



One Fusion Protein: Multiple Functions

細胞のイメージング、タンパク質の捕捉と固定化のための HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology

By Georgyi V. Los, Ph.D.¹, Al Darzins, Ph.D.¹, Chad Zimprich, B.S.¹, Natasha Karassina, M.S.¹, Randall Learish, Ph.D.¹, Mark G. McDougall, Ph.D.², Lance P. Encell, Ph.D.¹, Rachel Friedman-Ohana, Ph.D.¹, Monika Wood, M.S.¹, Gediminas Vidugiris, Ph.D.¹, Kris Zimmerman, B.S.¹, Paul Otto, M.S.¹, Dieter H. Klaubert, Ph.D.², and Keith Wood, Ph.D.¹; ¹Promega Corporation, ²Promega Biosciences, Incorporated

アブストラクト

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyは、生細胞またはin vitroにおいてタンパク質の部位特異的なラベリングを迅速に行える新しい選択肢を提供するためにデザインされました。このテクノロジーは、HaloTag™ タンパク質と合成リガンドとの効率的な共有結合形成をベースにしています。生理的条件下で迅速に形成されるこの共有結合は、特異性が高く実質的に不可逆であり、変性条件下でも安定した複合体を形成します。HaloTag™ リガンドは、蛍光ラベル、アフィニティー・ハンドルや固相に対する結合体など様々な機能を携行することができます。様々な光学的特性や機能を付加したラベル化HaloTag™ 融合タンパク質を作出できるため、生細胞や固定細胞におけるHaloTag™ 融合タンパク質のイメージング、局在性観察を可能にし、HaloTag™ 融合タンパク質およびタンパク質複合体の分析や単離を行うことができます。

HaloTag™ リガンドは交換可能であるため、遺伝子のコンストラクトを変えずに異なる波長でのイメージング、新しい機能の付加を簡単に行うことができます。

イントロダクション

タンパク質を特異的にラベルできるかどうかは、生細胞におけるタンパク質のダイナミクスや機能を解明する上で重要な鍵となります(1)。しかし、従来法の多くは、蛍光タグを持つタンパク質を作製し、それらを元来のネイティブな環境下でイメージングするものでした。このような方法は時間がかかって難しく、タンパク質化学の専門知識を要し、しかも標識産物を細胞中にうまくマイクロインジェクションする必要があり、特別なテクニックと測定機器を必要とします(2)。一方、遺伝子をクローニングし、それを細胞にトランスフェクションすることで新しく合成されるタンパク質は、ネイティブなタンパク質と同じタンパク質局在パターンをとると考えられています。遺伝子融合を利用したタンパク質ラベル法の開発によって、細胞機能に対する理解がより広くなりました。ここでは、生細胞とin vitroの両方において融合タンパク質を効率的にラベリングできる柔軟性に富む新規な HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyを紹介します。

