



Bright Makes This Green Light Right

Monster Green™ タンパク質：より明るく、長く発現するGFP

By Brian D. Almond, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

プロメガでは *Montastrea cavernosa* からクローニングされた新規な *gfp* 遺伝子を持つ新しい Monster Green™ Fluorescent Protein phMGFP Vector を発売しました。この Monster Green™ 蛍光タンパク質レポーター遺伝子 (hMGFP) は発現効率の向上と信頼性を確実にするために “ヒューマナイズ” されています。実験結果では、Monster Green™ 蛍光タンパク質は、市販の GFP よりも明るいシグナルを生じ、長く発現を持続することを示しました。

Monster Green™ 蛍光タンパク質は、great star coral (*Montastrea cavernosa*) からクローニングされた蛍光タンパク質遺伝子を改良合成し、その遺伝子から発現されるタンパク質産物です。

はじめに

GFP (Green Fluorescent Protein) は、一般的に遺伝子発現や細胞内におけるタンパク質の移動をモニタリングするために利用されています。標準的な蛍光顕微鏡で簡単に可視化できる GFP 融合タンパク質は、細胞内の標的タンパク質局在性をリアルタイムに追跡するために使用されます。

プロメガの Monster Green™ 蛍光タンパク質は、great star coral (*Montastrea cavernosa*) からクローニングされた蛍光タンパク質遺伝子を改良合成し、その遺伝子から発現されるタンパク質産物です。ネイティブな *Montastrea gfp* は、光退色するタンパク質を発現し、非常に微弱な蛍光シグナルしか生じないため、レポーターとしては不適格でした。

ネイティブ GFP の蛍光タンパク質を改良するために、ランダムな変異導入を行い、MGFP クローンが作製されました。このクローンは、光退色に抵抗性を持ち、ネイティブな遺伝子よりも明るいシグナルを生じる GFP を発現します。

MGFP 遺伝子には多くのコンセンサス転写因子結合サイトが存在し、特定の実験条件下では非特異的な転写活性を示す可能性がありました。多数の転写因子結合サイトの存在は、レポーターとしての MGFP の信頼性を落とす結果となります。タンパク質発現の信頼性を改善するために、数多く含まれていたコンセンサス転写因子結合サイトを MGFP 遺伝子上 67 箇所から合成 hMGFP (“ヒューマナイズ” MGFP; 図1) の3箇所までに削減しました。

MGFP のコドンは哺乳動物細胞での使用頻度が低いいため、哺乳動物細胞での MGFP の発現効率を低下させる可能性がありました。合成 hMGFP 遺伝子では、発現レベルを改善させるために哺乳動物で使用頻度の高いコドンのみを使用しています。

さらに哺乳動物発現効率を向上させるために、翻訳開始を促進させる Kozak 配列を遺伝子の開始位置に付加しました。また、真核生物のポリAシグナル (AATAAA) を含むその他の不要なエレメントを削除しました。

ベクターのコンストラクトと制限酵素サイト

Monster Green™ 蛍光タンパク質遺伝子は、プロメガの pCI Mammalian Expression Vector を改変したものにクローニングされ、Monster Green™ Fluorescent Protein phMGFP Vector (カタログ番号 E6421; 図2) として生まれました。pCI Vector は複製開始点 f1 origin から *Nae I* サイトが除去されているため、唯一の *Nae I* サイトは hMGFP 遺伝子内に存在することになります。

合成 hMGFP 遺伝子は、汎用される制限酵素サイトの数を最低限に抑えています。制限酵素サイト (*EcoRV*, *Sma I*, *Nae I*) は、融合タンパク質作製時の利便性を考慮して付加しています。*EcoRV* および *Sma I* サイトは hMGFP の開始コドン ATG の手前に位置しています。*Nae I* サイトは、hMGFP の読み取り枠の停止コドン直前に付加されています。これらのサイトをそれぞれ消化すると、hMGFP の翻訳読み枠を保持した平滑末端の断片を生じます (図2)。クローニングの利便性のために hMGFP の前部に *Nco I*、後部にユニークな *Xba I* 制限酵素サイトが加えられています。2番目の *Nco I* サイトは Monster Green™ タンパク質の読み取り枠の 561bp 上流に存在していますが、エンハンサー/プロモーターに影響を与える可能性があるため除去していません。

