受容体・リガンド、核内受容体・リガンドなどのアッセイも行うことができます。

このため、ELISA、ファージ ELISA、ゲルシフトアッセイなどを Alpha に置き換えることが可能です。

### 3. 低親和性の相互作用も検出可能

洗浄によって流れてしまう低親和性の相互作用も検出可能です。たとえばハイブリドーマスクリーニングで、ELISA よりも多くのポジティブクローンを得ることができます。

加えて、ビーズ 1 分子あたり、ストレプトアビジンで約 3,000 分子、IgG では約 300 分子が結合しています。このため、ビーズ付近では分子が高濃度に密集し、大量に目的分子を加えなくとも、nM~low mM の相互作用を検出可能です。事実、nM 程度の分子を加えて  $\mu$ M オーダーの相互作用を検出しています。

### 4. 簡単な操作

「混ぜるだけ」のため、洗浄が必要ありません。

### 5. 高感度・低バックグラウンド

1) 時間分解測定法 (励起光を照射し自家蛍光が消失した一定時間経過後、Alpha の光を検出する)、2) 励起波長より短波長の検出波長 (蛍光は必ず励起波長よりも長波長の検出波長になるため、たとえ自家蛍光が発生しても、Alpha の光を阻害しない)、3) 近赤外波長 (自家蛍光の多くは緑色域である。)、の 3 つを組み合わせた Alpha は、プレートやサンプルからの自家蛍光の影響をほとんど受けません。

## 2. アッセイ系の構築

タンパク質・タンパク質相互作用アッセイを構築するには、以下のファクターを考慮する必要があります。

### 2.1 ビーズの選択

#### 2.1.1 AlphaLISA vs. AlphaScreen ビーズ

Alpha のドナービーズは 1 種類ですが、アクセプタービーズには、使用している発光物質が異なる AlphaScreen アクセプタービーズと AlphaLISA アクセプタービーズの 2 種類があります。AlphaScreen ビーズの発光物質には、520 nm から 620 nm の間に発光のピークを持つルプレンが使用され、AlphaLISA ビーズには、615 nm に鋭いピークを示す Eu キレートが発光物質として使用されています(図 2)。このため、AlphaLISA ビーズのほうがバッファーや化合物、特に血液に含まれるヘモグロビンなどの干渉の影響を受け難い特性を持っています。

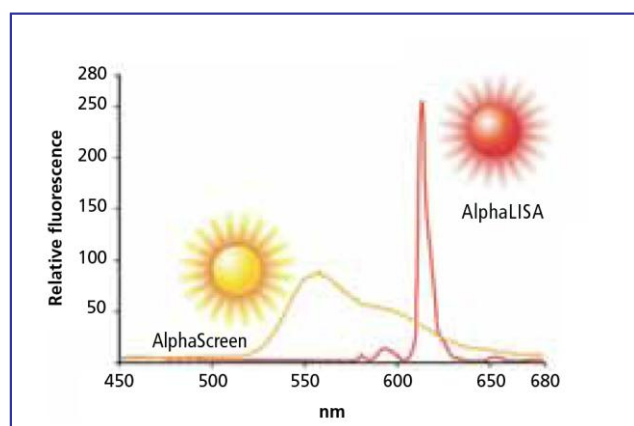


図 2; AlphaScreen アクセプタービーズと、AlphaLISA アクセプタービーズの発光スペクトル

そのほか、タグ抗体や抗 IgG 抗体などでコーティングされたビーズのラインナップが、AlphaScreen と AlphaLISA ビーズでは異なります。このため、構築するアッセイ系に応じてビーズを選択します。

- AlphaLISA ビーズ  
Alpha Tool Box にラインナップされているドナービーズと組み合わせて使用できるよう、個別に販売しています。別途、ドナービーズもご用意頂きます。

- AlphaScreen ビーズ  
Alpha Tool Box にラインナップされているほとんどが、ストレプトアビジジンドナービーズとセットになったキットです。キットには、バッファー、ビオチン化されたポジティブコントロールも含まれています。

#### 2.1.2 ビーズの種類

Alpha Tool Box のラインナップを表 1 に記載します。アッセイに使用するタンパク質のタグに応じて適したビーズをドナービーズ、アクセプタービーズともに選択頂けます。使用するタンパク質にタグがない場合は、たとえば抗体などを使用してタンパク質を捕捉し、Protein A コートビーズなどを使用してビーズに結合させます。また、未標識ビーズを用いて、ビーズに直接結合させることも可能です。結合可能な分子は、タンパク質、抗体、DNA、レクチンなどです。未標識ビーズは、デキストランポリマーでコーティングされており、アルデヒド基を持っています。アルデヒド基はタンパク質などのアミノ基と反応します。ビーズへの抗体などの結合方法は、「AlphaLISA Assay Development Guide」をご参照ください。未標識ビーズに結合させたほうが良いか、プレーコートされたビーズを使用したほうが良いかは、以下のビーズの結合キャパシティを参考に選択頂けます。

#### ビーズの結合キャパシティ

タンパク質・タンパク質相互作用において、相互作用しているタンパク質複合体の量は反応系における個々のタンパク質量に依存します。タンパク質濃度が増加すれば、生成物である相互作用複合体へと平衡が移動します。

$$A + B \rightleftharpoons AB$$
$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

Alpha ビーズそれぞれの結合キャパシティを表 2 に記載します。この表の結合キャパシティとは、タンパク質とビーズの結合が飽和状態にあり、さらにタンパク質を加えてもビーズには結合しない、タンパク質濃度のことです。たとえば抗 GST 抗体ビーズの場合は、ストレプトアビジジンドナービーズとビオチン化 GST、抗 GST 抗体アクセプタービーズを使用して、アッセイを行ったときに最大のシグナルが得られたビオチン化 GST の濃度を結合キャパシティとして表示しています。このとき、ドナービーズが Ni キレートドナービーズに変わると、結合キャパシティは変化します。

コーティングの種類	ドナー ビーズ	アクセプタービーズ		AlphaScreen Bead kits (ストレプトアビジンドナービーズと、AlphaScreen アクセプタービーズ、ビオチン化コントロールを含む)
		AlphaScreen	AlphaLISA	
Streptavidin	6760002		AL125	
<i>Strep-Tactin</i> ®	AS106		AL136	
Anti-GST			AL110	6760603 (Streptavidin Donor + Anti-GST Acceptor)
Glutathione	6765300		AL109	
Ni chelate	AS101		AL108	6760619 (Streptavidin Donor + Ni chelate Acceptor)
Anti-His			AL128	
Anti-c-myc			AL111	6760611 (Streptavidin Donor + anti-c-myc Acceptor)
Anti-FLAG	AS103		AL112	6760613 (Streptavidin Donor + anti-FLAG Acceptor)
Anti-DIG			AL113	6760604 (Streptavidin Donor + anti-DIG Acceptor)
Anti-HA				6760612 (Streptavidin Donor + anti-HA Acceptor)
Anti-FITC			AL127	6760605 (Streptavidin Donor + anti-FITC Acceptor)
Anti-V5			AL129	
Anti-GFP			AL133	
Anti-Maltose Binding Protein (MBP)			AL134	
Protein A	AS102	6760137	AL101	6760617 (Streptavidin Donor + Protein A Acceptor)
Protein G			AL102	
Protein L			AL126	
Anti-rabbit IgG	AS105*		AL104*	6760607 (Streptavidin Donor + anti-rabbit IgG Acceptor)
Anti-mouse IgG	AS104*		AL105*	6760606 (Streptavidin Donor + anti-mouse IgG Acceptor)
Anti-human IgG			AL103*	
Anti-rat IgG			AL106*	
Anti-goat IgG			AL107*	
Anti-sheep IgG			AL132*	
Anti-mouse IgM			AL130	
Anti-chicken IgY			AL131	
Unconjugated (未標識)	6762013	6762003	6772001	

表 1: Alpha Tool Box ラインナップ

\* Fc Specific antibodies

ビーズの種類	結合分子	キャパシティ <sup>1</sup>	結合キャパシティ測定に使用した分子
Streptavidin	ビオチン化ペプチド、タンパク質、低分子化合物、糖、など	30 nM	ビオチン化ペプチド
Strep-Tactin®	Strep-tag® II、One-STrEP-tag、あるいはビオチンタグ	100-300 nM	Strep-tag® IL-6X His
Anti-GST antibody	GST 融合タンパク質、ペプチド	3 nM	ビオチン化 GST、ストレプトアビジンビーズ
Anti-6X His antibody	His タグ・タンパク質、ペプチド	100 nM	6X His-GST、グルタチオンビーズ
Anti-FLAG antibody	FLAG タグ・タンパク質、ペプチド	100 nM	ビオチン化 FLAG、ストレプトアビジンビーズ
Anti-maltose binding protein (MBP) antibody	MBP タグ・タンパク質	1 nM	ビオチン化 MBP、ストレプトアビジンビーズ
Anti-HA antibody	Hemagglutinin タグ・タンパク質、ペプチド	10 nM	ビオチン化 PEG-HA、ストレプトアビジンビーズ
Anti-c-myc antibody	C-myc タグ・タンパク質、ペプチド	100 nM	ビオチン化 c-myc、ストレプトアビジンビーズ
Anti-DIG antibody	Digoxigenin 標識タンパク質、ペプチド、オリゴ核酸、など	1 nM	ビオチン化 digoxigenin、ストレプトアビジンビーズ
Anti-FITC antibody	FITC、あるいは fluorescein 標識タンパク質、ペプチド、オリゴ核酸、糖、低分子化合物、など	>1 nM	ビオチン化 ERE-FITC、ストレプトアビジンビーズ
Anti-V5 antibody	V5-タグ・タンパク質/ 標的分子	3 nM	Biotin-Chromalink V5 (14 aa)、ストレプトアビジンビーズ
Anti-GFP antibody	GFP タグ・タンパク質、ペプチド	3 nM	ビオチン化 GFP、ストレプトアビジンビーズ
Glutathione (GSH)	GST 融合タンパク質、ペプチド	300 nM -1 μM	6X His タグ GST、Ni chelate ビーズ
Nickel chelate (Ni <sup>2+</sup> )	His タグ・タンパク質、ペプチド	300 nM -1 μM	6X His タグ GST、グルタチオンビーズ
Protein A	抗体 <sup>2</sup>	3 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 rabbit IgG、ストレプトアビジンビーズ
Protein G	抗体 <sup>4</sup>	1 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 rabbit IgG、ストレプトアビジンビーズ
Protein L	抗体 <sup>5</sup>	1 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 human IgGκ、ストレプトアビジンビーズ
Anti-human IgG	ヒト IgG Fc 領域	3 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 human IgG、ストレプトアビジンビーズ
Anti-rabbit IgG	ウサギ IgG Fc 領域	1 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 rabbit IgG、ストレプトアビジンビーズ
Anti-mouse IgG	マウス IgG Fc 領域	3 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 mouse IgG、ストレプトアビジンビーズ
Anti-mouse IgM	マウス IgM	0.3 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 mouse IgM、ストレプトアビジンビーズ
Anti-rat IgG	ラット IgG Fc 領域	1 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 rat IgG、ストレプトアビジンビーズ
Anti-goat IgG	ヤギ IgG Fc 領域	3 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 goat IgG、ストレプトアビジンビーズ
Anti-sheep IgG	ヒツジ IgG Fc 領域	1 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 sheep IgG、ストレプトアビジンビーズ
Anti-chicken IgY	ニワトリ IgY Fc 領域	0.3 nM (抗体 <sup>3</sup> )	ビオチン化 chicken IgY、ストレプトアビジンビーズ

表 2: Alpha Tool Box にラインナップされているビーズの結合キャパシティ(ビーズ終濃度 20 μg/mL)

1:これらの値の引用データは、各製品のデータシートに QC control アッセイとして記載されています。データシートは製品には添付されませんので [www.perkinelmer.com/coa](http://www.perkinelmer.com/coa) からダウンロードください。ビーズの結合キャパシティは、対として使用するビーズの種類や、使用する分子の大きさ、ビーズにコーティングされている分子との親和性など、アッセイ系により異なります。実際に行いたいアッセイにおける事実上の結合キャパシティは、そのアッセイから経験的に求める必要があります。

2:Protein A は、ヒト IgG1, IgG2, IgG4、マウス IgG2A, IgG2B、トータルヒト IgG、トータルマウス IgG、ウサギトータル IgG と特に強く結合します。

3:これらの結合キャパシティは、抗体の結合キャパシティを参照しています。加える分子のおおよその量は、使用する分子の大きさ、親和性に依存しますが、多くの場合 1 pM~1 μM の範囲です。

4:Protein G は、ヒト IgG とマウス IgG のすべてのサブクラスと結合します。また、ラット、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ウサギ、ウシ、ブタ、ウマの抗体とも結合します。

5:Protein L は、トータルヒト IgG, IgM, IgA, IgE, IgD、マウス IgG、ラット IgG と結合します。マウス IgM、ウサギ IgM とは結合が弱く、ヒト IgGλ 鎖、ウサギ IgG、ヒツジ IgG、ヤギ IgG、ウシ IgG、ラット IgM とは結合しません。

もし、4 ページで説明した飽和濃度(あるいは飽和濃度以上)のタンパク質を加えた場合には、「フック効果」が起きる可能性があります。例えば、ドナービーズ・標的タンパク質・アクセプタービーズの複合体を形成してシグナルが得られる場合、フック効果が起こる前は、ドナービーズとアクセプタービーズに標的分子を加えると、徐々に飽和状態に向けて相互作用反応が進行し、標的タンパク質の濃度が上昇するにつれてシグナルが上昇します。フック効果が起きる「フックポイント」では、ドナービーズとアクセプタービーズに対して加えた標的タンパク質が飽和し、最大のシグ

ナルが得られます。このフックポイントを超えてさらに標的タンパク質濃度を上げると、ドナービーズあるいはアクセプタービーズに対して標的タンパク質が過飽和状態になり、ドナービーズに結合した標的タンパク質とは別の標的タンパク質(溶液中にフリーの分子として大量に存在する。)がアクセプターに結合し、ドナービーズ・標的タンパク質・アクセプタービーズの複合体を形成することができず、シグナルが低下します(図 3、4)。フック効果はこのような「混ぜるだけ」のサンドイッチ型のアッセイ(例えば、TR-FRET など)に共通して起こる現象です。

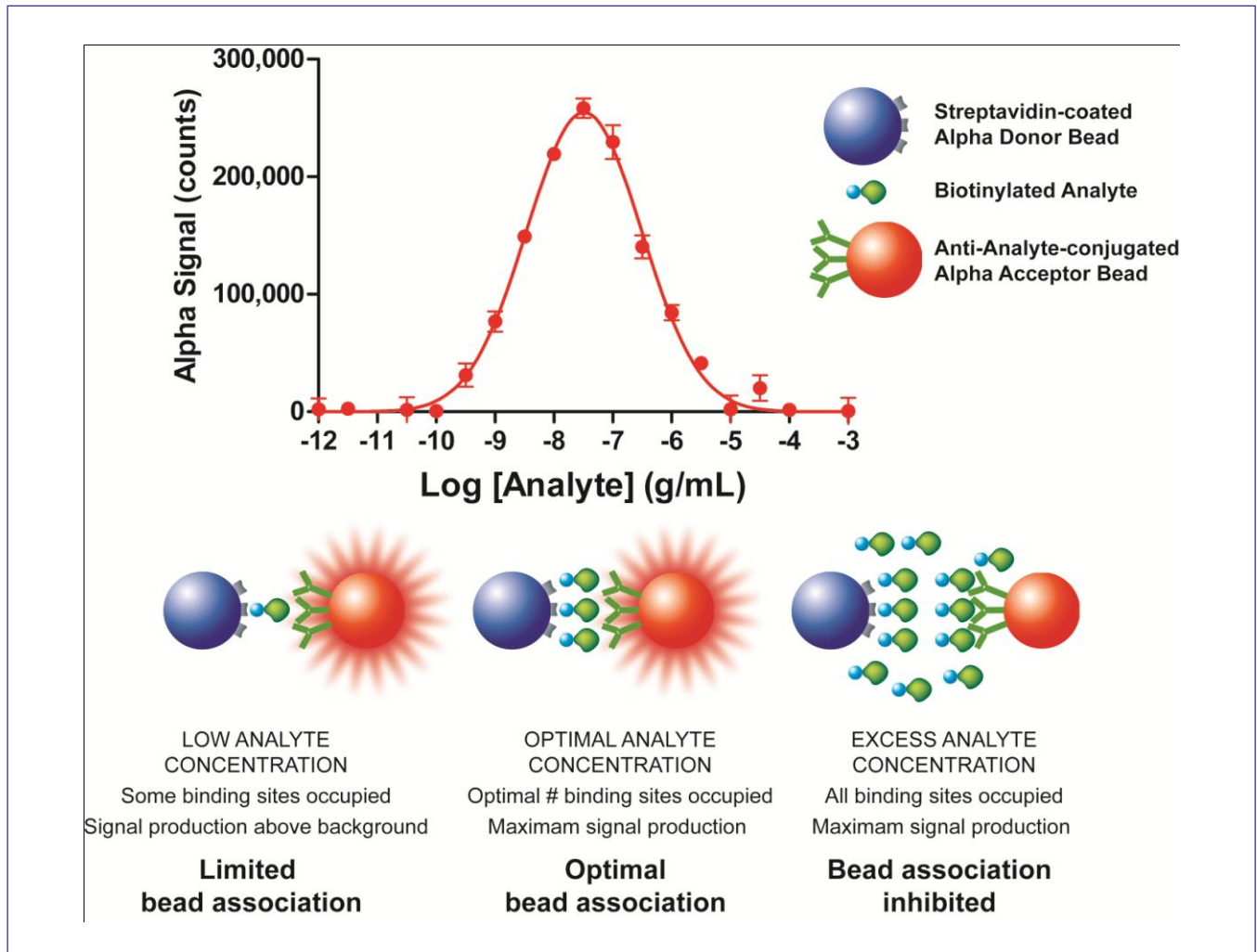
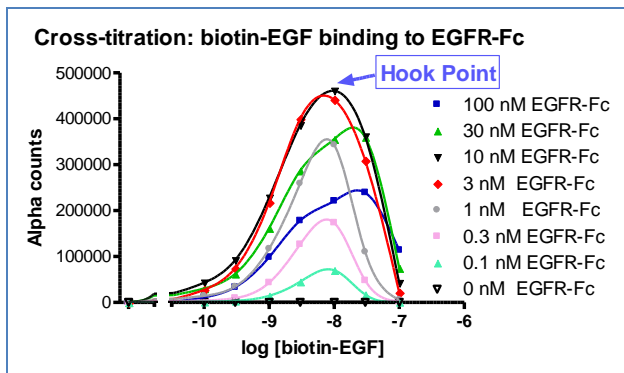


