

百聞は一見に如かず

CIPSM (Center for Integrated Protein Science Munich) では、Tecan のインフィニット M1000 マイクロプレートリーダーを使用し、解析に 3D スキャン機能を駆使している。



ミュンヘン大学
Molecular Human Biology
Heinrich Leonhardt 教授

Leonhardt 教授の
研究グループの研究者
Carina Frauer 博士

ドイツのミュンヘン大学を本拠地とする CIPSM (Center for Integrated Protein Science Munich) は、さまざまな技術を利用したエピジェネティクス研究を専門とする。CIPSM では、ナノボディの解析に生きた細胞の画像化や顕微鏡検査、ダイナミックイメージング技術、超解像度顕微鏡検査を利用しているほか、高性能 Quad4 Monochromators™ をベースとしたインフィニット M1000 マイクロプレートリーダーの 3D スキャン機能¹や、柔軟性と感度に優れた多色相互作用試験を活用している。

ミュンヘン大学の Molecular Human Biology の Heinrich Leonhardt 教授はこう説明する。「従来の抗体は、2 種類の H 鎖および 2 種類の L 鎖のたんぱく質からなる高分子のため、生きた細胞を使用した研究には適しませんでした。それに比べナノボディは、ヒト抗体の約 10 分の 1 のサイズの比較的シンプルなたんぱく質で、1 種類の H 鎖でできています。従来型の抗体に近い抗原結合能を持ちながら、安定性に優れサイズが小さく、生きた細胞の内部で機能するというメリットがあるため、効果的な代替物質とされています。そのためこの抗体は、蛍光標識を付けて細胞内の抗原をトレースするために使用します。逆転写 PCR (RT-PCR) で抗原結合ドメインを増幅し、組み換え体のライブラリを作成することも、特定のバインダーを単離することもできます。このバインダーはその後、E. coli に発現させ、精製して生きた細胞の研究に使用したりアフィニティー精製のマトリクスに結合させたりします。」

ミュンヘン大学で研究を行う Carina Frauer 博士がこのプロセスを説明する。「私たちはナノボディを多様な結合アッセイなどのさまざまな用途に利用し、in vivo 研究を生化学的試験と組み合わせようとしています。セファロース ビーズに固定した GFP 結合ナノボディ (GFP-Trap®、

ChromoTek 社製) を使用して GFP 融合タンパク質を捕捉し、精製して生化学的特性を解析します。次に固定化した GFP 融合タンパク質を蛍光標識した DNA 基質またはペプチドとインキュベートし、結合していない基質を除去します。」

「その後、インフィニット M1000 リーダーを使用して蛍光シグナルを測定します。インフィニット M1000 は、高い感度を備え、極めて詳細な設定で複数の蛍光標識を識別できます。そこで直接競合し合う異なる DNA 基質を同時に比較できるような標識を慎重に選択し、配列の特異性を直接特定できるようにします。DNA またはペプチドの標識と固定化した GFP 融合タンパク質の蛍光シグナルを測定し、その比率を算出し、特定の DNA またはペプチドの結合量を定量します。また機序に基づくメチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む DNA 基質を使用し、活性メチルトランスフェラーゼとの不可逆的な共有結合複合体の形成を測定します。これが触媒作用の尺度となるため、私たちは基本的に放射能を使用しないメチルトランスフェラーゼ活性試験を確立したことになります。」

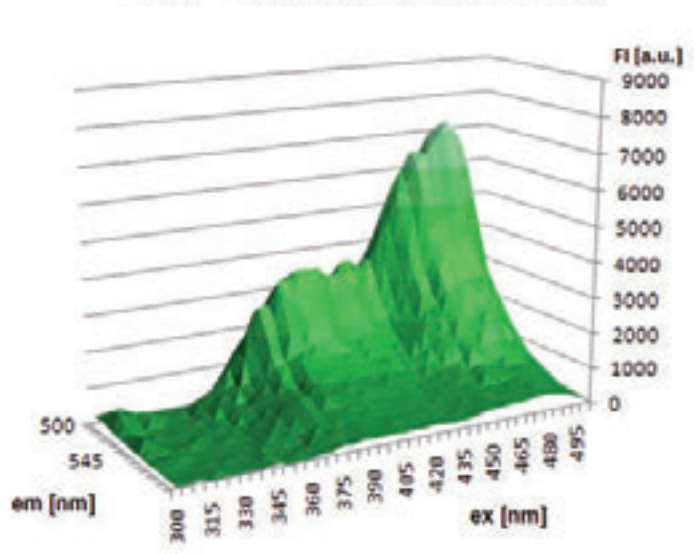
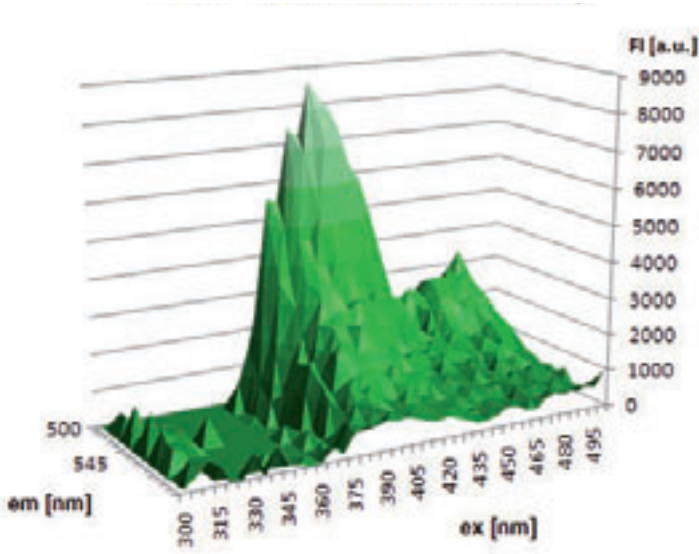
Leonhardt 教授はこう説明する。「この分析法の特長は、実際にタンパク質を定量できることです。さまざまな結合アッセイがありますが、通常はタンパク質そのものを定量するわけではありません。しかし私たちの分析法は、タンパク質、すなわち投入サンプルと結合 / 非結合画分を定量できます。また M1000 の 3D スキャン機能を利用して、生きた細胞内で GFP のスペクトル特性をナノボディによって変化させる試験を実施できました。非常にすばらしい結果が得られました。」