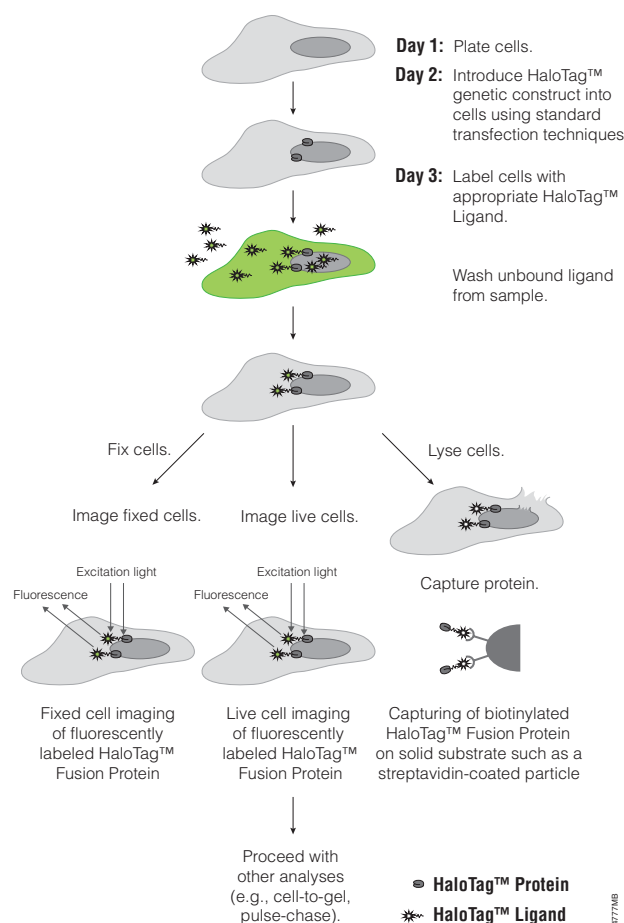


図1. HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyの様々なアプリケーション

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyの概略

図1にHaloTag™ 標識法の概要を示します。最初に、HaloTag™ タンパク質あるいはその融合タンパク質をコードしたHaloTag™ pHT2 Vectorを細胞に導入します。HaloTag™ タンパク質を発現するための一過性のトランスフェクションまたはステイブルなセルラインの作成には、様々な一般的な方法を用いることができます。細胞は、通常5~25μMの適切なHaloTag™ リガンドを加えて5~60分間インキュベーションします。HaloTag™ リガンドは迅速に膜を透過し、HaloTag™ タンパク質に共有結合します。未結合のリガンドは洗浄除去し、続いて蛍光イメージング(生細胞または固定細胞)、細胞の溶解とタンパク質捕捉、あるいはゲル解析といった、希望する方法で実験を行います。基礎となる遺伝子のコンストラクトを変えずに蛍光リガンドが交換できるので、異なる波長でのイメージングや、全く別の機能を組み

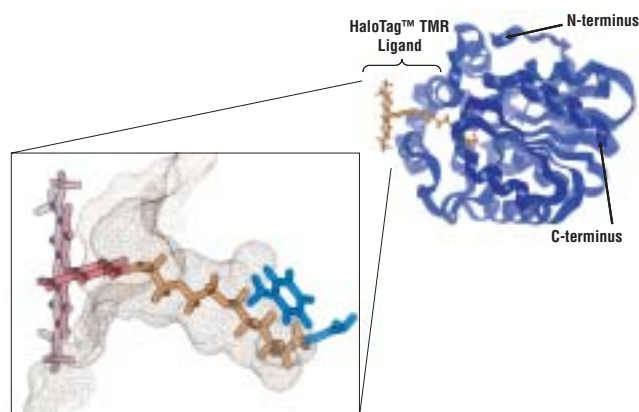


図2. HaloTag™ TMR Ligandが共有結合したHaloTag™ タンパク質の分子モデル
タンパク質構造の全体図（右上）と、メッシュのConnolly surfaceで示したリガンドの結合するトンネル部の拡大図。HaloTag™ TMR Ligand（機能部は赤色、反応性リンカー部はオレンジ色）がアスパラギン酸求核基（青色）に共有結合している様子を示している。触媒塩基（ヒスチジン）をフェニルアラニン残基（青色）に置換することで、HaloTag™ タンパク質はエステル中間体を加水分解する能力を失って安定な共有結合を形成するようになり、触媒的には不活性になる。

合わせることができます。詳細なプロトコールについては、HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology Technical Manual、#TM260を参照してください。

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyの構成内容

HaloTag™ タンパク質は、触媒としては不活性で遺伝子的に修飾されたヒドロラーゼタンパク質の誘導体で、HaloTag™ リガンドと効率よく共有結合を形成します（図2）。この33kDaの単量体タンパク質を使って、様々なセルタイプにおいて効率よく発現されるN末端あるいはC末端融合体を作製することができます。HaloTag™ タンパク質は原核生物由来なので、哺乳動物細胞には内因性の活性がありません。HaloTag™ pHT2 Vectorには、多くのセルタイプにおいて強力かつ構成的な発現を起こすCMVエンハンサー/プロモーター、あいまいな5'-ドナープライスサイトの使用を最低限に抑えるキメラ・イントロン、in vitro転写・翻訳システムに使用するT7プロモーター、そしてSV40 lateポリ阿德ニル化シグナルが含まれています。