スペクトル特性

Monster Green™ 蛍光タンパク質のスペクトル特性は、市販の GFP に較べやや赤方にシフトしています。励起波長のピークは 505nm でショルダーピークが 480nm に存在し、蛍光波長のピークは 515nm です (図3)。弊社では hMGFP の可視化に標準的なフルオロイソチオシアネート (FITC) フィルターを推奨しています。hMGFP 発現の蛍光顕微鏡による分析には、励起フィルター (470 ± 20nm [470/40nm]) および蛍光フィルター (515nm [ロングパス]) を使用します。FACS™ 分析には、アルゴンレーザー (励起 488nm) と蛍光フィルター (530 ± 15nm [530/30nm]) の標準的な FACS™ セッティングを推奨します。

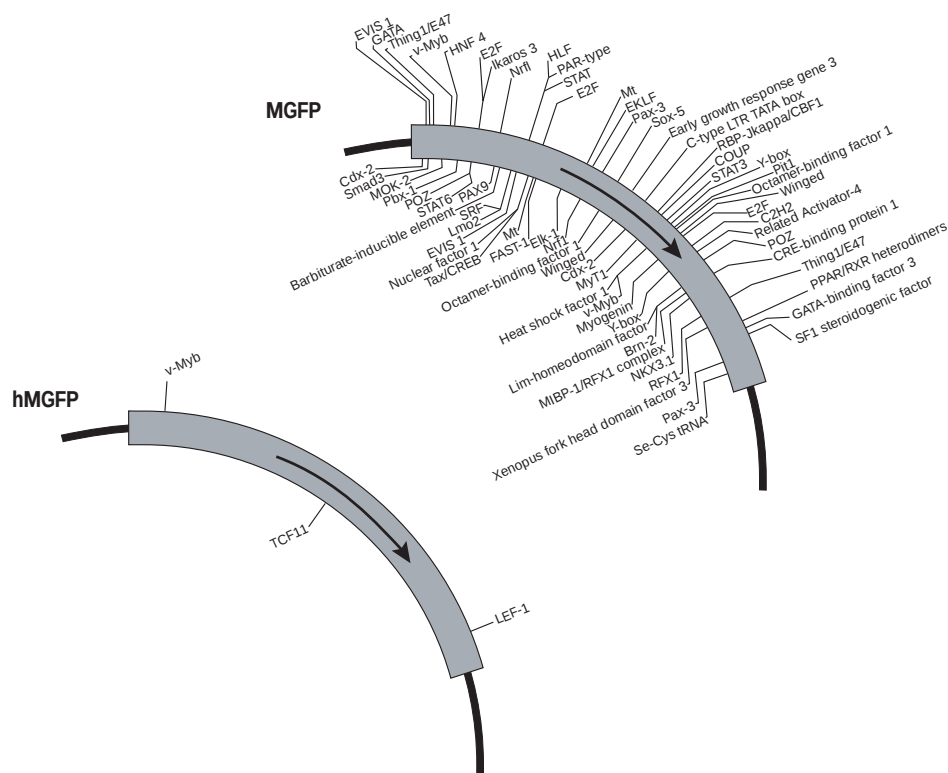


図1. MGFPおよび合成hMGFP遺伝子上の転写因子結合サイト
MGFPに存在するほとんどの（96％）転写因子結合サイトを除去して合成hMGFP遺伝子を作製した。