Frauer 博士はこう説明する。「私たちは、GFP のスペクトル特性を調節する特異的なナノボディ



GFP + コントロール ナノボディ

GFP + エンハンサー ナノボディ



3D スキャンにより明らかになったナノボディによる GFP のスペクトル特性の変化

を細胞に加え、GFP を共発現させました。3D スキャンでは励起光と放出光が同じプロットで表示できるので、ナノボディの結合によって変化した GFP の蛍光の励起と放出の波長を非常にわかりやすく図示できます。」

Leonhardt 教授はこう続けた。「この装置は柔軟性に優れ、使いやすく迅速ですので、実験時間が短縮されます。ソフトウェアもシンプルでわかりやすく、疑問があれば Tecan が行き届いた支援をしてくれます。私たちは、新しい手法

の技術開発と導入に取り組んでいますので、この装置は汎用性が高く本当に便利です。」

1. Kirchhofer, A., Helma, J., Schmidhals, K., Frauer, C., Cui, S., Karcher, A., Pellis, M., Muyl-dermans, S., Casas-Delucchi, C.S., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., Hopfner, K.P., Rothbauer, U. (2010) 「Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. (ナノボディを用いた生きた細胞内のタンパク質の特性調節)」 Nat Struct Mol Biol. Jan;17(1):133-8. Epub 2009 Dec 13.

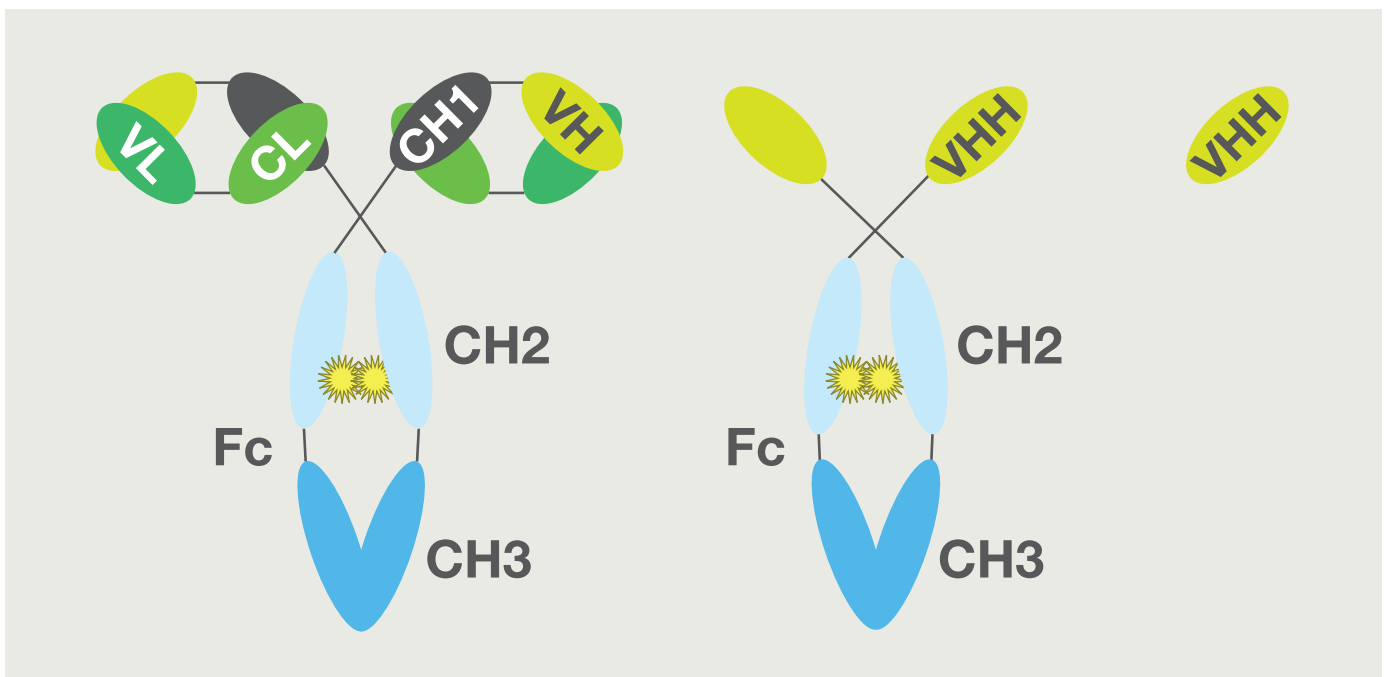
Tecan のインフィニット M1000 に関する詳細は、www.tecan.co.jp/infiniteM1000 をご覧ください。

CIPSM に関する詳細は、www.cipsm.de をご覧ください。

■この記事は2011年1月発行 Tecan Journal 1/2011 に掲載されているユーザーストーリーを抜粋、翻訳したものです。ご質問、ご要望は下記までお願いします。

テカンジャパン株式会社

TEL. 044-556-7311/FAX. 044-556-7312
E-mail: infojapan@tecan.com



(左から) 従来の抗体とラクダの抗体、ナノボディの概略図