

HaloTag ベースの化合物アレイによる感度増強と多重スクリーニング

近藤恭光

化合物アレイの改良は、過去において小分子化合物のスライドガラスへの固定化に重点が置かれ、我々の研究室で開発された光親和型固定化以外にもいくつもの固定化法が開発されてきた。スライドガラス上に固定化された小分子化合物に結合したタンパク質を検出する方法としては、タンパク質を直接的または抗体を介して間接的に蛍光色素を標識して行うのが一般的である。タンパク質の表面に出ているアミノ基を利用して、直接的に蛍光色素を標識した場合、タンパク質の活性部位や小分子化合物との相互作用に必要なアミノ酸に標識されてしまうと、所望の小分子化合物とタンパク質との相互作用が検出できなくなってしまう。そのため、我々は His や GST タグを融合したタンパク質を用いて、抗タグ抗体、蛍光標識 2 次抗体により間接的にタンパク質を標識して検出している。また、蛍光タンパク質を融合して検出する方法も利用している。抗体を使って検出を行った場合、抗体処理や洗浄時に当然のごとく標的タンパク質の濃度が低下しており、化合物-タンパク質の相互作用が弱い場合にはタンパク質が化合物から外れ、検出できないことも考えられる。今回紹介する論文は、HaloTag を使ってタンパク質を直接蛍光標識して検出する方法であり、従来の抗体で検出する方法との比較を行っており、これらのデータは大変興味深く参考になる。また、HaloTag を使った多重スクリーニングにより、タンパク質のアイソフォーム特異的なリガンドを探している。

紹介論文

A HaloTag-based small molecule microarray screening methodology with increased sensitivity and multiplex capabilities

D.J. Noblin¹, C.M. Page¹, H.S. Tae¹, P.C. Gareiss², J.S. Schneekloth², & C.M. Crews^{1,2}

(¹Departments of Molecular Cellular and Developmental Biology, Chemistry, and Pharmacology, Yale University, Connecticut, USA, ²Yale Center for Molecular Discovery, Connecticut, USA)

ACS Chemical Biology, **x**, xxx-xxx (2012). 2012 Oct 11 Epub ahead of print

要旨

小分子マイクロアレイは、標的タンパク質の機能の阻害に依存せず、小分子-タンパク質間相互作用をスクリーニングする一般的なプラットフォームである。小分子マイクロアレイの適用範囲や実用性を広げる試みにおいて、我々はアッセイ感度の向上や多重スクリーニングをできるように、小分子マイクロアレイスクリーニングの方法を改善した。標的タンパク質を HaloTag タンパク質に融合することによって、共有結合的に蛍光分子でタンパク質を標識することが可能になり、アッセイ感度の増加と多重スクリーニングを可能にした。我々は FKBP12 と二つのリガンド（ラパマイシンと ARIAD バンプリガンド）の相互作用を使って、HaloTag ベースの小分子マイクロアレイスクリーニング法がアッセイ感度を著しく向上させることを示した。それに加えて、野生型の FKBP12 と FKBP12 F36V 変異型を使って、別々のタンパク質アイソフォームを前もって異なる蛍光色素で標識することにより、多重スクリーニングができることとアイソフォーム特異的なリガンドを同定できることを示した。最後に、我々は多重スクリーニング技術が 2 万化合物の中から、PTP1B の一つのアイソフォームに対する選択性を持つリガンドを同定できることを示した。