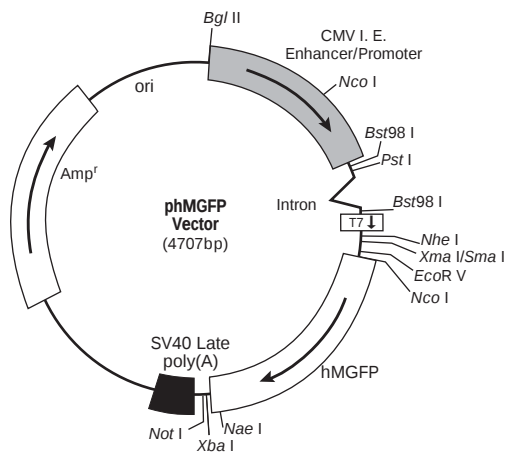


図2. phMGFP Vectorのサークルマップとマルチクローニング領域
図中の“hMGFP”は、hMGFPの読み枠; Amp^rは*E. coli*のアンピシリン耐性を与える遺伝子; oriは*E. coli*でのプラスミド複製開始点。hMGFPおよびAmp^r遺伝子内の矢印は転写方向を示す。

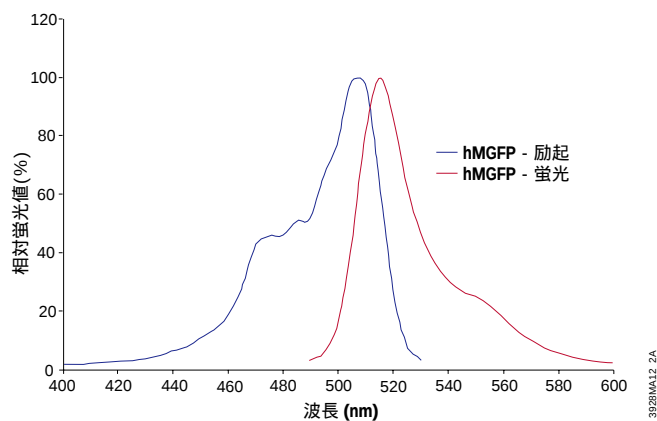


図3. Monster Green™ 蛍光タンパク質の励起/蛍光スペクトル
CHO細胞にpMGFP Vectorをトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、細胞をGlo Lysis Buffer, 1X（カタログ番号 E 2661）で溶解し、Spex Fluorolog®-2 spectrofluorometerで励起/蛍光スペクトルを計測した。蛍光スペクトルはライセートを用い、480nmで励起させて収集した。励起データは、蛍光波長540nmで400～530nm間を収集した。

蛍光強度の向上

蛍光強度の増加したGFPは、様々な実験アプリケーションにおける蛍光の可視化を容易にし、感度を向上させます。Monster Green™ 蛍光タンパク質の相対蛍光強度を決定するために、hMGFPおよび市販の*gfp* 遺伝子を同じベクターにそれぞれクローニングし、CHO細胞およびNIH3T3細胞にトランスフェクションした後、FACS™ で解析しました（図4）。データは、バックグラウンド以上 3 logの蛍光を収集したものです。蛍光顕微鏡で観察すると、第1のlog範囲（図4の緑色枠）でのトランスフェクション細胞は、非常に薄暗い蛍光を示しました。第2の蛍光 log範囲（図4の青色枠）でのトランスフェクション細胞は明るく、3番目で最も高い蛍光log範囲（図4の赤色枠）の細胞は非常に高い蛍光を示しました。図4で示される%は、各蛍光log範囲におけるトランスフェクション細胞数の割合を示しています。