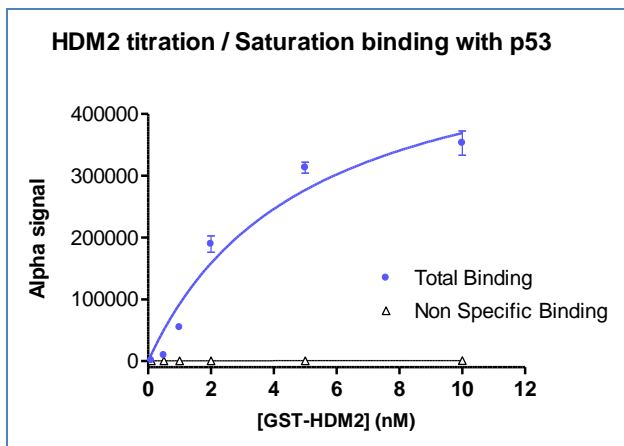
図 3:タンパク質相互作用アッセイにおける「フック効果」



**図 4: 高親和性の相互作用におけるフック効果(Hook Effect)**  
 ビオチン化マウス EGF と、ヒト EGF 受容体-Fc-タンパク質との相互作用を、ストレプトアビジンドナービーズと、AlphaLISA Protein A アクセプタービーズを用いて検出しました。この相互作用の  $K_d$  値は、 $\sim 2.8$  nM [Lax, I. et al., 1988]です。この実験におけるフックポイントは、 $\sim 10$  nM ビオチン化 EGF、 $\sim 3$  nM EGFR-Fc です。

フック効果は、ドナービーズ、アクセプタービーズどちらにも起こり得ます。

稀に、フック効果がマスクされ、飽和曲線のようなデータが得られることがあります(図 5)。例えば、ドナービーズ・タンパク質・タンパク質・アクセプタービーズの複合体を形成させた図 5 のような場合、ビーズとビーズに結合するタンパク質、タンパク質・タンパク質間の相互作用の 2 種類の平衡が競合している可能性があります。特に低親和性のタンパク質・タンパク質相互作用では、高濃度のタンパク質によって、本来ならばフック効果によってシグナルが減少するはずが、タンパク質・タンパク質相互作用がまだ形成され続けているために、シグナルが増加している可能性があります。



**図 5: 低親和性の相互作用**  
 ビオチン化 p53 と GST-HDM2 の相互作用を、ストレプトアビジンドナービーズと、AlphaScreen anti-GST アクセプタービーズを用いて検出しました。フック効果とタンパク質・タンパク質相互作用のシグナル増加が重なると、結果としてシグナル増幅曲線を描きます。この相互作用の  $K_d$  値は $\sim 0.3$   $\mu$ M [Dawson, R. et al., 2003]のはずであるにも関わらず、この曲線からでは  $K_d$  値として $\sim 2$  nM が算出されてしまいます。 $K_d$  の算出は、セクション 4 を参照ください。

アッセイ系を構築する時には、必ずこのフックポイントがどの濃度になるかを測定し、加えるタンパク質をその濃度より低い濃度にします。

いずれの場合でも、あらかじめ大まかなビーズの結合キャパシティを見積もる必要があります。特に親和性の低い相互作用( $K_d > 100$  nM)の場合には注意します。

ビーズの結合キャパシティは、以下の影響をうけます。

- ビーズに結合するタンパク質の大きさ:  
 抗体と比べて分子サイズの小さいペプチドのほうが、結合キャパシティが大きくなります。例えば、ストレプトアビジンビーズのビオチン化ペプチドに対するフックポイントは、ビーズ終濃度 20  $\mu$ g/ mL において 30 nM ですが、ビオチン化抗体では 2~3 nM で飽和します。
- ビーズの親和性:  
 たとえば GST-タンパク質では、anti-GST ビーズか、グルタチオンビーズを使用します。GST のグルタチオンに対する親和性は、anti-GST に対する親和性よりも低いことが知られています。すなわち、大多数の GST-タンパク質はグルタチオンビーズと結合していないため、フックポイントに達するまでに、高濃度の GST-タンパク質をアッセイ系に加えることができます。anti-GST ビーズに対する GST-タンパク質のフックポイントは 20 nM 程度ですが、グルタチオンビーズにおけるフックポイントは、200 nM です。低親和性の相互作用アッセイのためには、低親和性のビーズのほうが好ましい可能性があります(図 6)。  
 高親和性の相互作用アッセイでは、タンパク質濃度を高くする必要はなく、高親和性のビーズを使用することによって、ビーズから解離するタンパク質量も少なく、高いシグナルを得られる可能性があります。

Note: ビーズの結合キャパシティ

ビーズの最大結合キャパシティが nM レンジだったとしても、Alpha を使って、低親和性のタンパク質・タンパク質相互作用( $\mu$ M から mM のアフィニティレンジ)を測定することが可能です。nM 濃度のタンパク質を使用して低親和性の相互作用を検出しても、事実、高いシグナルを得ることができ、高い S/ B (Signal to Background) が得られています。

低親和性の相互作用における解離定数( $K_d$ )は、飽和曲線よりも競合曲線によって算出します。 $K_d$  の測定は、セクション 4 を参照ください。

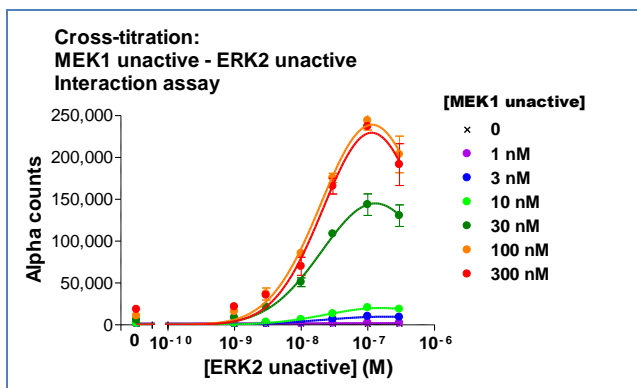


図 6: 高結合キャパシティのビーズを用いた低親和性相互作用 His-MEK1 と GST-ERK2 の相互作用をグルタチオンビーズと AlphaLISA Ni キレートアクセプタービーズを用いて検出しました。これらの相互作用の  $K_d$  値は、 $\sim 29 \mu\text{M}$  [Bardwell, A.J., et al., 2001] で、フックポイントは、GST-ERK2 で  $\sim 100 \text{ nM}$ 、His-MEK1 では、 $100 \sim 300 \text{ nM}$  でした。

### 抗体の親和性

低親和性のタンパク質・タンパク質相互作用 ( $K_d > 100 \text{ nM}$ ) アッセイの構築において、目的タンパク質とビーズの結合に、目的タンパク質に特異的な抗体を使用する場合、その抗体の親和性は低いほうが、よい可能性があります。なぜならば、低親和性のタンパク質・タンパク質相互作用は、平衡に達するまでに大量のタンパク質を必要とします。この時に、高親和性の抗体がコーティングされたビーズを使用すると、目的タンパク質の相互作用が平衡に達するよりも低濃度側で、ビーズへのタンパク質の結合が飽和してしまいます。しかし、低親和性の抗体がコーティングされたビーズを使用することによって、より多くのタンパク質をアッセイ系に加えることができます。

親和性の高いタンパク質・タンパク質相互作用のときには、そのタンパク質に対して高い親和性の抗体がコーティングされたビーズを使用することによって、高いシグナルを得ることができます。このときには、平衡状態にある、ビーズにコーティングした抗体から解離するタンパク質の量は少なくなります。

### サンプルの種類

どのような種類のサンプルを測定するかによって、選択するビーズの種類も変わります。例えば、グルタチオンビーズや Ni キレートビーズは、精製タンパク質を使うような生化学的アッセイには使用可能ですが、細胞溶解液を使用するようなアッセイでは、期待されるほどのシグナルを得ることができません。これは、細胞溶解液に含まれている還元剤などが、グルタチオンや Ni キレートに影響してしまうためです。このような場合、抗 GST 抗体や抗 His-tag 抗体がコーティングされたビーズを使用します。

加えて、それぞれグルタチオンカラムや Ni キレートカラムを使用して、アフィニティ精製した GST-タンパク質や His タ

グ付きタンパク質を使用する場合には、アッセイに使用する前に、透析によってグルタチオンやイミダゾールを除く必要があります。これらは、グルタチオンビーズや Ni キレートビーズと、タグ・タンパク質との結合に干渉します。

## 2.2 バッファーの選択

以下のセクションで述べる内容は、ストレプトアビジジンビーズと、ビオチン化 AlphaScreen アクセプタービーズが含まれている AlphaScreen TruHits kit を使用して得られた結果に基づいています。AlphaScreen TruHit kit は、バッファーや化合物がアッセイに干渉していないことを確認するコントロールとして使用します。ビーズの種類によっては、下記の結果を反映しないことがあります(例えば、Ni キレートビーズは、ストレプトアビジンビーズよりも EDTA 耐性が低くなります)。

また、以下の成分には、Alpha のシグナルには影響がありませんが、タンパク質のコンフォメーションや相互作用に影響し、相互作用やビーズへの結合が阻害されるものもあります。

### 2.2.1 一般

バッファーの pH や緩衝能、塩濃度は、分子間の相互作用に大きく影響します。その他、以下の状況におけるバッファーの影響を記載します。

- 金属イオンなどの補因子がタンパク質のコンフォメーションの維持に必要。  
Alpha シグナルを阻害せず、タンパク質のコンフォメーションを維持する濃度を、濃度反応曲線を作製して決定します。
- 非特異的結合が考えられる。  
Tween 20 (0.01– 0.1%) や Triton X-100 (0.01–0.1%)、CHAPS (0.1%以下)などの非イオン性界面活性剤が効果的です。また、0.1 % (w/v) BSA によっても非特異的な結合が最小限に抑制されます。BSAには、稀に  $\text{NaN}_3$  が含まれていることがあります。高濃度の BSA を加える場合には、 $\text{NaN}_3$  を除いてください。

アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ ) は、強力な一重項酸素スカベンジャーです。ゆえに防腐剤には、Proclin (Sigma-Aldrich Cat. No. 48912-U)、あるいは Kathon (Sigma-Aldrich Cat. No. 48175-U) の使用をお勧めします。

## 2.2.2 Alpha に干渉する成分

以下に述べるバッファーの選択方法は、あくまでもドナービーズとアクセプタービーズ、これらが発する光に対して適した条件です。ゆえに、アッセイに使用するタンパク質などに適した条件とは異なる場合があります。

### バッファーの選択

Alpha は、バッファー濃度や pH レンジによる影響をほとんど受けません。以下のバッファーは、10 mM~100 mM において、シグナルに影響がないことを確認しています。

Acetate	HEPES
Bis-Tris	MES
Bis-TRIS propane	MOPS
CAPS	Phosphate
Carbonate	PIPES
Citrate	Tris
Formate	

### バッファーの pH

pH 2.5~9 では、Alpha シグナルに影響はありません。pH 10.5 を超えると、緩やかにシグナルが減少します。繰り返しますが、検出する分子間相互作用にとって最適な pH を確認してください。

### 塩濃度

タンパク質などのアッセイでは、イオン強度を付与するために、様々な塩が添加されます。Alpha は、幅広い塩濃度に対して耐性を持ち、以下の塩では、300 mM までシグナルに影響がないことを確認しています。

陽イオン	陰イオン	
Li <sup>+</sup>	F <sup>-</sup>	Carbonate
Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Phosphate
K <sup>+</sup>	Br <sup>-</sup>	Sulfate
Cs <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>	Pyrophosphate
Mg <sup>2+</sup>	Borate	Tartrate
Ca <sup>2+</sup>	Acetate	
NH <sup>4+</sup>	Bicarbonate	

重金属は一重項酸素と反応してしまい、シグナルを阻害します。一般的な重金属の推奨濃度を表 3 に示します。

金属イオン	推奨濃度	50%阻害濃度 (IC <sub>50</sub> )
コバルト (Co <sup>3+</sup> )	< 0.7 mM	3.6 mM
II 価鉄 (Fe <sup>2+</sup> )	< 2 mM	0.95 mM
III 価鉄 (Fe <sup>3+</sup> )	< 2 mM	9 mM
マンガン (Mn <sup>2+</sup> )	< 7 mM	37 mM
ニッケル (Ni <sup>2+</sup> )	< 0.5 mM	2.8 mM
亜鉛 (Zn <sup>2+</sup> )	< 0.12 mM	2.69 mM

表 3: AlphaScreen TruHit kit を阻害する金属イオン

阻害曲線の傾きは急勾配のため、IC<sub>50</sub> の 1/5 濃度では、シグナルに対する影響はほぼないと考えられます。記載された濃度は、アッセイ系における終濃度で、ビーズを添加する前の分子間相互作用の反応液中では、より高い濃度でアッセイを行うことができます。

### 界面活性剤、ブロッキング剤

非特異的な結合や凝集の抑制、低バックグラウンド化、アッセイに必要な成分の可溶化、安定化は、バッファー成分の重要な検討項目です。Alpha は、様々な界面活性剤やタンパク質添加剤に対して耐性がありますが、いくつかの注意点もあります。

#### 界面活性剤

以下の界面活性剤は、終濃度 3 %まで Alpha シグナルに干渉しません。

Brij-35	NSB201
Dodecane Sulfonate	NSB256
EMPIGEN	Tergiton NP9
IGEPAL CA630	Triton X-100
Guanidinium chloride (up to 100 mM)	Tween-20
Mowiol 4-88	Tween-80
Nonidet P40	Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)
NSB195	Octyl sulfate

以下の界面活性剤は、高濃度で使用すると Alpha アッセイを阻害します(表 4)。これは、多くの場合、ビーズにコーティングされているタンパク質が変性するためです。

界面活性剤	推奨濃度	50% 阻害濃度 (IC <sub>50</sub> )
BHDA*	< 0.005 %	0.03 %
Benzalkonium chloride	< 0.005 %	0.03 %
CHAPS	< 0.02%	0.10 %
Chenodeoxycholate	< 0.002 %	0.02 %
Cholate	< 0.002%	0.15 %
Decyl sulfate	< 0.1 %	0.50 %
Deoxycholate	< 0.003	0.03 %
Myristyl sulfobetaine	< 0.1 %	0.50 %
Pluronic F127	< 0.1 %	0.30 %
Sodium lauryl sulfate (SDS)	< 0.02 %	0.20 %

表 4: AlphaScreen TruHit kit を阻害する界面活性剤

\*Benzylhexadexyldimethylammonium chloride

#### タンパク質添加剤、高分子ポリマー

バックグラウンドの抑制のために、タンパク質添加剤やポリマーを添加することがあります。Alpha シグナルは、以下の成分について、終濃度 0.5 %まで干渉されません。

