



CARNA COFFEE BREAK - TECHNICAL NOTE - No.3

キナーゼ阻害剤の結合評価試験における 未活性化ビオチン化キナーゼの有用性

キナーゼの阻害剤を評価するには、酵素反応に対する阻害剤の阻害効果を見ることが最も単純かつ明瞭です。しかし、的確な酵素反応系構築のためには、ATPの濃度設定はもとより、的確な基質の選択なども非常に重要であり、アッセイ系のセットアップも容易ではありません¹⁾。また、十分な酵素活性のあるキナーゼが入手できない、製造できない、などといった問題を抱える場合も少なくありません²⁾。

一方、阻害剤評価では薬剤のキナーゼへの結合を評価する試験も取り入れられています。結合試験では結合が確認された化合物の酵素活性への関与が必ずしも確保されておらず、これは、受容体を標的とした結合試験で、活性の確認されたものがアゴニストかアンタゴニストか等が確保されていないのと同類です。しかし、結合試験では上述の酵素反応系の問題点が多く軽減されるほか、これから述べる結合実験ならではのメリットがあるのも事実です。

まず、酵素アッセイを実施している研究者にとって親しみやすいであろう結合実験の方法として、キナーゼとトレーサーの結合に対する競合法が挙げられます(図1)。時間分解蛍光共鳴エネルギー転移法(TR-FRET)をその検出手法としているHTRF®(cisbio/PerkinElmer)やLanthaScreen™(Thermo Fisher Scientific社)など、競合法を用いた結合実験ではキナーゼ研究用にすでに多くのキットが市販されています。

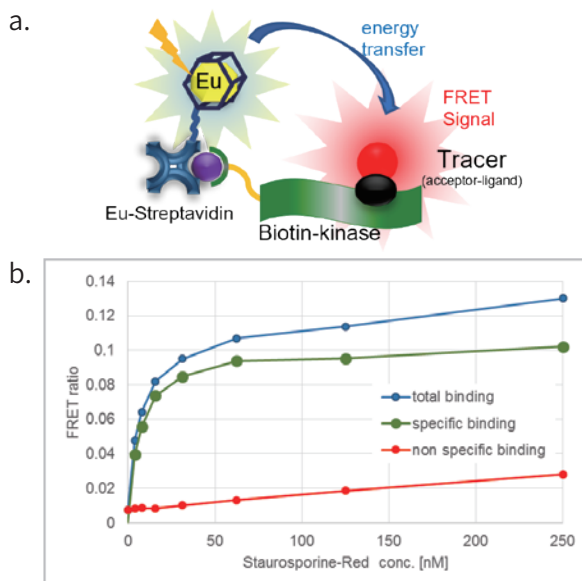


図1. TR-FRET 技術を用いたキナーゼの結合試験
a. 模式図 b. BTN-BTK [activated] (Carna cat# 08-480-20N) を用いた Staurosporine-RED (cisbio/PerkinElmer 社) をトレーサーとした結合実験

この方法は、mix and measure という手技的に簡便なアッセイ法ですが、最適な蛍光物質で標識されたトレーサーが必要となります。一方、シンプルに化合物の結合を検出する系として表面プラズモン共鳴法 (SPR) が広く利用されており、SPR 法では競合法に必要なトレーサーが不要なばかりか、トレーサーのキナーゼへの結合に競合しない部位に化合物が結合した場合でもその結合を検出することができます。

TR-FRET 競合法あるいは SPR 法いずれの系においても必須となるのがキナーゼタンパク質の固定化で、TR-FRET法においては Donor へ、SPR法においてはセンサーチップへのタンパク質固定化が必要となります。固定には GST タグや His タグを利用することも可能ですが、高い結合親和性および選択性をもつビオチン-ストレプトアビジンの組み合わせを固定に利用することには大きなメリットがあります³⁾。

カルナでは、長年培った GST 融合キナーゼ製造経験を活かし、現在ビオチン標識キナーゼを数多く開発、提供をしています。ビオチンは低分子であるがゆえ化学修飾により既存タンパク質に容易に付加することができますが、付加するビオチンの数および修飾部位のコントロールが容易ではないため、活性部位に影響を与えることなくビオチンを付加し、キナーゼの活性を維持した状態での均質なビオチン化キナーゼを得ることは極めて困難です。しかし、カルナ提供のビオチン化キナーゼ (BTN-キナーゼ) は N 末に DYKDDDDK タグを挟みビオチンを 1 分子のみ付加しているため化学修飾により懸念される問題点に悩まされる必要がありません(図2)。

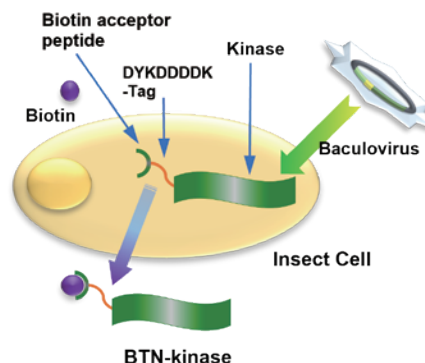


図2. キナーゼの N 末にビオチン 1 分子を標識したカルナのビオチン化キナーゼ (BTN-キナーゼ) の作製

キナーゼを用いた結合試験、中でも競合法ではない試験では、キナーゼの立体構造が細胞内と異なっているも実験系としては成立してしましますが、創薬に向け



CARNA COFFEE BREAK - TECHNICAL NOTE - No.3

た化合物評価を行う場合、評価に用いるジオチン化されたキナーゼが生体内と同一の構造を持つことが望ましいことは言うまでもありません。「酵素活性をもつキナーゼタンパク質」を提供基本ポリシーとするカルナは、BTN-キナーゼにおいてもこれを例外としていません。BTN-キナーゼを含む弊社提供キナーゼタンパク質製品全てについて製造ロット毎に活性を測定し Production information シート上で測定された活性測定データを提示しています。

