



HaloTag™ Technology : 細胞イメージングおよびタンパク質分析

By G. Los, Ph.D.¹, R. Learish, Ph.D.¹, Natasha Karassina, M.S.¹, Chad Zimprich, B.S.¹, Mark G. McDougall, Ph.D.², Lance P. Encell, Ph.D.¹, Rachel Freidman-Ohana, Ph.D.¹, Monika Wood, M.S.¹, Gediminas Vidugiris, Ph.D.¹, Kris Zimmerman, B.S.¹, Paul Otto, M.S.¹, Soshana Berhstock, Ph.D.¹, Dieter H. Klauert, Ph.D.², and Keith V. Wood, Ph.D.¹,

¹Promega Corporation, ²Promega Biosciences, Inc.

アブストラクト

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyは、生細胞内または *in vitro*においてタンパク質の部位特異的な標識を迅速に行える新しい選択肢を提供します。このテクノロジーは、HaloTag™ タンパク質と様々な機能を付帯する合成リガンドとの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的であり、変性条件下でも安定した複合体を形成します。

イントロダクション

タンパク質を特異的に標識できるか否かは、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るとともに、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も必要です(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 (*de novo*) タンパク質は、ネイティブなタンパク質と同様の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標識法の開発によって、細胞機能に対する理解がより広くなりました。

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyは、融合タンパク質のイメージング、捕捉、固定化に有用な技術です。HaloTag™ タンパク質はクロロアルカン-リガンドと迅速、特異的に結合し、このリガンドには様々な機能性ケミカル-タグを付加する修飾が施されています。利用可能なリガンドの特性により異なる波長でのイメージングが可能で、また、ピオチンを付加したリガンドはストレプトアビジン試薬を用いたタンパク質の捕捉などのアプリケーションに利用できます。

たった1つのDNAコンストラクトだけでHaloTag™ テクノロジーの多様な機能性を利用することができます。HaloTag™ テクノロジーを用いて融合タンパク質を標識するには、HaloTag™ 融合タンパク質をコードする1つのコンストラクトをトランジェントまたはステイブルなトランスフェクションにより細胞内に導入します。現在、HaloTag™ 融合タンパク質の作成用のベクター3種 (HaloTag™ pHT2 Vector、pFC8A、pFC8K (HaloTag™) CMV Flexi® Vector) が利用できます。次に、細胞透過性のリガンドを使用する場合、細胞を適切なリガンドとともに5-60分間インキュベーションします。リガンドは細胞膜を透過し、HaloTag™ 融合タンパク質に共有結合します。未結合のリガンドを洗浄により除去した後、以降のアプリケーションに用います。細胞非透過性のリガンドあるいはHaloLink™ を選択した場合、HaloTag™ リガンドとのインキュベーションを行う前に細胞を溶解します。図1にHaloTag™ TMR Ligand で標識したp65-HaloTag™ 融合タンパク質を発現する固定細胞のイメージを示します。