BSA	heparin	Dextran T500 (天然・合成ともに)
casein	poly-lysine	
gelatin	salmon sperm DNA	

BSA やカゼインは、精製グレードを確認してください。アッセイに影響する夾雑物の影響を抑えるため、精製グレードの高いものを使用します。例えば、カゼインは精製グレードが低いと、ビオチンが夾雑しています。

以下は Alpha に推奨の BSA とカゼインです。

- BSA (Sigma Cat. No. A7030)
- Casein 5% solution (Novagen Cat. No. 70955)

#### 消泡剤

消泡剤は、自動分注機を用いるハイスループットスクリーニングに使用されるようになってきています。界面活性剤と、BSA などのタンパク質の、コロイド相互作用を阻害する作用を持っています。

消泡剤としてよく使用される、Antifoam A (Sigma Cat. No. A5633)や Antifoam 204 (Sigma Cat. No. A8311)は、終濃度 0.1 %までは Alpha シグナルに干渉しません。Antifoam A は、Antifoam 204 よりも消泡効果が高いと言われています。

#### 補因子、還元剤、防腐剤

Alpha アッセイは、多くの補因子、還元剤、防腐剤に対して耐性がありますが、一部例外もあります(表 5)。

	適合性
核酸(10 mM まで)	アデニン、グアニン、チミジン、ウリジンなどの遊離核酸や、その一リン酸、二リン酸、三リン酸、あるいは環状
還元剤(10 mM まで)	Dithiothreitol (DTT) 2-mercaptoethanol Tris (2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP)
防腐剤(0.1 %まで)	Kathon Thimerosal ProClin 300

表 5: 補因子、還元剤、防腐剤との適合性

アジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>) は、よく使用される防腐剤ですが、一重項酸素をクエンチングし、Alpha シグナルを強力的に阻害します (IC<sub>50</sub>: 0.005%)。Alpha アッセイでは必ず NaN<sub>3</sub> を除いてください。

### 3. アッセイ系構築の条件検討

#### (精製タンパク質を使った、タンパク質・タンパク質相互作用アッセイ)

以下のセクションでは、Alpha タンパク質・タンパク質相互作用アッセイ系を構築する時に検討する条件について記載します。

#### アッセイ系の検討を始める前に:

- Alpha は、専用の測定機器が必要です。パーキンエルマーは、Alpha の測定のために最適化された測定機器を提供する唯一のメーカーです。
- 実験に使用するバッファーやプレミックスは、要時調製です。調製した当日中に使用してください。
- ドナービーズは、露光されると性能が低下します。実験室の光量を 100 Lux 以下に落とすか、緑色のフィルター(#389 ChromaGreen: ロスコ社)で覆った光源をご使用ください。インキュベーションは必ず遮光下で行ってください。

Lux level	
700- Lux	窓際
320-500 Lux	室内(照明直下)
30-70 lux	室内(照明非直下/物影)
10 lux	机下

たとえば、実験室の半分を消灯し、消灯した側で実験操作を行うなどが目安です。

- Alpha シグナルは、温度に依存します。ビーズを添加してから、室温以外の温度(37 °Cや4 °Cなど)でインキュベーションを行う場合は、測定前に、測定機器の傍にプレートを置き、10分程度放置して温度を室温に戻してから測定してください。

#### 3.1 タンパク質濃度曲線の作製

まず最初に、タンパク質濃度曲線を作製し、最適なタンパク質濃度を決定します。このときには、ドナービーズ、アクセプタービーズの終濃度を 20 µg/mL に保ち、タンパク質濃度のみを変化させます。アッセイは Singlicate(n=1)で行います。

Note: 以下のプロトコールは、ドナービーズに結合するタグを持ったタンパク質 Y と、アクセプタービーズに結合するタグを持ったタンパク質 X の相互作用のアッセイ系構築の場合です。抗体を介してビーズとタンパク質を結合させる場合は、セクション 3.2 を参照してください。

#### A. 試薬の調製

例として、終濃度 0.3 nM~300 nM の範囲でタンパク質濃度曲線を作製する場合を記載します。

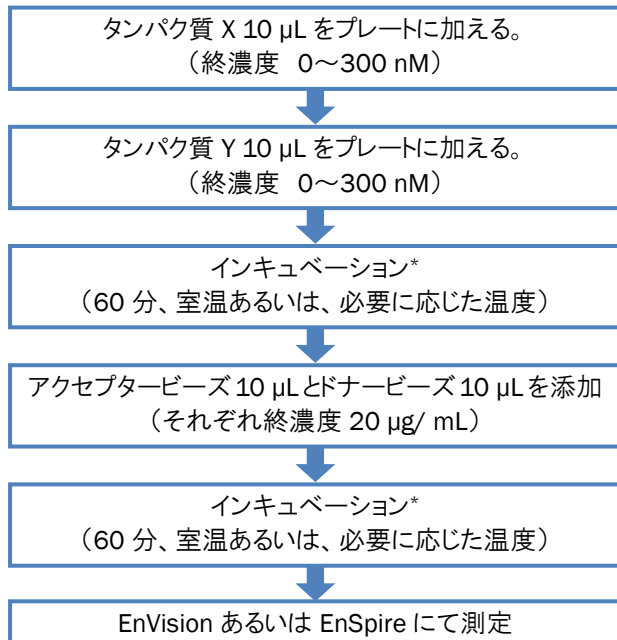
- アッセイバッファー(構築するアッセイに応じて調製します。)にて希釈した、タンパク質 X の 4X working solution(1.2 µM)を、200 µL 調製します。アッセイバッファーを決めていない場合は、0.5 % BSA を含む 1X PBS (AlphaLISA Universal Buffer として販売。Cat. No. AL001)を使用します。アッセイバッファーには、非特異的な結合を防ぐため、BSA や界面活性剤を加えます。
- 1 で調製したタンパク質 X 溶液(1.2 µM)の希釈系列を、下表のように調製します。

	[Final] (M)	4X working Solution (M)	Vol of dilution	Assay Buffer
1	$3 \times 10^{-7}$	$1.2 \times 10^{-6}$	200 µL of 1.2 µM Protein X	
2	$1 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^{-7}$	66 µL of Tube 1	132 µL
3	$3 \times 10^{-8}$	$12 \times 10^{-8}$	66 µL of Tube 2	154 µL
4	$1 \times 10^{-8}$	$4 \times 10^{-8}$	66 µL of Tube 3	132 µL
5	$3 \times 10^{-9}$	$12 \times 10^{-9}$	66 µL of Tube 4	154 µL
6	$1 \times 10^{-9}$	$4 \times 10^{-9}$	66 µL of Tube 5	132 µL
7	$3 \times 10^{-10}$	$12 \times 10^{-10}$	66 µL of Tube 6	154 µL
8	0	0	0	300 µL

3. 1と同様に、アッセイバッファーにて希釈した、タンパク質 Y の 4X working solution (1.2 μM) を、200 μL 調製します。
4. 3で調製したタンパク質 Y 溶液 (1.2 μM) の希釈系列を、2と同じく調製します。
5. (最初のインキュベーション中に以下の操作を行います。): アクセプタービーズの 4X working solution (80 μg/mL) を調製します。  
例: 16 μL アクセプタービーズ (5 mg/mL) + 984 μL アッセイバッファー
6. (最初のインキュベーション中に以下の操作を行います。): ドナービーズの 4X working solution (80 μg/mL) を調製します。  
例: 16 μL ドナービーズ (5 mg/mL) + 984 μL アッセイバッファー  
調製は遮光下で行い、アッセイに使用するまでは、チューブなどを遮光してください。

### B. プロトコール 96-well 1/2 AreaPlate (40 μL)

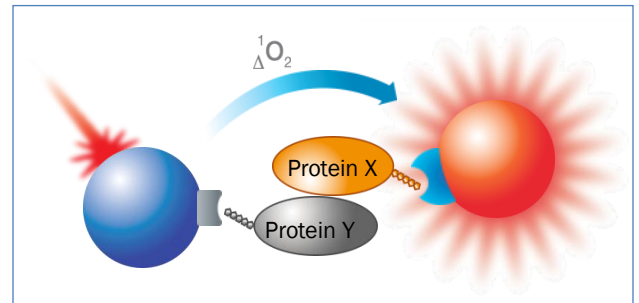
プレートマップ (図 7) を参照してください。マルチチャンネルピペットを使用すると、すばやく操作を行うことができます。



\*TopSeal-A (Cat. No. 6050195) は、貼ったまま測定でき、ウェル内の溶液の蒸発を防ぎます。

#### Notes:

- 目的タンパク質の相互作用の親和性が高い時 ( $K_d$  が pM オーダー) は、調製するタンパク質 X, Y の希釈濃度を、より低濃度にしたほうがよいかもしれません。
- 目的タンパク質の相互作用の親和性が低い時 ( $K_d$  が 100 nM 以上) は、調製するタンパク質 X, Y の希釈濃度を、より
- 高濃度にしたほうがよいかもしれません。
- 目的タンパク質 1 分子が、1 分子以上のビーズに結合する可能性がある場合 (たとえば、1 分子のタンパク質に複数のビオチンが標識されているとき、そのタンパク質に複数のストレプトアビジドナービーズが結合してしまう可能性があります) には、そのビーズの添加順序を最後にします。たとえば、目的のタンパク質相互作用 (どちらかのタンパク質がビオチン化されている) と、これらタンパク質とアクセプタービーズの結合が完全に平行に達したインキュベーションの後、ストレプトアビジドナービーズを添加します。詳細はセクション 3.3 を参照ください。



セクション 3.1 におけるアッセイイメージ

タンパク質 X		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
タンパク質 Y		300 nM	100 nM	30 nM	10 nM	3 nM	1 nM	0.3 nM	0 nM	Empty			
A	300 nM												
B	100 nM												
C	30 nM												
D	10 nM												
E	3 nM												
F	1 nM												
G	0.3 nM												
H	0 nM												

図 7. 96-well plate におけるプレートマップ

図 8、図 9 は、前述のプロトコル(3 ステップアッセイ)に従って、ビオチン化 EGFR と EGFR-Fc を最初に加え、60 分間のインキュベーション後、Protein A AlphaLISA アクセプタービーズを加えてインキュベーションし、その後、ストレプトアビジドナービーズを加えてインキュベーションした結果です。ビオチン化 EGF は、複数個所がビオチン化されているため、EGF と EGFR の相互作用と、Fc と Protein A アクセプタービーズの結合が平衡に達した後、ドナービーズを最後に加えました。  
この結果によると、ビオチン化 EGF のフックポイントは、約 10 nM、EGFR-Fc のフックポイントは、約 3 nM です。

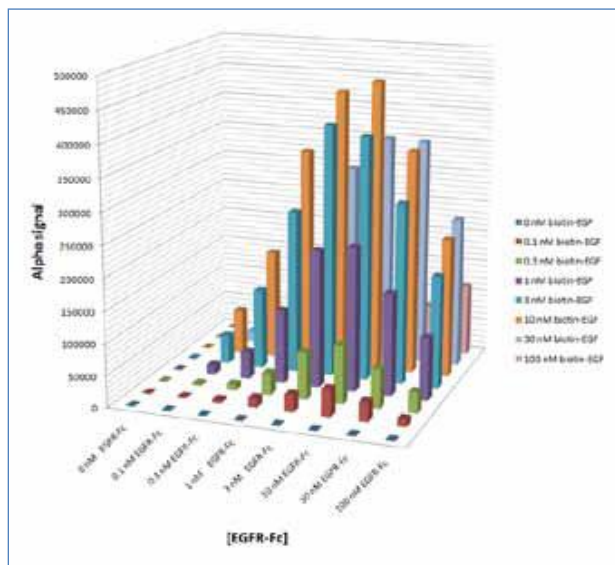


図 8: ビオチン化 EGF と EGFR-Fc の相互作用検出におけるそれぞれの至適濃度の検討 (Micro-Soft Excel によりグラフ化)  
ストレプトアビジドナービーズと、Protein A AlphaLISA アクセプタービーズを使用しました。報告されている EGF と EGFR の  $K_d$  は、 $\sim 2.8$  nM [Lax, I. et al., 1988]です。

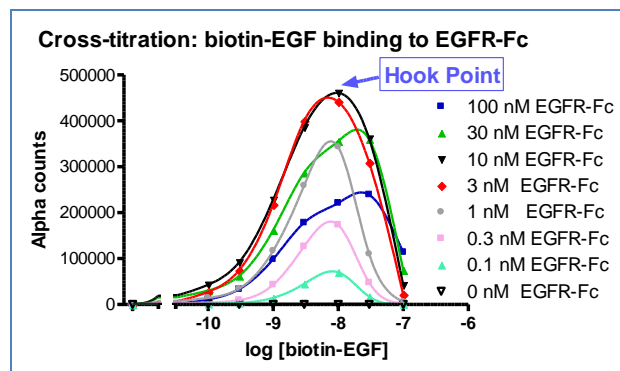


図 9: 図 8 を GraphPad Prism を使って解析した至適濃度曲線

図 10 は、MEK1 と ERK2 の相互作用におけるタンパク質の至適濃度曲線です。

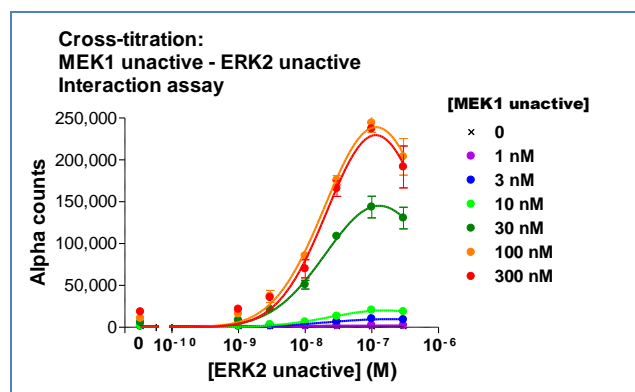


図 10: タンパク質・タンパク質相互作用における至適濃度曲線  
His タグ MEK1 と、GST-ERK2 の相互作用を、グルタチオンドナービーズと、Ni キレートアクセプタービーズを使って検出しました。これらの相互作用の  $K_d$  値は、 $\sim 29$   $\mu$ M [Bardwell, A.J., et al., 2001]で、フックポイントは、GST-ERK2 で約 100 nM、His-MEK1 では、100 $\sim$ 300 nM でした。

このように、最も高い S/B を与えるそれぞれのタンパク質濃度が決定されます。親和定数を求めたい場合は、ビーズの結合キャパシティを考慮したうえで、最適なタンパク質濃度を決定します。詳細はセクション 4 を参照ください。

### 3.2 抗体を使ってタンパク質相互作用を検出する時

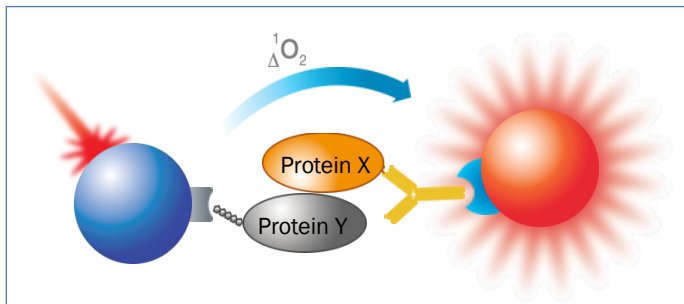
ドナーあるいはアクセプタービーズにタンパク質を結合させる時に、抗体を使用する場合は、目的タンパク質 X、Y だけでなく抗体の至適濃度曲線も作製します。多くの場合、抗体の終濃度は 1, 3, 10 nM 程度です。実験に使用するプレートマップは、図 11 を参照してください。このプレートマップは、タンパク質 X・タンパク質 Y の相互作用を検出するために、タンパク質 X をドナー(あるいはアクセプター)ビーズ

に結合させるために、タンパク質 X と結合する抗体を使用するアッセイ系に使用できます。

目的タンパク質の至適濃度曲線を作製するとき、目的タンパク質と抗体の親和性によっては、3.1にて記載したタンパク質濃度よりも高濃度のタンパク質濃度曲線を作製する必要があるかもしれません(特に、目的タンパク質と抗体の親和性が低い時には、注意が必要です。)

タンパク質 X \ タンパク質 Y		10 nM 抗体						1 nM 抗体					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		1 μM	0.1 μM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0 nM	1 μM	0.1 μM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0 nM
A	300 nM												
B	100 nM												
C	30 nM												
D	10 nM												
E	3 nM												
F	1 nM												
G	0.3 nM												
H	0 nM												

図 11: 96-well plate におけるプレートマップ(タンパク質 X を、抗体を使ってビーズに結合させる場合)



セクション 3.2 におけるアッセイイメージ

### 3.3 試薬の添加順序

試薬の添加順序は、得られるシグナルに大きく影響します。最適な添加順序はアッセイごとに異なります。添加順序によっては、目的タンパク質同士の相互作用、あるいはビーズへの結合が阻害されることがあります。

