

ATP 濃度から見た セルフリー及び細胞アッセイの意義

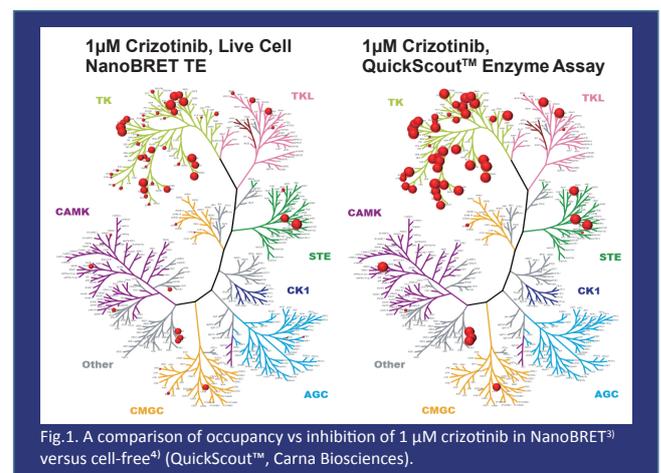
多くのキナーゼ阻害剤は ATP 結合部位に結合します。したがってキナーゼ阻害活性の測定に ATP 濃度が大きく影響します。セルフリーのキナーゼアッセイでは先ず Km 値付近の ATP 濃度で評価をしますが、細胞内の ATP 濃度は一般的に数 mM と言われております。ATP 濃度の観点からセルフリー及び細胞の試験の意義について考えてみます。

先ずセルフリーの酵素反応系で Km 値付近の ATP 濃度を用いる理由について復習してみます。Km 値は ATP とキナーゼ間の親和性の指標であり、Ki 値は阻害剤とキナーゼ間の親和性を表します。競合阻害剤の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は、Cheng-Prusoff の式 (IC₅₀ = Ki + Ki/Km × [ATP]) に従うと考えられます。すなわち IC₅₀ は ATP 濃度に依存していることがわかります。阻害剤はキナーゼ毎に異なる Ki 値を持ち、全てのキナーゼは固有の Km 値を持ちます。そこで ATP 濃度に Km 値を用いると、Cheng-Prusoff の式は IC₅₀ = 2Ki となり、全てのキナーゼに対する IC₅₀ を、キナーゼと阻害剤の親和性に基づいて同等に評価することが可能になります¹⁾。Table 1 は ATP に対する Km 値が 1μM の Kinase A 及び 10μM の Kinase B に対して、Ki 値がそれぞれ 0.1μM および 0.2μM の阻害剤 Z の IC₅₀ を Cheng-Prusoff の式で計算しました。各 Km 値の ATP 濃度で測定した Kinase A 及び Kinase B に対する阻害剤 Z の IC₅₀ は 0.2μM 及び 0.4μM となり、各キナーゼに対する IC₅₀ に基づいて阻害剤の結合親和性を

Enzyme	Kinase A	Kinase B
ATP Km (μM)	1	10
Inhibitor Z Ki (μM)	0.1	0.2
IC ₅₀ (μM) at each ATP conc. (μM)		
1 (Km for Kinase A)	0.2	0.2
10 (Km for Kinase B)	1.1	0.4
1,000 (around the conc. in cells)	100	20

Table 1. IC₅₀ calculation example (IC₅₀ = Ki + Ki/Km × [ATP])

順位付けすることができました。ただし、阻害剤を医薬品に磨き上げるには細胞で効果を示さなければなりません。細胞内は ATP 濃度が一般的に数 mM と言われており、Km 値より ATP 濃度が高い環境になります。Table 1 の 1mM ATP では Kinase A 及び Kinase B それぞれの IC₅₀ が 100μM 及び 20μM となり、Ki 値と逆転した現象が見られます。すなわち、ATP 濃度を高くすると、Km 値の小さいキナーゼほど IC₅₀ が Km 値でのデータからかけ離れてしまうわけです。また、Roberts M らは、1μM の crizotinib で実験を行ったとき、HEK293 を用いた細胞アッセイではセルフリー系の阻害率と比べて crizotinib のターゲット占有率が大幅に減少することを報告しています²⁾ (Fig.1)。セルフリー系で ATP 濃度を高くして簡易的に ATP 濃度を細胞内に近づけることはできますが、細胞での違いは ATP 濃度だけでしょうか？細胞内では他のコンポーネントが無限に存在し、細胞膜というバリアも存在します。したがって、セルフリー系で選ばれた阻害剤が細胞内で阻害活性を持ち続けられるかどうか確認することは非常に重要です。



当社では組換え体キナーゼを用いたセルフリーの酵素アッセイサービス（プロファイリングサー

ビス) 及び NanoBRET™ Target Engagement (TE) Intracellular Kinase Assay System (Promega 社) を用いたセルベースアッセイサービスを提供しております。

セルフリー系では、ATP 濃度を Km に設定したもののみならず、1mM に設定したサービスをご提供しています。また、セルベースアッセイは NanoLuc® ルシフェラーゼを融合させたキナーゼタンパク質を培養細胞に発現させ、BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) により薬剤のキナーゼへの結合を検出できますので (Fig.2)、細胞内でのキナーゼに対する薬剤の親和性を調べる目的にご使用いただけます。細胞膜を壊すことなく、ありのままの状態で細胞内における薬剤の結合親和性を測定することを可能にしました。また薬力学の新たな指標として近年特に注目されているキナーゼと薬剤の

解離のしやすさ、residence time を細胞内で測定することが可能です。同一 IC₅₀ の薬剤、あるいは既知薬剤との差別化に有効な武器になると考えております。

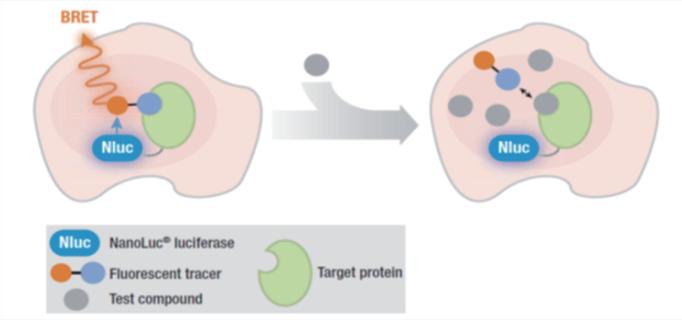
- ・プロファイリングサービス
- ・NanoBRET™ TE Intracellular Kinase セルベースアッセイサービス

引用)

- 1)Protein Kinases as Drug Targets. 2011, ISBN: 978-3-527-31790-5, B. Klebl.
- 2)SLAS2020, Broad Kinome Selectivity and Residence Time Analysis in Live Cells with NanoBRET, Robers M.
- 3)Cell Chem Biol 2018; 25(2): 206-214.e11. Vasta JD.
- 4)PLoS One. 2014; 9(3): e92146. Uitdehaag JC.

このニュースレターの中で論文から引用した情報の日本語翻訳文はカルナバイオサイエンス社が作成しました。

標的タンパク質(NanoLuc® luciferase 融合タンパク質)を発現させた細胞に BRET acceptorとなる蛍光標識した膜透過性tracerを添加する。Tracerが標的分子に結合するとBRET が起こり、acceptorが蛍光を発する。



化合物を添加することによる蛍光シグナルの変化にて化合物の結合を検出。

Fig.2. NanoBRET™ System