HaloTag™ リガンドは小さな化学物質のタグで、HaloTag™ タンパク質を共有結合でラベリングすることができます。これらのリガンドは、2つの重要な構成要素を含んでいます。それは、1) HaloTag™ タンパク質と共有結合を形成する共通のHaloTag™ 反応性リンカー部と、2) 蛍光色素のTMRやdiAcFAM、あるいはビオチンのようなアフィニティー・ハンドルといった機能を持つレポーター部です（図3）。HaloTag™ リガンドのHaloTag™ タンパク質への結合速度は非常に迅速です。精製したGST-HaloTag™ タンパク質融合体を使った蛍光偏光解析では、HaloTag™ TMR Ligandはin vitroで非常に速く結合することが示されています。その結合速度論は、TMR-ビオチンのストレプトアビジンへの結合で測定された速度に近いものです（図4）。また、この速度はビオチン-ストレプトアビジン相互作用について報告された値に近似しています（4）。また、Technical Manual #TM260に記載されているラベリング条件において、HaloTag™ TMR、diAcFAMおよびBiotin Ligandには、検出可能な細胞毒性や形態的副作用は認められませんでした。

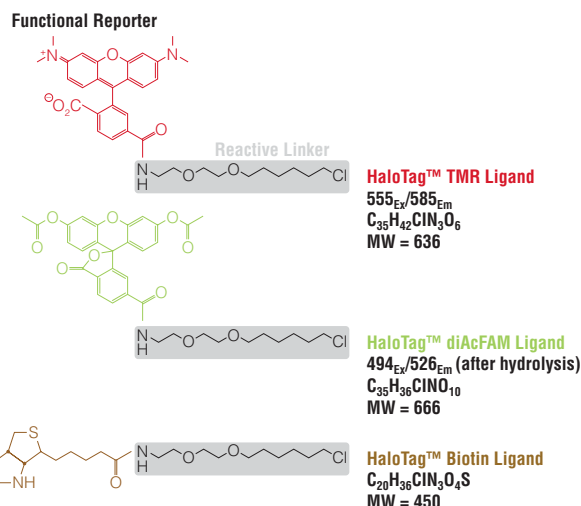


図3. HaloTag™ リガンドの構造

略語）TMR：テトラメチル-ローダミン、diAcFAM：ジアセチル-フルオレセイン。

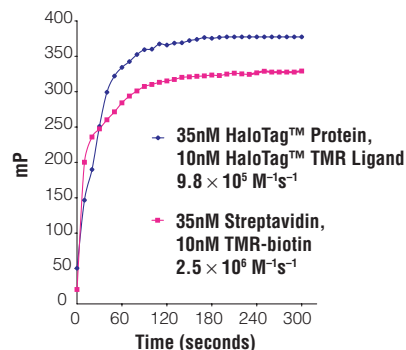


図4. HaloTag™ リガンドとストレプトアビジン-ビオチンを比較する蛍光偏光（FP）解析

測定はBeacon 2000で行い、データは二次反応速度定数の算出に用いた（3）。Qureshiら（4）による報告では、ストレプトアビジン-ビオチンの反応速度は $5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 。

哺乳動物細胞（生細胞、固定細胞）のイメージング

図5に示したように、HaloTag™ タンパク質を発現した細胞をHaloTag™ TMRまたはHaloTag™ diAcFAM Ligandでラベリングすると明るい蛍光が観察されます。対照的に、HaloTag™ タンパク質が発現していないコントロール細胞では、同じイメージング条件では蛍光は検出されません。これらの結果から、細胞ラベリングにおける特異性が高いこと、そして両方のリガンドが生細胞のイメージングに効率的に使われていることが示されています。蛍光シグナルのこのような高いシグナル/ノイズ比により、比較的低レベルで発現しているタンパク質でも検出することができます。