セクション 3.1 で述べたプロトコールは、最も一般的な、2 ステップアッセイのプロトコールです。すなわち、2 種類のタンパク質を最初に加えて反応させた後、検出のための 2 種類のビーズを加えます。このプロトコールを 3 ステップに分割することも可能です。このときには、タンパク質相互作用を行った後、まずアクセプタービーズを添加してインキュベーションし、ドナービーズを加えてインキュベーションします。2 種類のタンパク質、ドナービーズ、アクセプタービーズを一度に加えて反応させる 1 ステップアッセイでも、問題ないこともあります(図 12)。

加えて、セクション 3.1 でも述べたとおり、ビオチン化されたタンパク質や抗体に、複数のビオチン化サイトがある場合(多くのビオチン化タンパク質は複数のビオチン化サイトを持っています)、複数のストレプトアビジンドナービーズと結合してしまいます(次図)。これは、タンパク質間の相互作用よりも、ストレプトアビジンとビオチンの結合速度のほうが

速いために起こります。こうなると、シグナルが得られない可能性が高くなります。



また、目的のタンパク質を先にビーズに結合させてから、相互作用アッセイに使用することは、お勧めできません。タンパク質よりも遥かに大きいビーズ(直径約 250 nm)がタンパク質に結合すると、溶液中で自由運動しているはずのタンパク質の運動がビーズによって制限され、目的タンパク質同士の相互作用が平衡に達するまでに、より長時間のインキュベーションが必要になります。さらに、ビーズによる立体障害が生じ、目的タンパク質同士が相互作用できない可能性もあります。

例外として、セクション 3.2 で述べたアッセイのように、抗体を使ってビーズにタンパク質を結合させる場合、抗体とビーズをプレインキュベーションし、先に結合させても、シグナルが得られることもあります。

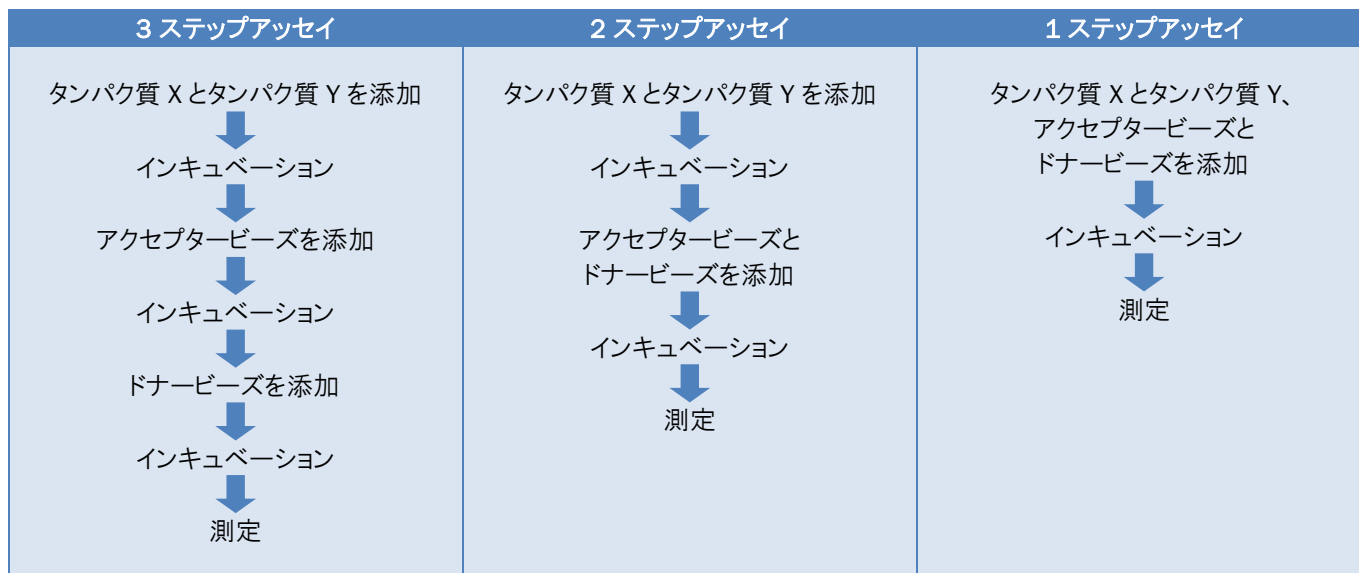


図 12: 試薬の添加順序例

### 3.4 タンパク質・タンパク質相互作用の検証

タンパク質 X とタンパク質 Y が相互作用していることを検証するために、ビーズに結合させるためのタグの付いていないタンパク質 X (あるいはタンパク質 Y) をアッセイ系に加えます (競合アッセイ)。このタグなしタンパク質の濃度が高くなるに従って、シグナルが低下します (図 13、14)。これによって、タンパク質 Y が、タンパク質 X と特異的に相互作用し、タンパク質 X が結合するビーズ (下図ではドナービーズ) と直接結合しないことが確認されます。

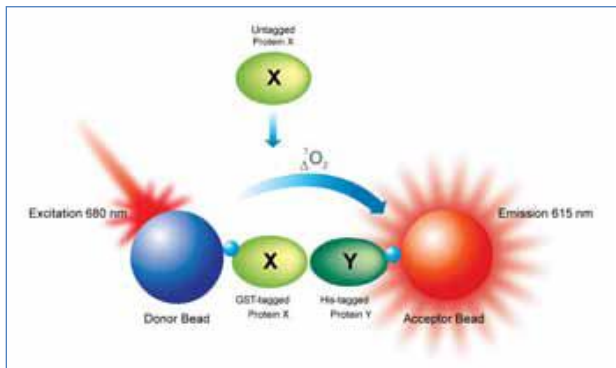


図13: タンパク質Xによる競合アッセイ

タグなしタンパク質 X が、GST-タンパク質 X と、タンパク質 Y の相互作用において競合します。タグなしタンパク質 X は、ドナービーズには結合しないため、タンパク質 Y と相互作用してもシグナルは生じません。このため、タグなしタンパク質 X の濃度が高くなるに従って、シグナルが減少します。

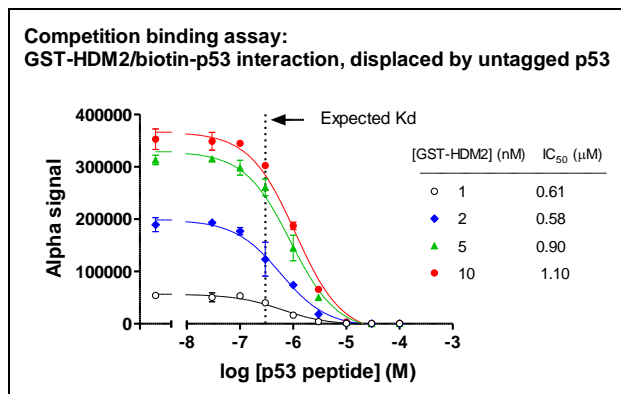


図14: ピオチン化p53とGST-HDM2の相互作用の検証

ストレプトアビジンドナービーズと、抗GST抗体AlphaScreenアクセプタービーズを使用しました。終濃度 30 nM ~ 100 nM のタグなし p53 を加え、GST-HDM2 に対するピオチン化 p53 の結合に対して競合させました。タグなし p53 の濃度が上昇するに従って、シグナルは低下しました。

### A. 試薬の調製

1. アッセイバッファー (セクション 3.1 で決めたもの) にて、タグ付きタンパク質 X の 5X working solution (終濃度は、セクション 3.1 にて決定した濃度) を調製します。
2. 1 と同様に、アッセイバッファーにて、タンパク質 Y の 5X working solution (終濃度は、セクション 3.1 にて決定した濃度) を調製します。
3. アッセイバッファーにて、タグなしタンパク質 X の 5X working solution (500 μM) を、調製します。タンパク質 X とタンパク質 Y の相互作用の K<sub>d</sub> があらかじめ分かっている場合は、その値を参考にした Working Solution を調製します。
4. 3 で調製したタグなしタンパク質 X 溶液の希釈系列を、下表のように調製します。

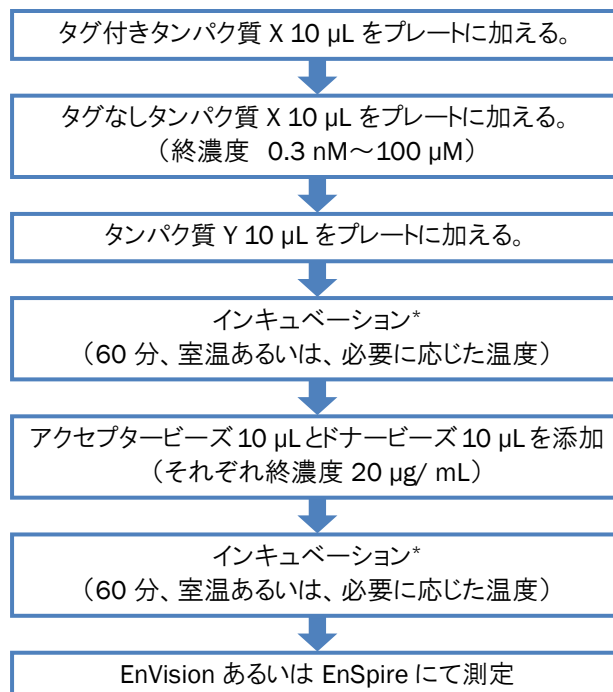
	[Final] (M)	5X working Solution (M)	Vol of dilution	Assay Buffer
1	1 X 10 <sup>-4</sup>	5 X 10 <sup>-4</sup>	500 μM untagged Protein X	
2	3 X 10 <sup>-5</sup>	1.5 X 10 <sup>-4</sup>	66 μL of Tube 1	154 μL
3	1 X 10 <sup>-5</sup>	5 X 10 <sup>-5</sup>	66 μL of Tube 2	132 μL
4	3 X 10 <sup>-6</sup>	1.5 X 10 <sup>-5</sup>	66 μL of Tube 3	154 μL
5	1 X 10 <sup>-6</sup>	5 X 10 <sup>-6</sup>	66 μL of Tube 4	132 μL
6	3 X 10 <sup>-7</sup>	1.5 X 10 <sup>-6</sup>	66 μL of Tube 5	154 μL
7	1 X 10 <sup>-7</sup>	5 X 10 <sup>-7</sup>	66 μL of Tube 6	132 μL
8	3 X 10 <sup>-8</sup>	1.5 X 10 <sup>-7</sup>	66 μL of Tube 7	154 μL
9	1 X 10 <sup>-8</sup>	5 X 10 <sup>-8</sup>	66 μL of Tube 8	132 μL
10	3 X 10 <sup>-9</sup>	1.5 X 10 <sup>-8</sup>	66 μL of Tube 9	154 μL
11	1 X 10 <sup>-9</sup>	5 X 10 <sup>-9</sup>	66 μL of Tube 10	132 μL
12	3 X 10 <sup>-10</sup>	1.5 X 10 <sup>-9</sup>	66 μL of Tube 11	154 μL
13	0	0	0	300 μL

\*使用するタンパク質によっては、500 μM が適当な濃度ではないこともあります。タンパク質に応じて、なるべく高濃度の Working Solution を調製してください。

\*タンパク質・タンパク質相互作用の K<sub>d</sub> が既知の場合は、その値を中心値にし、それよりも高濃度と低濃度の希釈系列を作製します。希釈系列の幅は、3~4 log を推奨します。Working Solution を調製してください。

5. (最初のインキュベーション中に以下の操作を行います。): アクセプタービーズの 5X working solution (100 µg/mL)を調製します。  
例: 5 µL アクセプタービーズ(5 mg/mL) +  
245 µL アッセイバッファー
6. (最初のインキュベーション中に以下の操作を行います。): ドナービーズの 5X working solution (100 µg/mL)を調製します。  
例: 5 µL ドナービーズ(5 mg/mL) +  
245 µL アッセイバッファー  
調製は遮光下で行い、アッセイに使用するまでは、チューブなどを遮光してください。

**B. プロトコル 96-well 1/2 AreaPlate (50 µL)**  
プレートマップ(図 15)を参照してください。マルチチャンネルピペットを使用すると、すばやく操作を行うことができます。



\*TopSeal-A(Cat. No. 6050195)は、貼ったまま測定でき、ウェル内の溶液の蒸発を防ぎます。

Untagged Protein X												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	100 µM	30 µM	10 µM	3 µM	1 µM	300 nM	100 µM	30 nM	10 nM	3 nM	1 nM	0.3 nM
A												
B												
C												
D	0 nM untagged Protein X											
E												
F												
G												
H												

図 15: 96-well plate におけるプレートマップ

サンプルは triplicate (n=3) にします。D1-F1 に、終濃度 0 nM Untagged Protein X のウェルを設けます。

## 4. $K_d$ を求める

Alpha では、2 種類の方法によって、タンパク質・タンパク質相互作用における  $K_d$  を求めることができます。

セクション 4.1 では、飽和曲線から求める方法、セクション 4.2 では、競合曲線から求める方法について述べます。競合曲線から  $K_d$  を求めるほうが、より広く応用されます。

### 4.1 飽和曲線から $K_d$ を求める

限定された条件ですが、飽和曲線からタンパク質・タンパク質相互作用の親和定数 ( $K_d$ ) を求めることが可能です。飽和曲線では、相互作用するタンパク質のどちらかの濃度を変化させて、濃度勾配曲線を作製します。飽和曲線のシグナル最大値 (飽和濃度) に対して、50 %シグナルを与えるタンパク質濃度から  $K_d$  値が求められます。この方法は、下記の条件のみに限定されます。

1.  $K_d$  値が、ビーズの結合キャパシティを遥かに下回る時。すなわち、使用するすべてのタンパク質濃度 (通常  $K_d$  の 5 倍以下) がビーズの結合キャパシティを下回る。このような条件では、大抵  $K_d$  は nM オーダー以下です。ビーズの結合キャパシティは、表 2 を参照ください。
2. 濃度を変化させるタンパク質が、濃度を固定するタンパク質よりも、過剰であること。たとえば、濃度を変化させるタンパク質が Y であるとき、そのモル濃度は、タンパク質 X の 10 倍以上である必要があります。飽和曲線から正しい  $K_d$  を求めるには、相互作用したタンパク質 X・Y の量が、加えたタンパク質 Y の量の 10% 以下となり、相互作用していないタンパク質 Y が、加えたタンパク質 Y とほぼ等量であるとみなされることが必要条件です。

予想される  $K_d$  が、ビーズの結合キャパシティを超える場合、競合曲線を作製し、 $K_d$  を求めます。これは、ビーズの目的タンパク質に対する結合が飽和状態に達すると、ビーズと目的タンパク質の結合の平衡と、目的タンパク質同士の相互作用の平衡の競合が起きるためです。たとえば、目的タンパク質の濃度が上昇すると、本来ならば目的タンパク質同士の相互作用が促進され、シグナルが増加すると考えられます。しかし、ビーズの結合キャパシティを超えた濃度で目的タンパク質が存在していると、ビーズと目的タンパク質の結合のほうが、目的タンパク質同士の相互作用よりも生じやすいため、フック効果によってシグナルが低下します (セクション 2.1.2 参照)。このような 2 種類の平衡状態が合わさった飽和曲線は、上昇曲線としてプラトーに達するか、それともフックポイントに達して、緩やかにシグ

ナルが減少する曲線になるか、プラトーに達することなく、上昇曲線を描き続けるか、のいずれかになると考えられます。これは、実際の  $K_d$  や、目的タンパク質の濃度、ビーズの結合キャパシティに依存します。

以下のような兆候がみられる場合は、飽和曲線から  $K_d$  を求めることができません。競合曲線から  $K_d$  を求めます。

1.  $K_d$  が予測できないとき。  
飽和曲線から求めた  $K_d$  が、予想値を下回る場合、ビーズの結合キャパシティが、結果を攪乱させている可能性があります。
2. ストレプトアビジンビーズを使用するとき。  
ストレプトアビジンとビオチンの結合が強く、ビーズの結合キャパシティの予測は容易です。得られた  $K_d$  が 5-10 nM で、ストレプトアビジンビーズを使用していた場合は、ビーズの結合キャパシティを超えてしまった可能性があります。