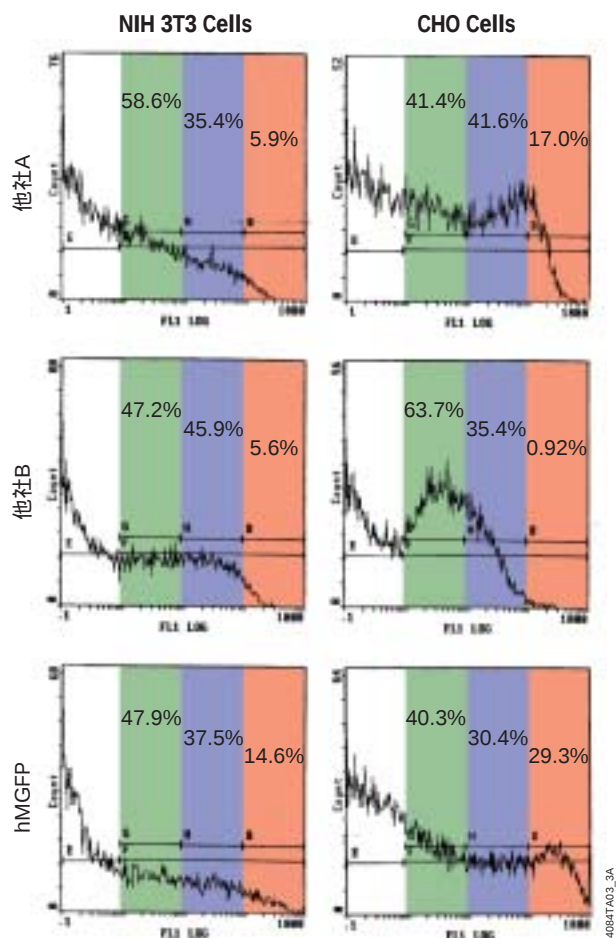


図4. 様々なGFP発現ベクターをトランスフェクションした細胞からのFACSデータ
全ての*gfp* 遺伝子は、同じ哺乳動物発現ベクター（pCI-neo）にクローニングし、CHOまたはNIH3T3細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、細胞をトリプシン処理し、Coulter Elite™ FACS™ Instrument（標準アルゴンレーザー[488nm]励起、530/30nm蛍光フィルター）で50,000個の細胞を解析した。蛍光細胞（トランスフェクション済み）と非蛍光細胞（トランスフェクションなし）の細胞集団に分けた。トランスフェクションした細胞では、バックグラウンド以上の3 logの蛍光を記録した。着色した枠で蛍光の3 logを分け、各枠内の数値は蛍光の各log内のトランスフェクション細胞の%を示す。3つの*gfp* 遺伝子を含むベクターのトランスフェクション効率は同等であった（データ未掲載）。追試実験でも同様な結果が得られた。

図4に示すとおり、より多くのhMGFPトランスフェクション細胞は、最も明るい3番目のlog（赤色枠）に分布しています。CHO細胞の場合、hMGFPをトランスフェクションした細胞が最も高い蛍光logで29.3%と高く、他社Aでは17.0%、他社Bでは0.92%の値を示しました。また、NIH3T3にトランスフェクションした場合、hMGFPの細胞が最も高い蛍光logで14.6%と高く、他社Aでは5.9%、他社Bでは5.6%の値を示しました。

FACS™ データの蛍光強度の定量は、トランスフェクション細胞あたりの平均蛍光強度として分析しました。CHOでのトランスフェクションで、hMGFPのトランスフェクション細胞あたりの平均蛍光強度は他社A比+40%、他社B比+238%を示しました（図5）。また、NIH3T3にトランスフェクションした場合、hMGFPのトランスフェクション細胞あたりの平均蛍光強度は他社A比+67%、他社B比+21%を示しました。