HaloTag™ タンパク質とHaloTag™ リガンド間の共有結合が安定であることから、固定細胞のイメージングも簡単に行えます。HaloTag™ タンパク質を発現するHeLa細胞をHaloTag™ TMRまたはHaloTag™ diAcFAM Ligandでラベリングしました。トランスフェクションした細胞は固定した後も明るい蛍光を維持しています（図6）。しかし、コントロール細胞をリガンド処理したものではありません。

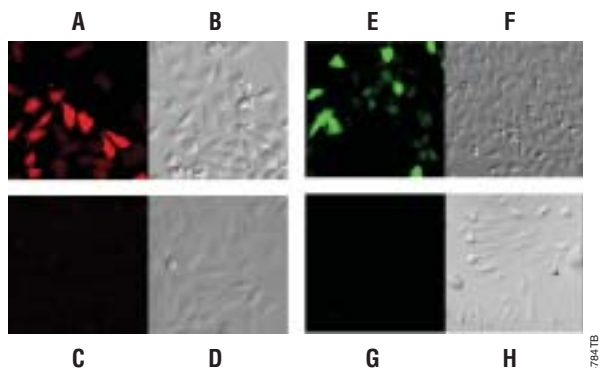


図5. HaloTag™ タンパク質を発現する生細胞をHaloTag™ TMR LigandまたはHaloTag™ diAcFAM Ligandでラベリングした蛍光イメージ

HaloTag™ pHT2 Vectorを一過性にトランスフェクションしたHeLa細胞 (パネルA、B、E、F) またはコントロール細胞 (パネルC、D、G、H) は5μM HaloTag™ TMR Ligand (パネルA～D) または10μM HaloTag™ diAcFAM Ligand (パネルE～H) で、37℃で15分間ラベリングした。イメージはオリンパスFV500共焦点顕微鏡を用い、適切なTMRおよびFAMフィルターまたは透過光で得た。

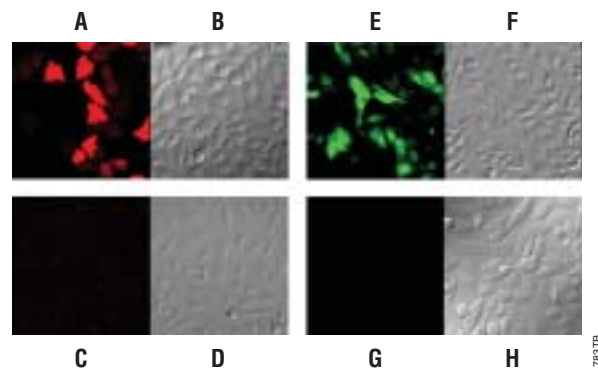


図6. HaloTag™ TMR LigandまたはHaloTag™ diAcFAM LigandでラベリングしたHaloTag™ タンパク質を発現する固定細胞の蛍光イメージ

HaloTag™ pHT2 Vectorを一過性にトランスフェクションしたHeLa細胞 (パネルA、B、E、F) またはコントロール細胞 (パネルC、D、G、H) は、図1に概略を示したプロトコールにしたがって、5μM HaloTag™ TMR Ligand (パネルA～D) または10μM HaloTag™ diAcFAM Ligand (パネルE～H) でラベリングした。細胞は3.7%パラホルムアルデヒドで固定し、イメージはオリンパスFV500共焦点顕微鏡を用い、適切なTMRおよびFAMフィルターまたは透過光 (パネルB、D、F、H) で得た。

蛍光シグナルが細胞固定試薬に対して耐性を持つため、HaloTag™ Technologyを異なる免疫細胞化学的および免疫組織化学的手法と併用することができます。さらに、固定細胞のイメージングは、ハイコンテント分析など自動化されたスクリーニング法を用いて多数の細胞を解析するアプリケーションにおいても重要です。