#### 飽和曲線から $K_d$ を求めた例

飽和曲線から  $K_d$  を求めた例が、Cassel らによって報告されています [Cassel et al. *J Biomol Screen*. 2010 15(9):1099-106.]。このときには、TAR DNA 結合タンパク質 43 (TDP-43) の、ビオチン化一本鎖 TAR DNA、あるいはビオチン化 6X TG リピートに対する相互作用を AlphaScreen で検出し、それぞれの  $K_d$  は 0.75 nM と 0.63 nM でした。加えて、結合速度、解離速度も求められ、 $K_d$  の算出に使用されています。得られた値は、他の手法によって以前から報告されている値と一致しています。図 16 は、では、ビオチン化 EGF (マウス) と Fc-EGFR との相互作用の  $K_d$  を、飽和曲線から求めたものです。アッセイでは、ストレプトアビジンドナービーズと、Protein A AlphaLISA アクセプタービーズを使用しました。放射性リガンド結合アッセイによって報告されている  $K_d$  は、~2.8 nM [Lax, I. et al., *Mol Cell Biol*. 1988 8(5):1970-8.] です。このデータが得られた時のプロトコールは、1) ビオチン化 FGF と、Fc-FGFR を加え、60 分間インキュベーションする。2) Protein A AlphaLISA アクセプタービーズを加え、60 分間インキュベーションする。3) ストレプトアビジンドナービーズを加え、30 分間インキュベーションする。の、3 ステップから成ります。ストレプトアビジンドナービーズを最後に加えることによって、複数個所がビオチン化された EGF が、複数のストレプトアビジンドナービーズと結合してしまうことがあります (セクション 3.3 参照)。

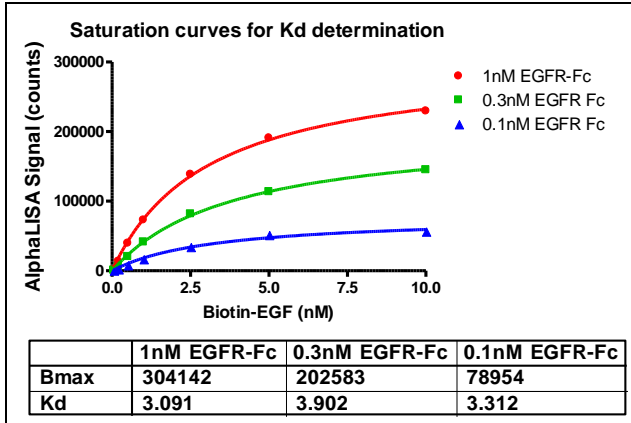


図 16: 飽和曲線から求めた Kd  
 ビオチン化 EGF と EGFR-Fc の相互作用の Kd を求めました。この方法は、通常、Kd 値が低い (nM 以下) の場合に応用できます。

### 飽和曲線から Kd を求めることができない例

図 17 の HDM2 と p53 ペプチドの相互作用における、報告されている Kd 値は、~0.3 μM です。これは、アッセイに使用するビーズの結合キャパシティを超えているため、飽和曲線から Kd を求めることができない典型的な例です。飽和曲線から得られた Kd は、~2 nM であり (10 nM ビオチン化 p53 ペプチドが使用されました。)、予想される値とは大きく異なります。

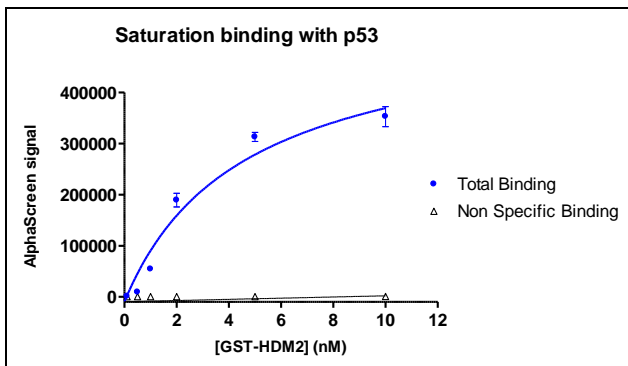


図 17: GST-HDM2 とビオチン化 p53 相互作用の飽和曲線  
 これらの相互作用の予想される Kd 値は ~0.3 μM ですが、これは、抗 GST 抗体アクセプタービーズと、ストレプトアビジンドナービーズの結合キャパシティを超えています。ゆえに、Kd をこの飽和曲線から求めるべきではありません。

競合曲線から Kd を求める場合は、タンパク質の濃度を、予想される Kd 値を中心としてその上下の濃度幅で濃度曲線を作製することが重要です。少なくとも 8 点の異なる濃度 (Kd 値の 10 倍 ~ Kd 値の 1/10 倍) から曲線を作製します。濃度を変化させるタンパク質は 1 種類にし、相互作用するもう片方のタンパク質の濃度は、ビーズの結合キャパシティ以下で、かつ、濃度変化させるタンパク質の最も高い濃度の 1/10 以下に固定します。

## 4.2 競合曲線から Kd を求める

タンパク質・タンパク質相互作用の多くは、その Kd がビーズの結合キャパシティを超えるため、競合曲線から Kd を求めます。競合アッセイでは、タグなしタンパク質 X (あるいはタンパク質 Y) を加え、その濃度が上昇するに従って、相互作用しているタンパク質のビーズへの結合がタグなしタンパク質によって競合阻害され、シグナルが減少します。このような競合曲線では、Kd 値は図 18 に示される Cheng-Prusoff 式に従い IC50 値として求められます。

### 定義

[T]=Target;  
 Protein X (アクセプタービーズに結合)  
 [L\*]=Tracer;  
 Protein Y (ドナービーズに結合)

$K_d L^* T$

### 1) 経験則

$$[T] \ll [L^*] \ll [K_d] L^* T$$

$\begin{matrix} 10x & & 10x \\ (0.1 \text{ nM}) & & (1 \text{ nM}) & & (10 \text{ nM}) \end{matrix}$

### 2) Cheng-Prusoff 式

$$K_d = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_d L^* T}}$$

### 1) + 2)

$$K_d = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_d L^* T}} \Bigg|_{=0} = IC_{50}$$

図 18: Cheng-Prusoff 式

Alpha のタンパク質・タンパク質相互作用アッセイでは、「ターゲット」と「トレーサー」にそれぞれビーズに結合するタグ付きタンパク質 X、Y を当てはめます。Kd 値が、これらのタンパク質の濃度よりも遥かに高い場合、図 18 の経験則から、Cheng-Prusoff 式における [L]/Kd の値はゼロに近似されます。ゆえに、最終式は  $K_d = IC_{50}/(1+0)$  となり、Kd は IC50 から求められます。この競合アッセイから Kd を得るためには、以下の条件を満たすことが必要です。

1. 予想される Kd の 1/10 以下のタンパク質濃度にてアッセイを行うことができること  
 タンパク質 X、Y の濃度は、セクション 3.1 に従って決定されますが、最も高い S/ B を与える濃度が、Kd を求めるために必ずしも必要ではありません。ゆえに、セクション 3.1 で決定した最適なタンパク質濃度より、Kd を求めるための競合曲線の

S/ B は低くなることもあります。

- タンパク質 X、Y の濃度が、それぞれが結合するビーズの結合キャパシティを下回っていること(6 ページ、表 2 を参照ください)。
- タンパク質 X(ターゲット)の濃度が、タンパク質 Y (トレーサー)の濃度の 1/10 以下であること  
タグ付きタンパク質 Y と、タグなしタンパク質 Y を使った競合アッセイを行う場合、タンパク質 X がターゲット、タンパク質 Y がトレーサーとなります。

競合曲線の作製は、セクション 3.4 に記載されたタンパク質 X・Y の相互作用の検証と同じ方法で行います。セクション 3.4 と異なる点は、タグなしタンパク質の濃度を、予想される  $K_d$  値を中心に、その上下の濃度にし(通常は  $K_d$  値の 100 倍～ $K_d$  値の 1/100 倍)。

$K_d$  値の予想がつかない場合は、まず、タグなしタンパク質を広い濃度幅で使用し、得られた結果に基づき濃度幅を狭めて競合曲線を作製します。

また、タグ付きタンパク質濃度に依存して  $IC_{50}$  が大きく変わってしまう場合は、2 点以上のタグ付きタンパク質濃度において、それぞれ競合曲線を作製します。この 2 点(以上)から得られた、 $IC_{50}$  が大きくずれているならば、2 点のうち低濃度のタンパク質濃度の競合曲線から得られた値がより正確です。このときには、さらに低濃度のタグ付きタンパク質濃度でも再度競合曲線を作製し、得られる  $IC_{50}$  が正確であるかどうかを検証します。

図 19 および 20 は、競合アッセイから  $K_d$  を求めた例です。

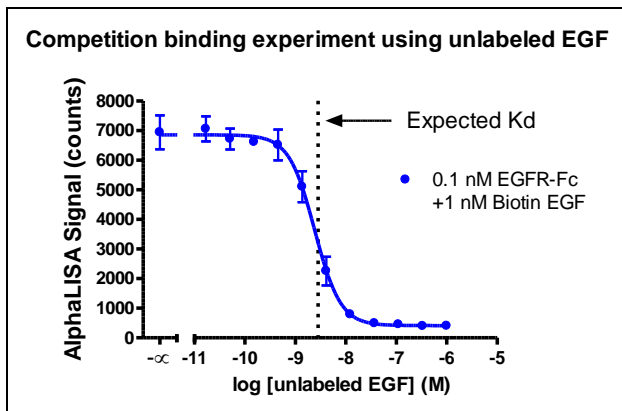


図 19: ピオチン化 EGF と EGFR-Fc 相互作用の競合アッセイ  
ストレプトアビジドナービーズと、Protein A AlphaLISA アクセプタービーズを使用しました。タグなし EGF は、終濃度 0.1 pM～1 pM の濃度幅で希釈系列を作製して使用しました。これらの相互作用の予測値は、ラジオリガンド結合アッセイから～2.8 nM と予測され[Lax, I. et al. 1988]、実際にこの競合曲線から求められた  $K_d$  値は 2.4 nM です。

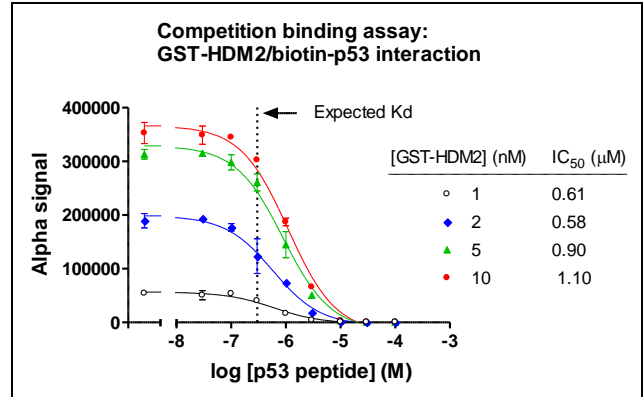


図 20: ピオチン化 p53 と GST-HDM2 相互作用の競合アッセイ  
ストレプトアビジドナービーズと、抗 GST 抗体 AlphaScreen アクセプタービーズを使用しました。何点かの GST-HDM2 濃度においてそれぞれ競合曲線を作製し、それぞれから得られた  $IC_{50}$  値は、ほぼ一致しています。タグなし p53 は、終濃度 30 nM～100 pM の濃度幅で使用しました。この相互作用の予想される  $K_d$  値は～0.3 pM [Dawson, R. et al., 2003]で、図 17 と比較すると、このような相互作用には競合曲線から  $K_d$  を求めるほうが適切だとわかります。

Note:  $K_d$  より低濃度のタグ付きタンパク質でもシグナルを得ることができる理由

ビーズ表面には複数のタグ結合部位があり、表面に結合したタグ付きタンパク質の濃度がビーズ近傍で増加したかのように振る舞うためです。

Alpha 相互作用の競合アッセイから  $K_d$  を求めた良い例として、Lazar らが、3 種類の Fc 変異体と、Fc $\gamma$  受容体との相互作用を報告しています。このときに得られた  $IC_{50}$  は、それぞれ 380 nM、60.3 nM、7.94 nM で、SPR (surface plasmon resonance) から得られた  $K_d$  値 (252 nM、30 nM、2 nM) とほぼ一致しています[Lazar GA, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) 103(11):4005-10.]。

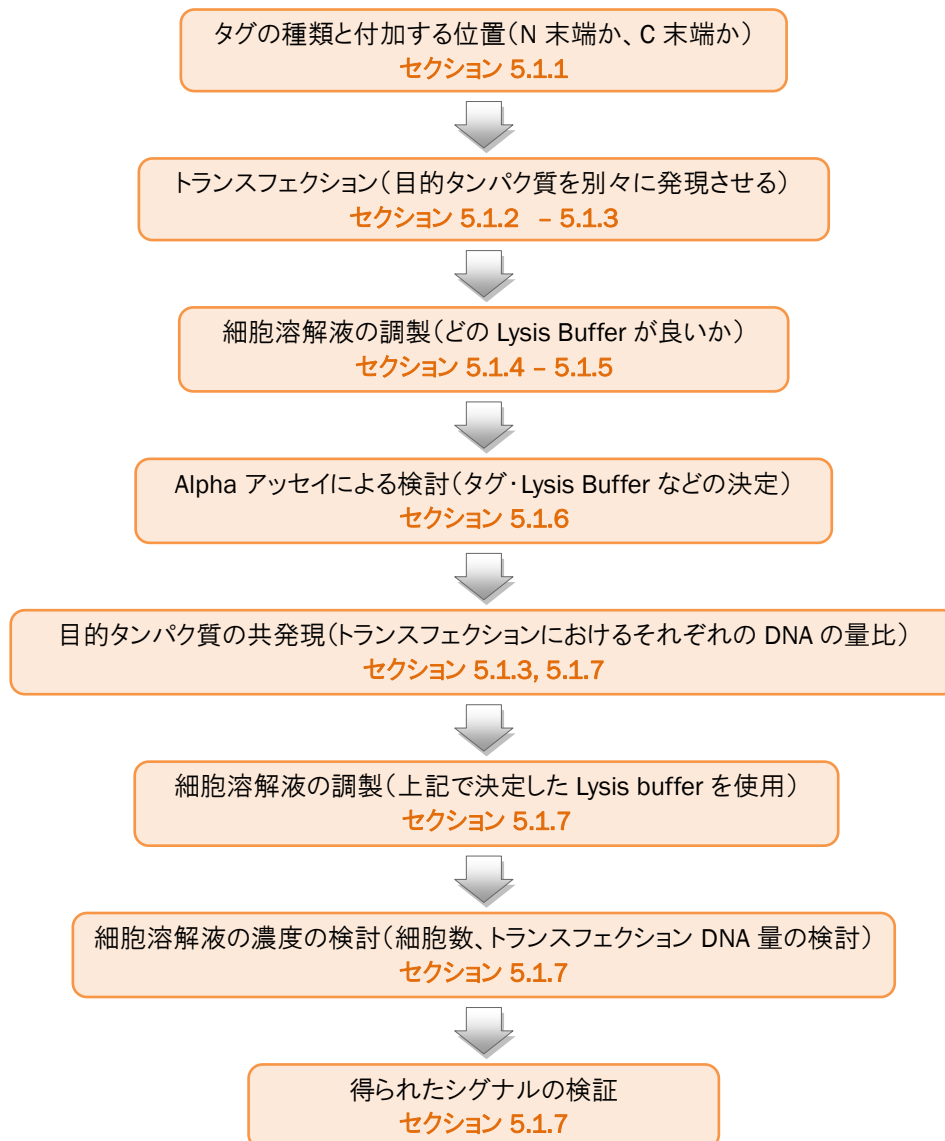
## 5. 細胞ベースのアッセイ

精製タンパク質を使ったアッセイは、タンパク質・タンパク質相互作用を研究するための最もシンプルな手法ですが、忘れてはならないのは、本来タンパク質は、細胞内で相互作用をしているということです。

Alpha を使った細胞ベースのタンパク質・タンパク質相互作用アッセイは、以下の 3 カテゴリーに分類されます。

- タグ付組換えタンパク質を発現させたトランスフェクション細胞におけるアッセイ  
タンパク質発現量が高く、抗タグ抗体の種類も豊富(セクション 5.1)
- 細胞内在タンパク質を使ったアッセイ  
内在タンパク質の発現量と、特異性の高い抗体の有無が重要(セクション 5.2)
- タグなし組換えタンパク質を発現させたトランスフェクション細胞におけるアッセイ  
抗体の特異性に依存し、上記と異なる点は、細胞内に発現するタンパク質量が多い(セクション 5.3)

### 5.1 タグ付きタンパク質を過剰発現させた、細胞ベースのタンパク質・タンパク質相互作用アッセイ



### 5.1.1 タグの種類と付加する位置

FLAG、GST、His、E-Tag などのタグと結合する分子がコーティングされた AlphaLISA アクセプタービーズを用いた例を、セクション 5.4 に記載します。細胞に発現させるタンパク質にタグをつけることによって、細胞ベースのタンパク質・タンパク質相互作用検出がより簡単になります（セクション 5.1.6 を参照ください）。パーキンエルマーでは、アクセプタービーズとドナービーズを個別、あるいはキットとして販売しています（4 ページ、セクション 2.1 を参照ください）。