カルナ提供の一部のキナーゼには、適切な処理がなされその活性が高められています²⁾。ATP 処理もその一つです。製造後 ATP 未処理の状態ではキナーゼ活性が低い、あるいは活性測定でタイムコースを取るとラグをもつなどと、活性を指標にした薬剤評価用アッセイ系構築で使いにくいキナーゼの中には ATP 処理を行うとラグも解消されまた活性が高まるものが存在します(図 3)。

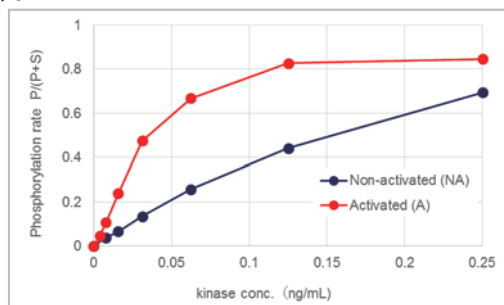


図 3. ATP 処理による BTK キナーゼの活性化
Src 基質としたリン酸化反応における BTN-BTK[activated] および BTN-BTK[non-activated] のタンパク質濃度依存性

カルナでは、活性化処理をして提供している BTN-キナーゼについては、活性化未処理のキナーゼも併せて提供をしています。これは、弱いキナーゼ活性をもつ活性化未処理キナーゼでも、結合活性測定用であれば十分に利用できると考えているためです。そして、ここで特にカルナが重要視していることは、昆虫細胞で発現させただけでは低い活性しか持たない活性化未処理キナーゼであっても、活性化処理をすることにより高い酵素活性を獲得することが出来ることを確認している点です。このことは、例えば活性の低い活性化未処理キナーゼであっても生体内に近い構造を保持した状態で提供していることを示唆しているのです。

上記の様な視点からカルナの協業先である Netherlands Translational Research Center B.V. (NTRC) 社は、活性におよそ 5 倍の開きがあるカルナの BTN-BTK [activated] (Carna cat# 08-480-20N) と BTN-BTK [non-activated] (Carna cat# 08-480-23N) (図 3) を用いて、ATP 結合ポケットを標的とする 3 種の可逆的キナーゼ阻害剤 (ARQ-531, vecabrutinib, fenebrutinib) を SPR 法で解析しました。その結果、ARQ-531 および vecabrutinib においては、BTN-BTK[activated] お

よび BTN-BTK [non-activated]、両キナーゼを用いた評価にほとんど差が認められませんでした。しかしながら fenebrutinib は、BTK [non-activated] へ早い結合の後ほとんど解離しないかのような解離パターンを示したのに対し、BTN-BTK[activated] に対しては、早い解離に続きプラトーに達するような様子を示しました(図 4)。詳細は NTRC 社のホームページ (Case study - BTK inhibitor fenebrutinib | ResidenceTimer™⁴⁾) を参照いただくとして、この解析結果から ATP による活性化の有無により、キナーゼに対する薬剤の結合解離に異なるパターンを示しうることが明らかになりました。

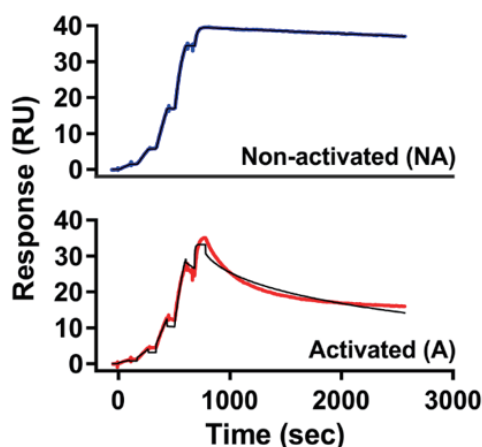


図 4. BTN-BTK[activated] (下) および BTN-BTK[non-activated] (上) に対する fenebrutinib 結合の SPR sensorgram の比較

カルナのウェブサイト上の各 BTN-キナーゼ製品リストには、参考資料として NTRC 社および弊社内で実施した SPR 測定によるセンサーグラムが PDF にて添付されています⁵⁾。

リスト上のキナーゼ製品の活性化処理の有無など詳細情報、ご不明点につきましてはお気軽にお問合せ、ご相談ください。

また、NTRC 社が提供する SPR 測定を用いた解析サービス、Residence Timer™ のご利用希望についてもご連絡お待ちしております。

- 1) <Carna Coffee Break>No.2 目的のキナーゼ固有の酵素活性を検出する
https://www.carnabio.com/output/newsletter_archive/pdf_10_ja.pdf
- 2) <Carna Coffee Break>No.1 リン酸化酵素活性を持つキナーゼ作成のお話
https://www.carnabio.com/output/newsletter_archive/pdf_8_ja.pdf
- 3) カルナニュースレター Vol.1 ビオチン - アビジンの親和性
https://www.carnabio.com/output/newsletter_archive/pdf_1_ja.pdf
- 4) NTRC 社のホームページ (Case study - BTK inhibitor fenebrutinib | ResidenceTimer™)
<https://www.residencetimer.com/blog/factsheets/case-study-btk-inhibitor-fenebrutinib/>
- 5) SPR センサーグラム
<https://www.carnabio.com/japanese/product/protein8.html>