生細胞でラベリングしたHaloTag™ 融合タンパク質のゲル解析

HaloTag™ タンパク質-リガンド相互作用は非常に安定です。蛍光ラベリングされたHaloTag™ タンパク質は、SDSサンプルバッファーと混ぜてボイルした後にSDS-PAGEで分離しても蛍光シグナルをほとんど失いません。このような特性は、生細胞中でのHaloTag™ 融合タンパク質のラベリングを、SDS-PAGEや蛍光イメージ解析と組み合わせる場合に特に有効です。

一過性にHaloTag™ タンパク質を発現するCHO-K1細胞をHaloTag™ TMR Ligandとともにインキュベーションしてタイムコース実験を行いました。細胞ライセートをSDS-PAGEで解析すると単一の蛍光バンドが見られ、この分子量がHaloTag™ タンパク質と一致していることが明らかになりました (図7)。5分間という短い時間で生細胞内の全てのHaloTag™ 結合サイトがラベリングされましたが、これはin vitroで観察された速度に較べるとかなり遅いものです (図4)。これは、細胞膜を介したリガンド輸送が律速になっているためであると考えられます。ラベリングされたHaloTag™ タンパク質融合体を細胞から直接解析する手法 (cell-to-gel) は、ウェスタンブロット解析のような他のタンパク質解析法と組み合わせることができます。予備実験のデータでは、このようなアプローチが、HaloTag™ タンパク質をベースとした融合タンパク質の翻訳後修飾の研究にも有効であることを示していました (例えば、タンパク質切断など; データ未掲載)。

HaloTag™ タンパク質融合体の捕捉

HaloTag™ Labeling Technologyを使って、哺乳動物細胞で発現したHaloTag™ タンパク質融合体を、アフィニティー・ハンドルを含むリガンドを使って捕捉することもできます。ウミシイタケルシフェラーゼ-HaloTag™ -FLAGタンパク質融合体をコードするコンストラクトで一過性にトランスフェクションされたCHO-K1細胞を、Technical Manual #TM260に記載されているプロトコールに従って、HaloTag™ Biotin Ligandの存在下あるいは非存在下でインキュベーションしました。細胞ライセートは、ビオチンラベルされた融合タンパク質を捕捉するためにStreptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (カタログ番号Z5481) とともにインキュベーションしました。タンパク質はSDS-PAGEで分離し、抗FLAG抗体を用いてウェスタンブロット解析で解析しました。予想通り、リガンド処理した細胞とコントロール細胞の両方がウミシイタケルシフェラーゼ-HaloTag™ -FLAGタンパク質を発現しています (図8、パネルA、レーン1および4)。しかし、リガンド処理した細胞のサイトゾルとインキュベーションしたビーズだけが、ウミシイタケルシフェラーゼ-HaloTag™ -FLAGタンパク質を捕捉しました (図8、パネルA、レーン3および6)。重要なことに、ビーズに捕捉された融合タンパク質のみがウミシイタケルシフェラーゼ活性を維持していました (図8、パネルB)。

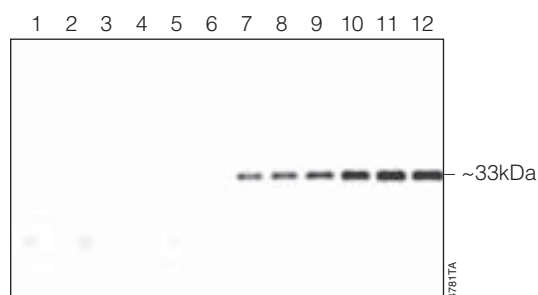


図7. 哺乳動物細胞で発現したHaloTag™ タンパク質の迅速、効率的で特異性の高いラベリング

CHO-K1コントロール細胞（レーン1～6）あるいはHaloTag™ pHT2 Vectorを一過性にトランスフェクションした細胞（レーン7～12）を5μM HaloTag™ TMR Ligandと37℃で0.5、1、2、5、15、30分間ラベリングした。ラベリング後に培地を除き、細胞をPBSで洗浄した後にSDS-PAGEサンプルバッファーで溶解した。タンパク質はSDS-PAGEで分離し、Hitachi FMBIO® 蛍光スキャナーで解析した。