Tag	AlphaScreen Kits	AlphaLISA Acceptor Beads	Alpha Donor Beads
Anti-GST	6760603	AL110	
Ni chelate	6760619	AL108	AS101
Anti-His		AL128	
Anti-c-myc	6760611	AL111	
Anti-FLAG	6760613	AL112	AS103
Anti-DIG	6760604	AL113	
Anti-HA	6760612		
Anti-FITC	6760605	AL127	
Anti-V5		AL129	
Anti-GFP		AL133	
Anti-MBP		AL134	
Strep-Tactin		AL136	AS106

表 6: タグを検出する Alpha ビーズのラインナップ

グルタチオンビーズは上記リストに入っていません。細胞溶解液には高濃度のグルタチオンが含まれているため、細胞ベースのアッセイには推奨しません。

タグを、タンパク質の N 末端、C 末端どちらに付加するかは、これまでの目的タンパク質に対する知見に基づき、タンパク質内の相互作用領域に与える影響がより少ない場所にします。可能であれば、N 末端にタグを付加、C 末端にタグを付加、それぞれの場合のトランスフェクション細胞を作製し、より適しているほうを選択します。タグの位置などの検討方法をセクション 5.1.6 に記載しています。

### 5.1.2 発現ベクターの構築

発現させるタンパク質をコードした遺伝子に、タグ配列が付加されたものを、使用する細胞に適した発現ベクターに組み込みます。

### 5.1.3 一過性発現

発現ベクターを細胞に導入するには、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクル・ガン法、DEAE デキストラン法、リポフェクション法、陽イオン脂質法など様々な方法があります。中でも、リポフェクション法は比較的操作が単純なため、ハイスループットスクリーニングでも用いられています。FuGENE®6 (Roch, Cat. No. 1815091)は、毒性が少なく、血清存在下でも高い導入効率を発揮するため、以下では FuGENE®6 を使用した CHO 細胞へのトランスフェクション法を記載します。

#### FuGENE®6 を使用したトランスフェクション

- 100 mm のペトリ皿に、 $5 \times 10^8$  の CHO 細胞を播きます。トランスフェクションの 16 時間前に行い、CO<sub>2</sub> インキュベーターに静置します。
- 576  $\mu$ L の無血清培地が入った、2 mL 滅菌ポリプロピレンチューブを用意します。
- 室温に戻した FuGENE®6 は、蓋をあける前にボルテックスします。
- 滅菌チップを用いて、2 の無血清培地に、9  $\mu$ L の FuGENE®6 を加え、ボルテックスし、5 分置きます。このとき、手がチューブの縁に触れないように注意してください。
- 1~6  $\mu$ g の DNA を 4 のチューブに加え、15 分静置します。
- 5 で調製したトランスフェクション Mix を、1 の培養されたペトリ皿に静かに加えます。渦巻き状に回転させ、培地とトランスフェクション試薬を混合させます。
- 24~48 時間後のトランスフェクション後、細胞を回収し、細胞溶解液を調製します。

相互作用を検出する 2 種類のタンパク質のうち、1 種類ずつをトランスフェクションすることをお勧めします。これは、それぞれの発現ベクターを導入した時のタンパク質発現量を確認するためです。理想としては、トランスフェクションする DNA 量や、トランスフェクション後のインキュベーション時間の最適化は、ダブル・トランスフェクションを行う前に、確認します。

### 5.1.4 細胞の前処理・刺激

細胞に前処理を施すことによって、目的のタンパク質・タンパク質相互作用の検出効率が良くなる場合があります。たとえば、血清飢餓処理によって目的タンパク質・タンパク質相互作用が検出できた例があります。

また、アゴニストやアンタゴニスト、阻害剤などによる刺激を行うこともあります。これは、刺激前のネガティブサンプル(Background)と、刺激後のポジティブサンプル(Signal)となる細胞溶解液をそれぞれ調製し、得られた相互作用シグナルの S/ B(Signal to Background)からアッセイウィンドウが求められます。

一方で、何も刺激を行わない細胞において相互作用を検出する場合には、2種類のタンパク質のうち、どちらかのみをトランスフェクトさせた細胞の溶解液をネガティブサンプルとして使用します。

### 5.1.5 細胞溶解液の調製

#### Lysis buffers

細胞ベースのタンパク質・タンパク質相互作用アッセイを行うためには、細胞を溶解します。溶解液の調製はきわめて重要なステップで、細胞を溶解するには界面活性剤が必要ですが、その界面活性剤の作用によって目的とするタンパク質同士の相互作用が失われてしまう可能性も生じてしまいます。このため、プルダウン法や免疫沈降法などの旧来法が開発されてから今日まで、変性強度がさまざまな Lysis Buffer が開発されてきました。Lysis Buffer の溶解効率やタンパク質の溶解率は、細胞種によって異なります。ゆえに、細胞ベースの Alpha アッセイでは、数種類の Lysis Buffer を検討することをお勧めします。Alpha アッセイで実績のある Lysis Buffer は下記です。プロテアーゼ阻害剤は常に添加することをお勧めします。

- 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 50 mM NaCl  
-used for CHO cells; Waller *et al.*
- 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% NP40.  
-used for BSR T7/5 cells; see Rahman *et al.* & Mohamed *et al.*
- 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 5% glycerol, 0.2% NP40, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.  
-used for HEK 293T cells; Lavens *et al.*
- 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% CHAPS.  
-used for CHO cells; PerkinElmer

上記に加えて、下記の市販されている Lysis Buffer も使用できます。

- **AlphaLISA lysis buffer**  
(PerkinElmer, Cat. No. AL003)
- **Cell lysis buffer (10x)**  
(Cell Signaling Technology, Cat. No. 9803)  
20 mM Tris-HCl (pH 7.5),  
150 mM NaCl,  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA,  
1 mM EGTA,  
1% Triton,  
2.5 mM sodium pyrophosphate,  
1 mM b-glycerophosphate,  
1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>,  
1 µg/mL leupeptin (1X)
- **M-PER® Mammalian protein extraction reagent**  
(Thermo Scientific, Cat. No. 78501)
- **Pierce IP lysis buffer**  
(Thermo Scientific, Cat. No. 87787)  
25 mM Tris-HCl pH 7.4,  
150 mM NaCl,  
1% NP-40,  
1 mM EDTA,  
5% glycerol

#### Lysis Buffer の調製

1. Lysis Buffer を 1X に希釈します。(要時調製)
2. プロテアーゼ阻害剤 (Sigma Cat. No. P2714 or Roche Cat. No. 05 892 791 001)を 1 の Lysis buffer に加えます(要時調製)。添加率は試薬に添付するマニュアルに従ってください。

## 細胞溶解液の調製

1. 細胞に前処理を行います(必要に応じ)。セクション 5.1.4 を参照ください。
2. 細胞を剥がします(必要に応じ)。
3. 細胞数を計測し、遠心分離によって細胞を回収します。
4. 上清を除き、1X Lysis Buffer に細胞を溶解させます。このとき、最適な細胞数をあらかじめ検討しておく必要がありますが、通常、 $4 \times 10^8$  cells/mL(20,000 cells の細胞に、5  $\mu$ L の 1X Lysis buffer を加えます)から検討を始めます。
5. 室温で 5~10 分インキュベーションします。溶解効率向上のため、ゆっくり振とう(回転)させます。
6. 13,000 RPM で 5 分間遠心分離し、細胞溶解液を回収します。沈殿は廃棄します。
7. 調製した細胞溶解液は、小分けして-80  $^{\circ}$ C で保存します。

### 5.1.6 タンパク質発現量の確認

一度、ある程度の量の細胞溶解液を調製したら、予備実験として、細胞内に発現している目的タンパク質の相対的な発現量をそれぞれ確認します。目的の相互作用のアッセイで高いシグナルを得るためには、フック効果(セクション 2.1)を避けるためにも、それぞれのタンパク質の相対的な発現量を必ず確認する必要があります。確認方法としては、次のセクションに示す以下の例や、ほかの方法でも確認可能です。

#### タグを使った検出

細胞溶解液中の目的タンパク質の発現量の確認には、AlphaScreen kit に含まれているポジティブコントロールのようなタグ付きペプチド(たとえばビオチン化や FLAG タグなど)を使った競合アッセイを行います。タグ付きペプチドとビーズとの結合が、細胞溶解液(ここに目的のタグ付きタンパク質が含まれている)の添加量の増大に従って競合阻害されると、シグナルが低下して行きます(図 21)。これを、それぞれの目的タンパク質ごとに行います。また、必要に応じてトランスフェクションする DNA 量を変えて、必要なタンパク質発現量となるまで調節します。細胞溶解液中の Alpha アッセイに干渉する可能性のある成分を確認するためにも、トランスフェクションしていない細胞、あるいは目的とは異なるタンパク質が発現している細胞を、ネガティブコ

ントロールとして使用します。

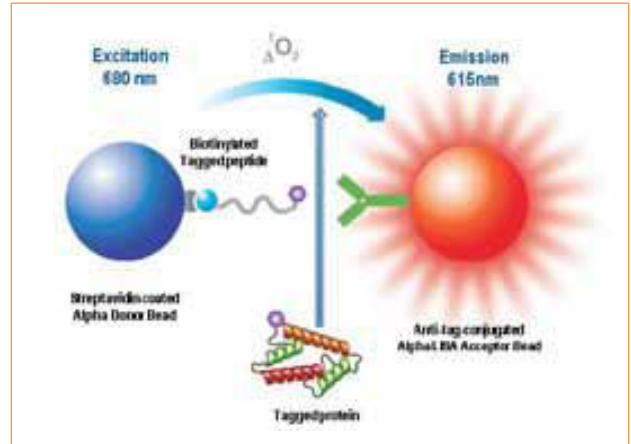


図21; 目的タンパク質の発現量の確認

過剰発現したタグ付きタンパク質が、コントロールであるビオチン化ペプチドと抗FLAGアクセプタービーズとの結合を競合阻害します。

図 22 は、CHO 細胞にトランスフェクションした FLAG-タンパク質の発現量を確認した例です。アッセイは、384-well プレートで、25  $\mu$ L の反応系で行われました。プロトコールを下記に記載します。

1. アッセイバッファーで希釈した、10  $\mu$ L の Anti-FLAG Acceptor Beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL) を加えます。
2. Lysis Buffer で希釈した CHO 細胞溶解液(希釈系列)をそれぞれ 5  $\mu$ L 加えます。
3. 室温で 15 分間インキュベーションします。
4. アッセイバッファーで希釈した、5  $\mu$ L の biotin-FLAG peptide (終濃度 5 nM)を加え、室温で 15 分インキュベーションします。
5. アッセイバッファーで希釈した、5  $\mu$ L の streptavidin Donor beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL) を加えます。
6. 室温で 30 分間インキュベーションします。
7. Alpha 測定機器(EnVision あるいは EnSpire)で測定します。

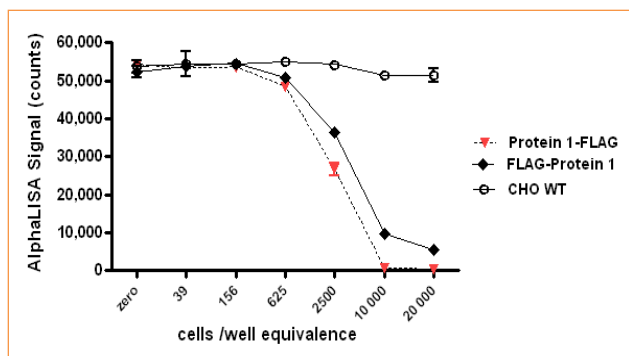


図22; 細胞溶解液中のFLAG-タンパク質の発現量の確認

FLAG-タンパク質1(N末端タグ、あるいはC末端タグ)の競合アッセイを、AlphaScreen FLAG kitを用いて行いました。細胞溶解液の量が上昇するにつれて、ビオチン化FLAGペプチドのシグナルが低下します。CHO WTはネガティブコントロールとして使用しました。ここでは、C末端FLAGタグのほうが、N末端タグよりも発現量が高く、このタンパク質ではC末端タグのほうが適していることが示されています。

GST-タンパク質の発現量を確認した例が図 23 です。ここでは、抗 GST 抗体 AlphaLISA アクセプタービーズとストレプトアビジドナービーズ、ビオチン化抗 GST 抗体を使用し、アッセイを行いました。ビーズの抗 GST 抗体、ビオチン化抗 GST 抗体はいずれもポリクローナル抗体のため、細胞溶解液中の GST-タンパク質をサンドイッチして検出します。このため、細胞溶解液の量が増えるにつれてシグナルが増加します。

アッセイは、384-well プレートで、25  $\mu$ L の反応系で行われました。プロトコルを下記に記載します。

1. アッセイバッファーで希釈した、10  $\mu$ L の Anti-GST Acceptor Beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL) を加えます。
2. Lysis Buffer で希釈した CHO 細胞溶解液(希釈系列)をそれぞれ 5  $\mu$ L 加えます。
3. 室温で 15 分間インキュベーションします。
4. アッセイバッファーで希釈した、5  $\mu$ L の biotin-Anti-GST (終濃度 5 nM)を加え、室温で 15 分間インキュベーションします。
5. 室温で 30 分間インキュベーションします。
6. アッセイバッファーで希釈した、5  $\mu$ L の streptavidin Donor beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL) を加えます。
7. 室温で 15 分間インキュベーションします。
8. Alpha 測定機器(EnVision あるいは EnSpire)で測定します。

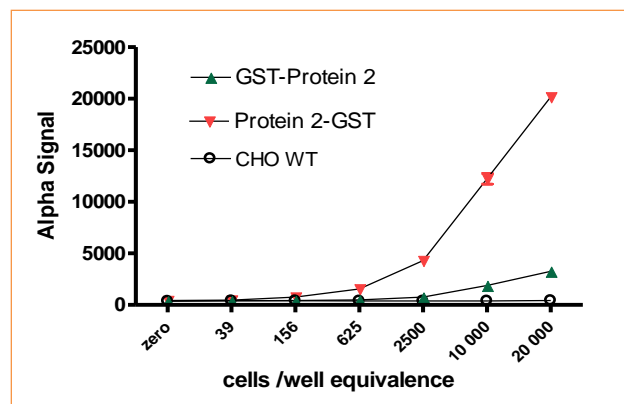


図23; 細胞溶解液中のGST-タンパク質の発現量の確認

GST-タンパク質2(N末端タグ、あるいはC末端タグ)のサンドイッチアッセイを、抗GSTアクセプタービーズとストレプトアビジドナービーズ、ビオチン化抗GST抗体を使って行いました。細胞溶解液の量が上昇するにつれて、シグナルが増加します。CHO WTはネガティブコントロールとして使用しました。ここでは、C末端GSTタグのほうがN末端タグよりも発現量が高く、このタンパク質ではC末端タグのほうが適していることが示されています。

### タンパク質発現量のその他の確認方法

上記の実験例は、細胞内のタグ付きタンパク質の発現量を確認する目安となりますが、発現しているタグ付きタンパク質のうち、本来の機能を持っているタグ付きタンパク質の発現量を確認することはできません。たとえば、タンパク質合成途中で途切れたり、切断されることによってタグが付いていないタンパク質も存在します。ゆえに、ウェスタンブロットングによって、タグが付いていることと分子量を確認することをお勧めします。

タグ付きタンパク質に対する抗体がある場合(市販でもセルフメイドでも)は、タグと結合するビーズと、そのタンパク質に特異的な抗体を使ってAlphaアッセイを行うことでも、上記のような発現量を確認できます。このアッセイ方法でシグナルを得るためには、セクション 5.1.6 に示したアッセイと比較して、目的タンパク質が、タグと、抗体が結合するエピトープの両方のアミノ酸配列を持っていることが必要のため、より確実です。

このセクションで得られた結果から、最適な発現タンパク質のコンストラクトや Lysis Buffer が選択されます。次のセクションでは、共発現とそのアッセイについて記載します。

### 5.1.7 共発現タンパク質の相互作用アッセイ

共発現したタンパク質の相互作用を検出する時には、トランスフェクションするそれぞれの DNA の比率を検討することをお勧めします。たとえ 1 対 1 で DNA をトランスフェクションしても、タンパク質の発現量は一致しないことが多いためです。これは、トランスフェクション効率やタンパク質合成効率(転写、翻訳、翻訳後の成熟過程を含む)などの様々な要素が複雑に影響しあうためです。

#### アッセイバッファーの選択

タンパク質の性質は多岐にわたるため、アッセイバッファーとして推奨できるものはありません。目的のタンパク質によって適したバッファーを、そのタンパク質に対する過去の文献を参考にして使用します。

以下では、いくつかのケースで使用されたアッセイバッファーを記載します。

- PBS + 0.1% BSA  
(ref. Rahman *et al.*; Mohamed *et al.*)
- 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% BSA  
(PerkinElmer unpublished results)

一般的に、界面活性剤の使用はお勧めしません。サンプルによっては界面活性剤を加えたほうがよい場合もありますが、多くの場合、高濃度の界面活性剤はタンパク質・タンパク質相互作用に影響します。細胞溶解液は、通常 25  $\mu$ L のアッセイ中 5  $\mu$ L 含まれますので、アッセイにおける界面活性剤の濃度は Lysis Buffer の組成から 5 倍希釈された濃度となります。