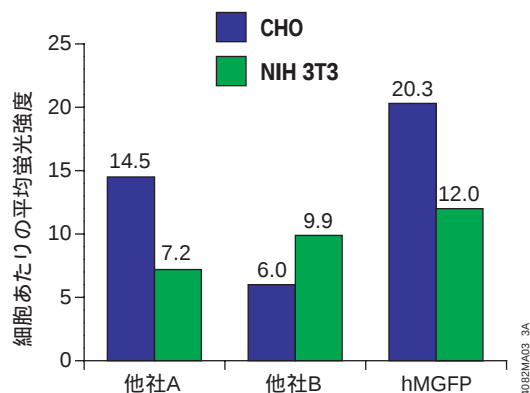


図5. トランスフェクション細胞あたりの平均蛍光強度
図4のFACS実験のデータをトランスフェクション細胞あたりの平均蛍光強度として分析した。

発現の持続性の増加

残念なことに、市販のGFPの多くは、哺乳動物細胞で発現するとアポトーシスを誘導し（1）、発現時間を縮める結果となります。発現の相対的な持続性を決定するために、FACS™の実験（図4、図5）と同じhMGFPおよび他社Aのレポーター遺伝子コンストラクトを使用し、発現持続性実験に供しました。トランスフェクション後1日目、hMGFPおよび他社Aの*gfp* をトランスフェクションした細胞間で蛍光強度の違いが観察されました（図6）。2日目、他社Aに比べhMGFPでは蛍光強度の劇的な増加が認められました。この顕著な蛍光強度の違いは3日目まで続きました。6日目の他社A *gfp* では蛍光を発するわずかな細胞が検出されるだけでした。逆に、hMGFPの場合、蛍光を生じている細胞は容易に観察することができました。興味深いことに、6日目のhMGFPトランスフェクション細胞では、蛍光細胞が局在していました。最後の7日目には他社Aの*gfp* をトランスフェクションした細胞では、薄暗い蛍光を発する細胞のみが観察されました。hMGFPトランスフェクション細胞で、前日に観察された蛍光の局在領域は7日目にも認められました。

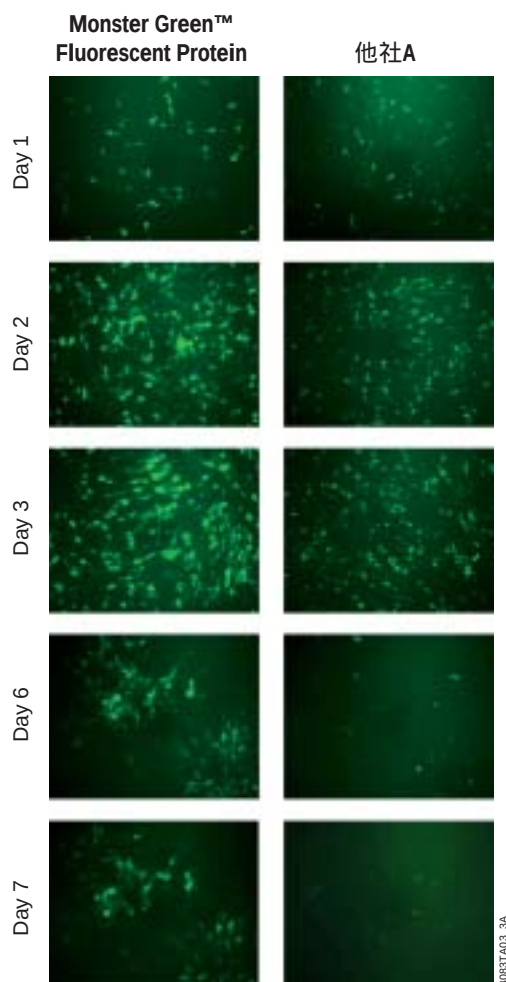


図6. 発現の持続性

他社AおよびhMGFPのgfp遺伝子を含む哺乳動物発現ベクターをNIH3T3細胞にそれぞれトランスフェクションした。2日ごとに培地を交換し、選択用の試薬は添加しなかった。顕微鏡による分析は、Zeiss Axiovert® S100 fluorescent microscope (470/40nm 励起フィルター、515nm ロングパス蛍光フィルター) を用いた。イメージデータはSpot Diagnostic Imaging equipmentで収集した。追試実験でも同様な結果が得られた。

結論

当初*M.cavernosa*からクローニングされた新規なgfp遺伝子は、光の安定性を得るためのコンセンサスな転写因子結合サイト除去やコドン使用の最適化が施され、強い蛍光を発し、優れた耐容性を持つgfp遺伝子として生まれ変わりました。さらに、N-またはC-末端融合タンパク質の作製を簡便にする制限酵素サイトが付加されています。FACS™および蛍光顕微鏡を用いた分析では、Monster Green™ 蛍光タンパク質遺伝子 (hMGFP) およびその他の市販のgfpをトランスフェクションしたCHO細胞またはNIH3T3細胞において、プロメガのhMGFPがより明るい蛍光を生じ、長く発現を持続しました。

参考文献

1. Liu, H.S. et al. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **260**, 712–717.

プロトコール

- ◆ Monster Green™ Fluorescent Protein phMGFP Vector Technical Bulletin, #TB320, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tb320/tb320.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Monster Green™ Fluorescent Protein phMGFP Vector	20µg	E6421	78,000