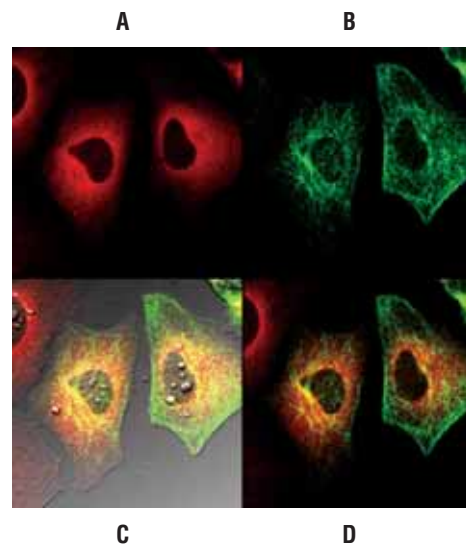


図1. p65-HaloTag™ タンパク質を発現し、HaloTag™ TMR Ligandで標識した細胞の固定後のイメージング

HeLa細胞にp65-HaloTag™ 融合タンパク質をコードするプラスミドをトランジェントにトランスフェクションし、発現したp65-HaloTag™ 融合タンパク質を5μM HaloTag™ TMR Ligandで37℃、15分間標識した(3)。細胞は3.7% パラホルムアルデヒドで固定した後、1μg/ml mouse Anti-βIII Tubulin Antibody (カタログ番号G7121) およびAlexa Fluor™-488-conjugated goat-antimouse IgG (Molecular Probes) を用いて染色した。イメージはオリンパス FV500共焦点顕微鏡 (TMRまたはAlexa Fluor™に適したフィルターセットまたは透過光を用いたシーケンシャルモード) により撮影。パネルA. TMR蛍光。パネルB. Alexa Fluor™-488 蛍光。パネルC. Alexa Fluor™-488およびTMR蛍光および透過光のオーバーレイ。パネルD. Alexa Fluor™-488およびTMR蛍光のオーバーレイ。

HaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyの構成内容

HaloTag™ タンパク質は、原核生物 ヒドロラーゼに由来し、HaloTag™ Ligandとの共有結合を形成させるために遺伝子組換えを行ったタンパク質です(図2)。この33kDaの単量体タンパク質とのN末端あるいはC末端融合体は様々な細胞種で効率よく発現させることができます。HaloTag™ タンパク質は真核生物には存在しないので、高い標識特異性を示します。HaloTag™ pHT2 Vectorには、多くの細胞種において強力かつ構造的な発現を起こすCMVエンハンサー/プロモーター、5'-ドナース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、HaloTag™ タンパク質コード配列そしてSV40 lateポリアデニル化シグナルが含まれています(3)。上記の特長に加え、pFC8A および pFC8K (HaloTag™) CMV Flexi® Vector にはHaloTag™ 融合パートナーと特異的に相互作用するタンパク質を精製するために使用するFactor Xa切断部位が含まれます(参考文献4, 7参照)。

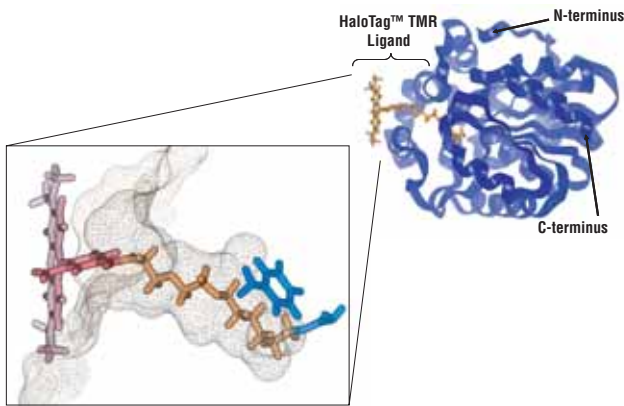


図2. HaloTag™ TMR Ligandが共有結合したHaloTag™ タンパク質の分子モデル
タンパク質構造の全体図(右上)と、メッシュのConnolly surfaceで示したリガンドの結合するトンネル部の拡大図。HaloTag™ TMR Ligand (機能部は赤色、反応性リンカー部はオレンジ色)がアスパラギン酸核基(青色)に共有結合している様子を示している。触媒塩基(ヒスチジン)をフェニルアラニン残基(青色)に置換することで、HaloTag™ タンパク質はエステル中間体を加水分解する能力を失って安定な共有結合を形成するようになり、触媒的には不活性になる。

HaloTag™ リガンドには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、Coumarin 蛍光色素など機能性レポーター部です(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™ 融合タンパク質を用い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(5)。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(6)。また、Technical Manual #TM260に記載されている標識条件において、HaloTag™ Ligandには、検出可能な細胞毒性や形態への影響は認められませんでした。