加えて、セクション 2.2.2 に述べたように、Alpha シグナルを阻害する成分が含まれていないことも確認してください。

#### 共発現細胞におけるタンパク質・タンパク質相互作用の確認方法

いくつかの DNA 比で共発現を行い、その細胞溶解液を調製し、目的のタンパク質が相互作用しているかどうかを Alpha アッセイで確認します。これには、以下を参考にしてください。

- ネガティブコントロールに、目的タンパク質のどちらかを単一発現させた細胞溶解液を使用する。
- 共発現細胞の溶解液の量が、シグナルと相関関係があることを確認する(図 24)。
- 得られたシグナルが、共発現させた目的タンパク質に由来することを確認するために、目的タンパ

ク質のどちらかの組換え体(タグなし精製タンパク質)を細胞溶解液に加えて、競合アッセイを行う(図 25)。

- 目的のタンパク質・タンパク質相互作用を阻害するような既知の化合物、あるいはペプチドを加え、シグナルが阻害されるかどうかを確認する。

#### 共発現細胞溶解液の量の検討

アッセイを行う共発現細胞溶解液の量は、いくつかの DNA 比でトランスフェクションを行った場合は、それぞれについて検討します。通常、細胞溶解液を希釈するに従ってシグナルが減少します。同時に、ネガティブコントロールとして、トランスフェクションを行ってない細胞、あるいは目的タンパク質とは異なる DNA をトランスフェクションした細胞の溶解液を使用します。

図 24 は、タンパク質 1-FLAG とタンパク質 2-GST の、それぞれの DNA 比 1 対 1 でトランスフェクションした細胞の、溶解液の量を検討した結果です。アッセイは、ビオチン化抗 GST 抗体とストレプトアビジドナービーズ、抗 FLAG 抗体 AlphaLISA アクセプタービーズを使用しました。細胞溶解液の量(X 軸の細胞数を参照)とシグナルが相関関係にあります。

アッセイは、384-well プレートで、25  $\mu$ L の反応系で行われました。プロトコールを下記に記載します。

1. Lysis Buffer で調製した CHO 細胞溶解液(希釈系列)をそれぞれ 10  $\mu$ L 加えます。
2. アッセイバッファーで希釈した 5  $\mu$ L の Anti-FLAG Acceptor beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL) を加えます。
3. 室温で 30 分間インキュベーションします。
4. アッセイバッファーで希釈した 5  $\mu$ L Biotinylated Anti-GST antibody (終濃度 1 nM) を加えます。
5. 室温で 60 分間インキュベーションします。
6. アッセイバッファーで希釈した 5  $\mu$ L の streptavidin Donor beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL) を加えます。
7. 室温で 60 分間インキュベーションします。
8. Alpha 測定機器(EnVision あるいは EnSpire)で測定します。

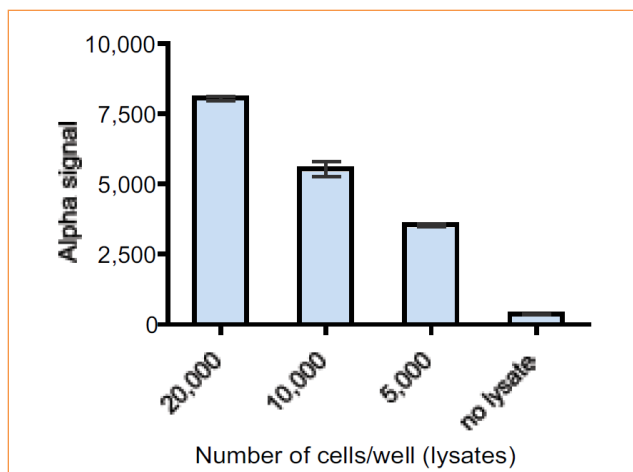


図 24;共発現細胞を用いた Alpha アッセイ

タンパク質 1-FLAG(C 末端タグ)と、タンパク質 2-GST(C 末端タグ)を共発現させた CHO 細胞溶解液を使って Alpha アッセイを行いました。抗 FLAG 抗体 AlphaScreen アクセプタービーズと、ストレプトアビジドナービーズ(終濃度それぞれ 20 µg/mL)、ビオチン化抗 GST 抗体(終濃度 0.3 nM)を使用しました。

### 共発現したタンパク質・タンパク質相互作用の競合アッセイ

目的タンパク質のどちらかの組換え体があれば、これを共発現細胞溶解液に加えて、相互作用しているかどうかを検証可能です(図 25)。加える組換え体の濃度が上昇するに従って、目的タンパク質に対する競合反応が起こり、シグナルが減少します。この組換えタンパク質は、タグ(FLAG や GST など)が付いていないものを使用します。

図 25 のアッセイは、384-well プレートで、25 µL の反応系で行われました。プロトコールを下記に記載します。

1. アッセイバッファーで希釈した 5 µL の Anti-FLAG Acceptor Beads (終濃度 20 µg/mL)を加えます。
2. アッセイバッファーで希釈した 5 µL の Protein 2 の組換え体を加えます。
3. 5 µL の CHO 細胞溶解液(4x 10<sup>6</sup> cells/mL)を加えます。
4. 室温で 60 分間インキュベーションします。
5. アッセイバッファーで希釈した 5 µL の biotin-Anti-GST (終濃度 1 nM)を加えます。
6. 室温で 60 分間インキュベーションします。
7. アッセイバッファーで希釈した 5 µL の streptavidin Donor Beads (終濃度 20 µg/mL)を加えます。

8. 室温で 60 分間インキュベーションします。
9. Alpha 測定機器(EnVision あるいは EnSpire)で測定します。

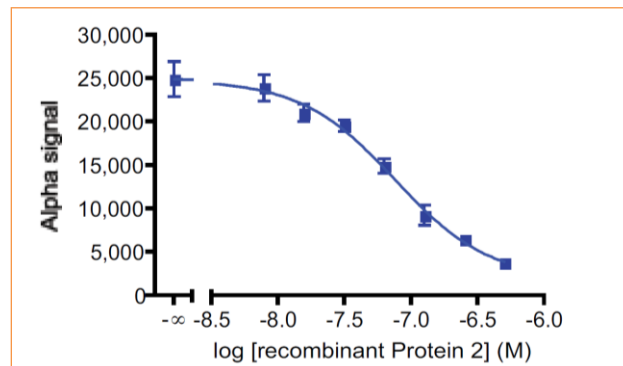
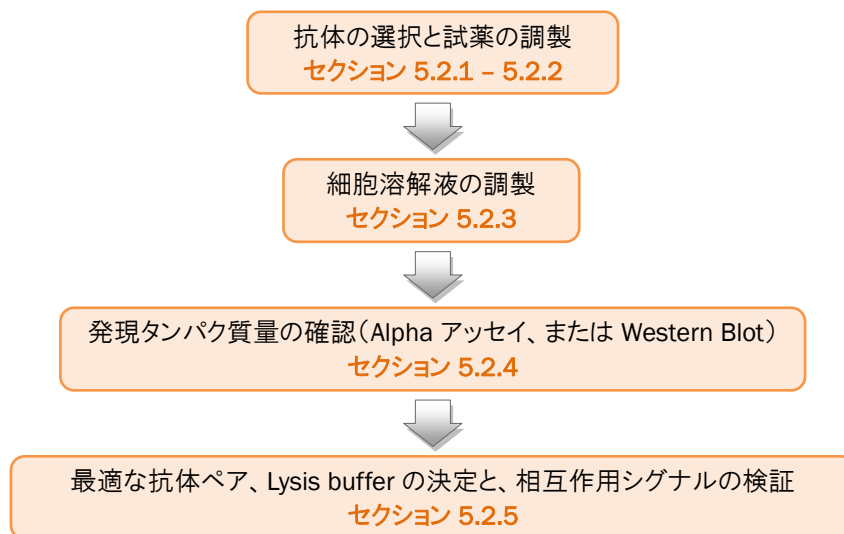


図 25; 図 24 の競合アッセイ

図 24 の Alpha アッセイ系に、精製タンパク質 2(タンパク質 2-GST と競合)を加えました。その添加量に従ってシグナルが減少しています。IC<sub>50</sub> 値は、73 nM です。

## 5.2 内在タンパク質同士の細胞ベース相互作用アッセイ



内在タンパク質同士の相互作用を検出するためには、それらのタンパク質に対する特異的な抗体が必要です。セクション 5.1 で述べた通り、過剰発現させたタグ付きタンパク質のアッセイでは、そのタンパク質が発現していることを確認しますが(セクション 5.1.6)、同様に、目的の内在タンパク質が、使用する細胞において本当に発現しているかを確認しなければなりません。この最も一般的な手法は、ウェスタンブロットリングですが、Alpha アッセイでも、個々のタンパク質を抗体でサンドイッチして検出することが可能です。この時には、目的タンパク質に対する 2 種類の抗体の組み合わせ(ドナービーズに結合させる抗体とアクセプタービーズに結合させる抗体、以下抗体ペアと省略)を何通りか検討し、最適な抗体ペアを選びます。

すでに ELISA で検出していた場合、最初に試す抗体ペアは、ELISA と同じものにします。これでうまくいかなければ、別の組み合わせを試します。

### 5.2.1 抗体ペアの選択

抗体には、免疫沈降などの相互作用アッセイなどで報告例のあるものを、なるべく使用してください。立体障害を避けるため、目的タンパク質の相互作用ドメインとは離れた位置にあるエピトープを認識する抗体を使用します。相互作用するドメインが同定されていない場合は、それぞれ異なるエピトープを認識する複数の抗体から、最適なものを選択します。目的タンパク質それぞれについて、これらの抗体を組み合わせ、細胞溶解液を使って Alpha アッセイを行い、相互作用したタンパク質をサンドイッチするための最適な抗体ペアを決定します。抗体の検索には、Biocompare® ([www.biocompare.com](http://www.biocompare.com))が便利です。

内在タンパク質の細胞ベースの相互作用アッセイ系を構築する前に、まず、組換えタンパク質とそれに対する抗体を使ってアッセイ系を構築することで、細胞ベースのアッセイに使用する抗体の組み合わせの指標が得られます。細胞ベースのアッセイ系を構築した後も、組換えタンパク質を添加して競合アッセイを行い、タンパク質同士が相互作用していることを検証します(過剰発現タンパク質を使った例であるセクション 5.1.7 を参照ください。)

### 5.2.2 抗体の標識

セクション 5.2.1 の抗体ペアは、ドナービーズに結合させる場合、アクセプタービーズに結合させる場合の両方を検討します。たとえば、抗体ペア A、B を試すときに、抗体 A をビオチン化してストレプトアビジンドナービーズに結合させて抗体 B を直接アクセプタービーズに結合させる、あるいは抗体 B をビオチン化してストレプトアビジンドナービーズに結合させて抗体 A を直接アクセプタービーズに結合させる、の両方を行います。ビーズに直接抗体を結合させる方法は、別のガイド「[AlphaLISA Assay Development Guide](#)」を参照ください(弊社 HP からダウンロードいただけます)。抗体によっては、ビオチン化やビーズへのコーティングが適さない場合もあります。これは、ビオチン化やビーズへのコーティングでは、抗体のアミノ基とランダムに化学反応する手法を用いているためです。このような場合には、二次抗体がコーティングされたビーズ(たとえば AlphaLISA Anti-mouse IgG アクセプタービーズなど)を使用します。パーキンエルマーでは、二次抗体がコーティングされたビーズを個別、あるいはキット(ストレプトアビジンドナービーズを含む)として販売しています(表 7)。

Tag	AlphaScreen Kits	AlphaScreen Acceptor Beads	AlphaLISA Acceptor Beads	Alpha Donor Beads
Protein A	6760617	6760137	AL101	AS102
Protein G			AL102	
Protein L			AL126	
Anti-human IgG			AL103*	
Anti-rabbit IgG	6760607		AL104*	AS105*
Anti-mouse IgG	6760606		AL105*	AS104*
Anti-rat IgG			AL106*	
Anti-goat IgG			AL107*	
Anti-sheep IgG			AL132*	
Anti-mouse IgM			AL130*	
Anti-chicken IgY			AL131*	

表 7; 抗体を補足する Alpha ピーズのラインナップ

\* Fc Specific antibodies

### 5.2.3 細胞溶解液の調製

セクション 5.1.5 を参照ください。

### 5.2.4 タンパク質の発現量の確認

セクション 5.1.6 のタグ付きタンパク質の発現細胞と同様に、一度、ある程度の量の細胞溶解液を調製したら、予備実験として、細胞内に発現している目的タンパク質の相対的な発現量をそれぞれ確認します。この確認は、Alpha アッセイで行うことができ、それぞれのタンパク質に対する特異的な抗体を使用します。このときに得られたシグナルが、目的のタンパク質・タンパク質相互作用に由来していることと、細胞溶解液の量とシグナルに相関関係があることは必ず確認します。このときに、最適な Lysis Buffer も決定します。また、ウェスタンブロットティングでも発現量と分子量も確認できます。

### 5.2.5 内在タンパク質の相互作用アッセイ

#### 最適な抗体ペア、Lysis buffer の決定

セクション 5.1.1 と同様、まず最適な Lysis Buffer と抗体ペアを決めます。たとえば図 26 のようなプレートマップで、数種類の Lysis Buffer と、抗体ペアを評価します。Lysis Buffer と同時に、アッセイバッファも、セクション 5.1.7 を参照して最適なものを選択します。

抗体ペアを決めるときには、ネガティブコントロールとして細胞溶解液を加えない(代わりに Lysis Buffer のみ加える)系を使用します。より好ましい方法として、相互作用を細胞の前処理によって調節可能な場合は、処理した細胞と処理しない細胞を、それぞれポジティブコントロールとネガティブコントロールとして使用します。非特異的な結合を、誤って目的タンパク質の相互作用であると解釈してしまうことを防ぐために、必ず行ってください。

#### 得られた相互作用シグナルの検証

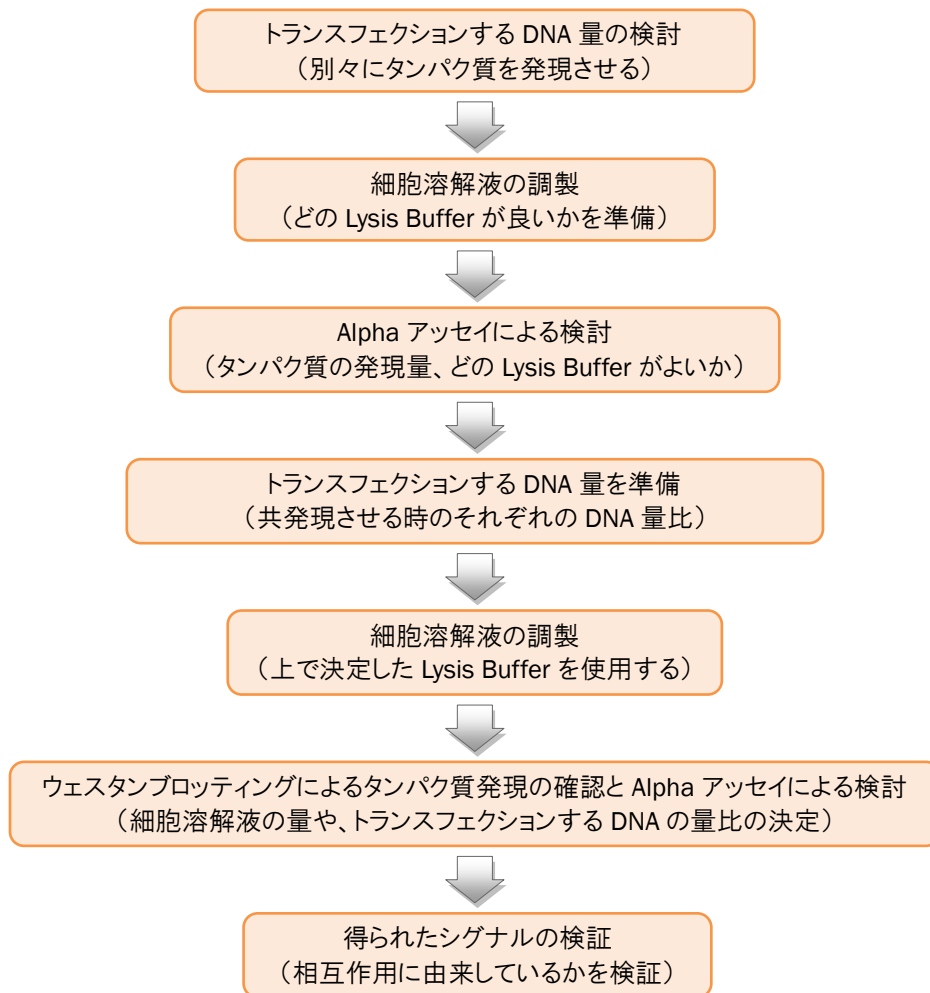
シグナルが、目的とする内在タンパク質の相互作用に起因することの検証には、セクション 5.1.7 を参照ください。