結論

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyは、生細胞あるいはin vitroにおいて、広範囲の光学的特性と機能性を有する標識タンパク質を作出するためにデザインされています。この新しいテクノロジーを用いて、生きたあるいは固定した哺乳動物細胞をイメージングすることができ、これによりHaloTag™ タンパク質融合体の細胞内動態、細胞内構造やタンパク質のターンオーバーをモニタリングすることができます。このテクノロジーを使用すれば、SDS-PAGE (cell-to-gel) 解析を用いて様々な翻訳後修飾を調べることや、生細胞あるいはin vitro転写 / 翻訳反応から固相支持体へ直接HaloTag™ タンパク質融合体およびタンパク質複合体を捕捉することも可能です。このシステムは、異なる細胞株や生物にも容易に応用できることから、タンパク質とタンパク質機能の研究において普遍的で、しかも総合的な実験アプローチを提供してくれます。

参考文献

- Giuliano, K.A. and Taylor, D.L. (1998) *Trends Biotechnol.* **16**, 135–140.
- Chapman-Smith, A. and Cronan, J.E. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359–63.
- Cornish-Bowden. (1995) *In: Fundamentals of Enzyme Kinetics*, pp.1–17, Portland Press Ltd., London.
- Qureshi, M.H. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 46422–8.

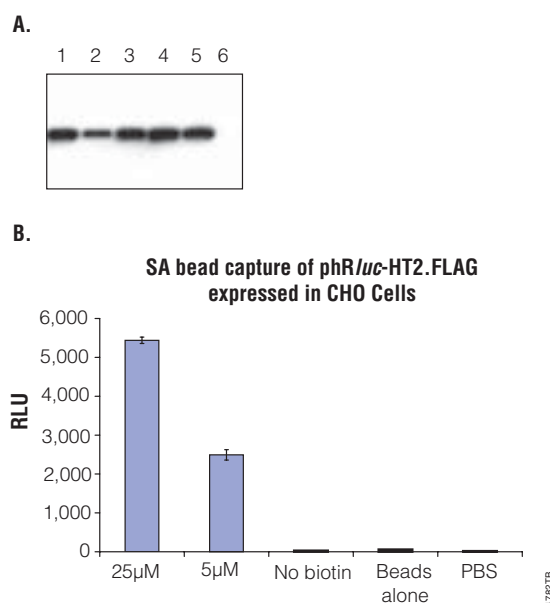


図8. HaloTag™ タンパク質融合体の、ストレプトアビジン (SA) コート磁性体粒子への効率的な捕捉

ウシシタケルシフェラーゼ-HaloTag™ -FLAGタンパク質融合体をコードするHaloTag™ pHT2 Vectorを一過性にトランスフェクションしたCHO-K1細胞をHaloTag™ Biotin Ligandの存在下（5μMまたは25μM; 37℃、15分間）あるいは非存在下でインキュベーションした。細胞を溶解し、ビオチンラベルタンパク質をSAコートした磁性体粒子（カタログ番号Z5481）上に捕捉した。パネルA. 抗FLAG抗体M2（Sigma）を使ったウェスタンブロット解析。レーン1、細胞ライセート（+リガンド）；レーン2、未結合タンパク質（+リガンド）；レーン3、結合タンパク質（+リガンド）；レーン4、細胞ライセート（-リガンド）；レーン5、未結合タンパク質（-リガンド）；レーン6、結合タンパク質（-リガンド）。パネルB. 捕捉されたルシフェラーゼの活性は、Renilla Luciferase Assay Substrate（部品番号E289B）を用いてOrion Microplate Luminometer（Berthold Detection Systems）で測定した。

プロトコル

- ◆ HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology Technical Manual #TM260, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm260/tm260.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HaloTag™ pHT2 Vector	20μg	G8241	48,000
HaloTag™ TMR Ligand	30μl	G8251	95,000
HaloTag™ diAcFAM Ligand	30μl	G8271	95,000
HaloTag™ Biotin Ligand	30μl	G8281	95,000