生細胞イメージングと細胞内区画局在性

HaloTag™ タンパク質は1つのタンパク質自体に融合させることもできますが、特定の細胞内区画に誘導する標的配列に融合させることもできます。これを実証するために、異なる細胞内区画にHaloTag™ レポータータンパク質およびヒト化Monster Green® Fluorescent Protein (hMGFP)を輸送する2セットの発現ベクターを構築しました。1番目の実験では、HaloTag™ タンパク質とhMGFP 両方のC末端に3回繰返しの核局在配列 [(NLS)₃]を付加しました。さらに細胞質を標的としたタンパク質を作製するために、各レポータータンパク質のC末端にα-tubulinを融合させるためのベクターも作製しました。HeLa細胞にHaloTag™-(NLS)₃とhMGFP-α-tubulinまたはHaloTag™-α-tubulinとhMGFP-(NLS)₃の各ベクターセットをトランジェントにコトランスフェクションしました。細胞はHaloTag™-TMR LigandまたはHaloTag™ Coumarin Ligandとともにインキュベーションし、生細胞のイメージ像を得ました(図4)。HaloTag™-(NLS)₃をトランスフェクションした細胞では、HaloTag™ リガンド標識体は核に局在しました。このパターンはcoumarin リガンドおよびTMRリガンドで標識されたHaloTag™ 融合タンパク質を含む細胞で観察されました(図4、パネルAおよびC)。

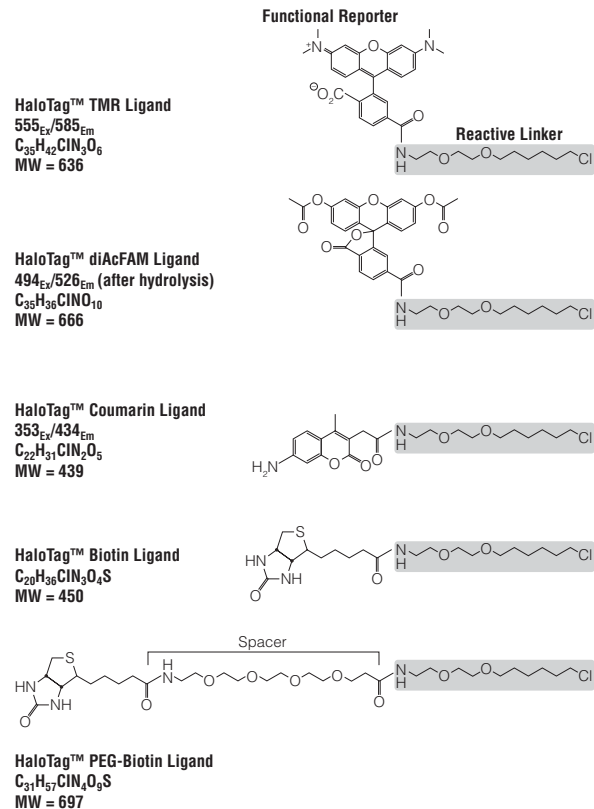


図3. HaloTag™ リガンドの構造

現在発売中のリガンドはHaloTag™ PEG-Biotin Ligandを除き細胞膜を速やかに透過する。

予想通り、いくつかの細胞の細胞質で低レベルのHaloTag™ シグナルが観察されました(図4、パネルA)。これは核への移行途中であることを意味していると考えられました。対照的に、TMRおよびCoumarin リガンドで標識した両方の細胞で、コトランスフェクションし、発現したhMGFP-α-tubulin融合タンパク質からの緑色蛍光は細胞質に限定されました(図4、パネルBおよびD)。HaloTag™-α-tubulin融合タンパク質もTMRリガンドによる標識により細胞質に局在していることが示されました(図4、パネルE)。両方のα-tubulin融合レポーターは、ネイティブな細胞骨格タンパク質として予想された場所で発現されたこととなります。hMGFP-(NLS)₃コンストラクトからの発現に由来する内部緑色蛍光の位置により、hMGFP融合レポーターも核へのターゲティングに成功したことが裏づけられました。これらのデータはHaloTag™ テクノロジーが生細胞イメージングの研究で細胞内区画構造へのタンパク質局在化に利用でき、また、マルチカラーイメージング実験において生来的な(発現タンパク質自体が蛍光を生じる)蛍光タンパク質(例: GFP)とともに使用できることを示しています。