抗体ペア		Lysis Buffer A					Lysis Buffer B					Lysis Buffer C					Lysis Buffer D								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	A																								
2	B																								
3	C																								
4	D																								
5	E																								
6	F																								
7	G																								
8	H																								
	I~P																								

図 26; Lysis Buffer と抗体ペアの検討のプレートマップの一例

Lysis Buffer、抗体ペアともに Triplicate(n=3)で実験を行います。

### 5.3 タグなし組換えタンパク質を過剰発現した、細胞ベースタンパク質・タンパク質相互作用アッセイ



過剰発現させたタグ付きタンパク質の相互作用よりも、タグなし過剰発現タンパク質の相互作用は、そのタンパク質に特異的な抗体の良し悪しに依存します。

この場合は、セクション 5.1 とセクション 5.2 を組み合わせたアッセイ系の構築になりますが、アッセイ系構築の難易度は、セクション 5.1 よりも多少難しく、セクション 5.2 よりも容易です。

細胞溶解液の調製は、セクション 5.1.2、セクション 5.1.5 を参照ください。タグ付きタンパク質の過剰発現細胞と同様に、共発現する前に、まず個別にタンパク質を発現させた場合の条件検討を行います。

トランスフェクションした細胞に、目的のタンパク質が発現しているかどうかの確認は、ウェスタンブロッティングで行いますが、そのタンパク質をサンドイッチする抗体があれば、Alpha を使っても確認可能です。特に、トランスフェクションする DNA 量や Lysis buffer などの条件検討では、Alpha のほうがマイクロプレートベースで反応を行うため、さまざまな条件を検討できます。詳細はセクション 5.1.7 を参照ください。

## 5.4 細胞ベースアッセイの参考文献

以下は、過剰発現したタグ付きタンパク質の細胞ベース相互作用アッセイの例です。

Tags	Lysis buffer	Lysis protocol	Assay buffer	Lysate amount
Becker <i>et al.</i> , <i>Virology</i> 2008				
FLAG, HA	100 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.2 mM PMSF Roche complete protease inhibitor	2 hours post-transfection, cells from one well of a 6-well microplate were rinsed with PBS and lysed on ice for 5 minutes. The cellular extracts were then separated following centrifugation for 10 min at 13,000 g at 4 °C.	PBS + 0.1% BSA	2 µL of lysate from one well was diluted in 1:10 in assay buffer
Rahman <i>et al.</i> , <i>PLoS Pathogens</i> 2009				
GST, His	100 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, Roche complete protease inhibitor	48 hours post-transfection, cells were collected in 500 mL PBS, pelleted and then lysed by suspending in 20 mL lysis buffer. The cellular extracts were then separated following centrifugation for 5 min at 13,000 rpm.	PBS + 0.1% BSA	Cells seeded in 24 well plates. 48 hours post transfection, cells were collected in 500 mL PBS, pelleted and then lysed by suspending in 20 µl lysis buffer. 5 µl of cell extract were mixed to a total assay volume of 25 µl.
Lavens <i>et al.</i> , <i>Nucleic Acids Research</i> 2009				
Etag, FLAG	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 5% glycerol, 0.2% NP40, 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM NaF, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , Complete protease inhibitor without EDTA cocktail.	Lysates were cleared by centrifugation.	not disclosed	not disclosed
Mohamed <i>et al.</i> , <i>PNAS</i> 2009				
His, GST	100 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40, Roche complete protease inhibitor	48 hours post transfection, cells were collected in 500 mL PBS, pelleted and then lysed by suspending in 20 mL lysis buffer. The cellular extracts were then separated following centrifugation for 5 min at 13,000 rpm.	PBS + 0.1% BSA	Cells seeded in 24 well plates. 48 hours post transfection, cells were collected in 500 mL PBS, pelleted and then lysed by suspending in 20 µL lysis buffer. 5 µL of cell extract were mixed to a total assay volume of 25 µL.
Werden <i>et al.</i> , <i>Journal of Virology</i> 2010				
His, FLAG, HA	Not disclosed	Not disclosed	PBS + 0.1% BSA	Not mentioned
Waller <i>et al.</i> , <i>Journal of Virological Method</i> 2010				
FLAG, GST, His, HA (His and HA for transfected cells)	Following a PBS wash: 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 50 mM NaCl	The cell lysates were incubated for 30 min on ice and then centrifuged at 9,357×g in a microcentrifuge for 5 min at 4 °C.	100mM HEPES pH 7.5, 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.1% CHAPS, 5% glycerol	CHO cells grown in 6 well plate, transfected and grown for 48 h then lysed in 100 µL. 18 µL of this lysates is used per well of Alpha.
Internal data presented in this guidebook				
FLAG, GST	Bulk produced at 4M/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% CHAPS + protease inhibitor cocktail (note: CHAPS was documented as a detergent that preserves the studied interaction).	see Section 5.1.5	50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% BSA	5 µl of 4M/mL lysates in 25 µL total assay volume

## Alpha タンパク質・タンパク質相互作用アッセイ;クイックスタートガイド

### はじめに:

- Alpha は、測定に専用装置が必要です。通常の時間分解蛍光測定機や、発光測定機では測定できません。
- 試薬は用時調製してください。特にビーズなどを希釈したアッセイの溶液は保存ができません。
- ドナービーズは光暴露によって劣化します。光量 100 Lux 以下の環境で操作し、プレートは必ず遮光してください。(アルミホイルあるいは黒色プレートを使用します。)
- Alpha シグナルは温度によって変化します。相互作用を 37 °C、あるいはその他の温度で反応させた時には、プレートを測定機器の傍に置き、測定機器と同じ温度になってから測定してください。

**アッセイのデザイン:** 様々な種類のドナービーズとアクセプタービーズをラインナップしています(たとえば、ストレプトアビジン、抗 FITC 抗体、抗 DIG 抗体、Ni キレート、グルタチオン、Protein A、抗 IgG 抗体など。そのほか未コーティングのビーズにセルフメイドでタンパク質などをコーティングできます)。詳細はお問い合わせください。

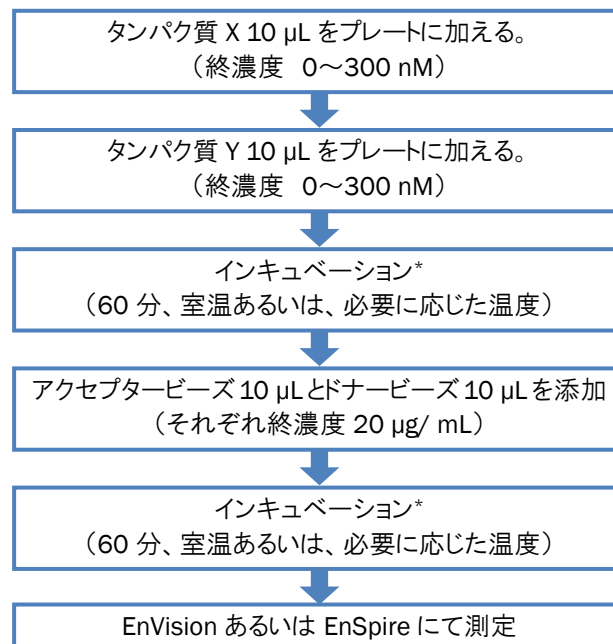
### Biochemical Assay

最初の条件検討の段階では、ビーズの終濃度を一定(終濃度 20 µg/mL)にして、タンパク質の濃度を最適化します。アッセイボリュームは、40~50 µL で、プレートマップは以下です(図 27)。

		Protein X							
		1	2	3	4	5	6	7	8...
Protein Y	300								
	A 300								
	B 100								
	C 30								
	D 10								
	E 3								
	F 1								
	G 0.3								
	H 0								
nM									

図27; 96-wellプレートにおけるプレートマップ

通常、アッセイはSinglicateで行います。



次に必要に応じ、以下の条件を最適化します。

1. 試薬の添加順序(ビーズを同時に添加するか、別々に添加するかなど)
2. 相互作用に特異的なシグナルかを確認(例えばタンパク質 X, Y にタグ付きのものを使っていた場合は、タグなしのタンパク質を加えて、シグナルが低下するかを検証します。)
3. インキュベーション時間(一晩まで試してみる)

## Cell-based Assays

### Lysis Buffer の選択

細胞ベース(細胞溶解液)でタンパク質・タンパク質相互作用アッセイを行う場合は、Lysis Buffer を検討します。プロテアーゼ阻害剤(Sigma-Aldrich® Cat. No. P2714 または Roche® Cat. No. 05892791001)は必ず Lysis Buffer に添加してください。次に、アッセイに必要な細胞数(溶解液を調製する前)の最適化を行います。以下のプロトコールでは、 $2 \times 10^6$  cells/ mL に調製した細胞溶解液を使用します。また、Lysis Buffer としては、以下をお勧めします。

- AlphaLISA lysis buffer (PerkinElmer, Cat. No. AL003)
- Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Cat. No. 9803)
- M-PER® (Thermo Scientific, Cat. No. 78501)
- Pierce IP lysis buffer (Thermo Scientific, Cat. No. 87787)

### 目的タンパク質の発現確認

細胞溶解液を調製した後は、どの程度の細胞溶解液を加えると、相互作用シグナルが得られるかを検討します。タグ付きタンパク質の場合は、AlphaScreen kit などにポジティブコントロールとして含まれている、タグ付きペプチドとの競合アッセイを行うことで目的のタンパク質の発現を確認します。

内在タンパク質の相互作用アッセイでは、目的タンパク質に特異的な抗体を使って Alpha アッセイを行うか、ウェスタンブロットティングで発現していることを確認します。

### 細胞ベースの相互作用アッセイプロトコール

1. 10  $\mu$ L の細胞溶解液を、96-well  $\frac{1}{2}$ AreaPlate に加えます。
2. アッセイバッファーで希釈した 15  $\mu$ L の Acceptor beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL)を加えます。
3. 室温で 30 分間インキュベーションします。
4. (検出に必要であれば)アッセイバッファーで希釈した、10  $\mu$ L のビオチン化抗タグ抗体(終濃度 1 nM)を加えます。
5. 室温で 60 分間インキュベーションします。

6. アッセイバッファーで希釈した、15  $\mu$ L の streptavidin Donor beads (終濃度 20  $\mu$ g/mL)を加えます。
7. 室温で 60 分間インキュベーションします。
8. Alpha 測定機器(EnVision あるいは EnSpire)で測定します。

タグ付きタンパク質の相互作用では、まず、Lysis Buffer の種類と、細胞溶解液の調製時の細胞数を最適化します。

Cells/well (lysates)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
20,000	A												
10,000	B												
5,000	C			Lysis Buffer A					Lysis Buffer B				
0	D												
20,000	E												
10,000	F												
5,000	G			Lysis Buffer C					Lysis Buffer D				
0	H												

図 28; タグ付きタンパク質の細胞ベース Alpha アッセイ例

内在タンパク質の相互作用では、まず、Lysis Buffer の種類と、使用する抗体ペアを検討し、細胞数は、まず 20,000 cells/well の細胞溶解液量から試すことをお勧めします。

Antibody pair		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pair #1	A												
Pair #2	B												
Pair #3	C			Lysis Buffer A					Lysis Buffer B				
Pair #4	D												
Pair #1	E												
Pair #2	F												
Pair #3	G			Lysis Buffer C					Lysis Buffer D				
Pair #4	H												

図 29; 内在タンパク質の細胞ベース Alpha アッセイ例

■ 細胞溶解液      ■ ネガティブコントロール

ネガティブコントロールには、複数の目的タンパク質のうち単一タンパク質しか発現させていない細胞、RNAi による発現抑制細胞、発現誘導を行わない細胞などの相互作用が起きない溶解液を使用します。

## 得られた相互作用シグナルの検証

- タグ付きタンパク質の場合：  
得られたシグナルが、目的タンパク質の相互作用かを確認するためには、タグなし組換えタンパク質との競合アッセイを行います。このアッセイは、細胞溶解液にタグなしタンパク質を加えるか、タグなしタンパク質がトランスフェクションされた細胞を使用します。
- 内在タンパク質の場合：  
共発現させた細胞溶解液の量とシグナルに相関関係があることを確認します。
- いずれの場合も、目的タンパク質の相互作用に影響を与えるような化合物あるいはペプチドを加えて、シグナルが特異的に得られたものかどうかを確認します。

## マイクロプレート

### アッセイのスケールアップ、スケールダウン

Alpha を使ったアッセイ条件の最適化は、384 ~ 96-well ベースで行うことをお勧めしますが、その後、容易にスケールアップ、スケールダウンが可能です。パーキンエルマーでは様々なボリウムに対応し、感度と S/ B の維持が図ることができるマイクロプレートをラインナップしています。特に、384-well shallow well と 1536-well を使用すると、試薬コストを低減することができます。

また、サンプルの蒸発を防ぐために、シール (TopSeal-A PerkinElmer Cat. No. 6050195) を貼ったままで測定可能です。このシールは Alpha のシグナルに干渉しません。

Microplate	Catalog Number	Color	Assay Volume	Comments
½ AreaPlate-96	6005560	white	40-50 µL	The 96-well plate that is recommended for the highest sensitivity in a 50 µL reaction
CulturPlate-96	6005680	white	100 µL	Coated for use in tissue culture
AlphaPlate-384	6005350	light-gray	24-50 µL	Light gray color reduces potential for well-to-well crosstalk
AlphaPlate-384 Shallow well	6008350	light-gray	20 µL	
AlphaPlate-1536	6004350	light-gray	8-10 µL	

## References

1. Bardwell, A.J., Flatauer, L.J., Matsukuma, K., Thorner, J. & Bardwell, L. A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J. Biol. Chem* **276**, 10374-10386 (2001).
2. Becker, M.N., Todd, T.M. & Moyer, R.W. An Amsacta moorei entomopoxvirus ortholog of the poly(A) polymerase small subunit exhibits methyltransferase activity and is non-essential for virus growth. *Virology* **375**, 624-636 (2008).
3. Cassel, J.A., Blass, B.E., Reitz, A.B. & Pawlyk, A.C. Development of a Novel Nonradiometric Assay for Nucleic Acid Binding to TDP-43 Suitable for High-Throughput Screening Using AlphaScreen® Technology . *J Biomol Screen* **15**, 1099-1106 (2010).
4. Dawson, R. et al. The N-terminal domain of p53 is natively unfolded . *J. Mol. Biol* **332**, 1131-1141 (2003).
5. Lavens, D . et al. Definition of the interacting interfaces of Apobec3G and HIV-1 Vif using MAPPIT mutagenesis analysis . *Nucleic Acids Res* **39**, 1902-12 (2009).
6. Lax, I. et al. Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha . *Mol. Cell. Biol* **8**, 1970-1978 (1988).
7. Lazar, G.A. et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function . *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4005-10 (2006).
8. Mohamed, M.R. et al . Proteomic screening of variola virus reveals a unique NF-kappaB inhibitor that is highly conserved among pathogenic orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**, 9045-9050 (2009).
9. Rahman, M.M., Mohamed, M.R., Kim, M., Smallwood, S. & McFadden, G. Co-regulation of NF-kappaB and inflammasome-mediated inflammatory responses by myxoma virus pyrin domain-containing protein m013. *PLoS Pathog* **5**, e1000635 (2009).
10. Waller, H., Chatterji, U., Gallay, P., Parkinson, T. & Targett-Adams, P. The use of AlphaLISA technology to detect interaction between hepatitis C virus-encoded NS5A and cyclophilin A. *J Virol Methods* **165**, 202-210 (2010) .
11. Werden, S.J. & McFadden, G. Pharmacological manipulation of the akt signaling pathway regulates myxoma virus replication and tropism in human cancer cells . *J. Virol* **84**, 3287-3302 (2010).

\*記載されている製品の名称、価格、仕様や外観については予告なしに変更される場合がありますので予めご了承ください。  
\*記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。  
\*本カタログに記載されている全ての製品は、試験研究目的のみご使用いただけます。



株式会社パーキンエルマージャパン

www.perkinelmer.co.jp

バイオディスカバリー事業部

本 社 〒240-0005 横浜市保土ヶ谷区神戸町134

横浜ビジネスパーク テクニカルセンター4F  
TEL(045)339-5862 FAX(045)339-5872

大阪支社 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町5-3

TEL(06)6386-1771 FAX(06)6386-6401

東京営業所 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町1-7-17 CTKビル5F

TEL(03)3866-2647 FAX(03)3866-2652

九州営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-12-6 花村ビル2F

TEL(092)474-2311 FAX(092)473-8353