テストした細胞株で推奨される標識条件下においては、HaloTag™ リガンドおよびHaloTag™ タンパク質の発現は、検出可能な毒性を示さず、形態への影響も認められませんでした(例: HeLaおよびCHO-K1)。この特性は、細胞周期、細胞分化、薬剤の長期的影響やその他の細胞内現象をとらえる上で行われる長時間の生細胞イメージングを可能にします。

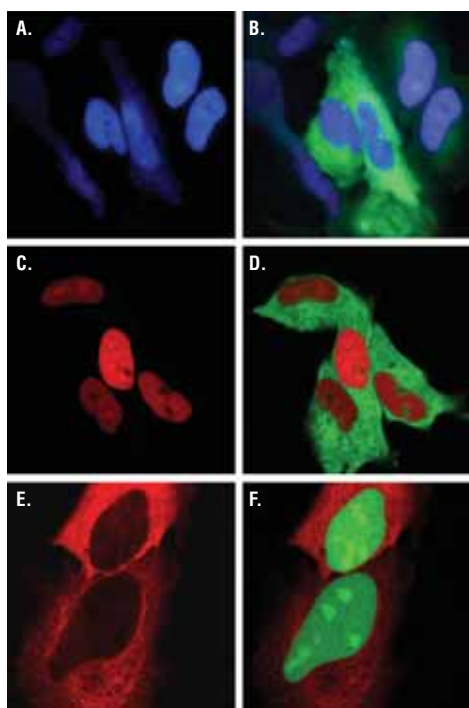


図4. 生細胞の核または細胞質を標的としたHaloTag™ およびhMGFPレポーター HaloTag™-(NLS)₃ および hMGFP- α -tubulin (パネルA-D) またはHaloTag™- α -tubulinおよびhMGFP-(NLS)₃ (パネルE、F) の各セットをHeLa細胞にトランジェントにトランスフェクションした。24時間後、HaloTag™-(NLS)₃を発現する細胞は25 μ M Coumarin Ligand (パネルA、B) または5 μ M HaloTag™ TMR Ligand (パネルC、D) で、HaloTag™- α -tubulinを発現する細胞は5 μ M HaloTag™ TMR Ligand (パネルE、F) でそれぞれ15分間インキュベーションした(37 °C、5% CO₂)。細胞は洗浄後、30分間インキュベーションした。パネルAおよびBでは、細胞をフィルターセット (Coumarin Ligandには#31000 DAPI、hMGFPには#41001 FITC Chroma Technology Corp)、Orca CCDカメラ (浜松ホトニクス社) および environmental controls を装備したオリンパス IX81 落射蛍光顕微鏡でイメージングした。パネルC-Fでは、2レーザーシーケンシャルスキャンニングおよびTMRとFITCの蛍光に適したフィルターでキャプチャーした。

p65タンパク質は真核生物の核内因子 κ B (NF- κ B) タンパク質ファミリーのメンバーです。核局在配列 (NLS: nuclear localization sequence) を含むNF- κ Bタンパク質は、刺激を受けていない細胞では、I κ Bタンパク質として知られるNF- κ B特異的阻害タンパク質の結合により不活性化状態にあります (7-9)。p65-HaloTag™ 融合タンパク質をトランジェントに発現する細胞を標識し、8時間20分にわたり20分間隔でイメージングを行いました (図5)。実験を行った全てのタイムポイントで細胞の形態的な変化は認められず、予想通り刺激を与えなかったため、細胞の核は染色されませんでした。特にp65-HaloTag™ 融合タンパク質の発現およびHaloTag™ TMR Ligandによる処理が複雑な細胞機能に影響を及ぼさなかった点は重要です。例えば、図5に示された経時的イメージでは細胞分裂の様子が明瞭に観察されました (矢印 [] 参照)。

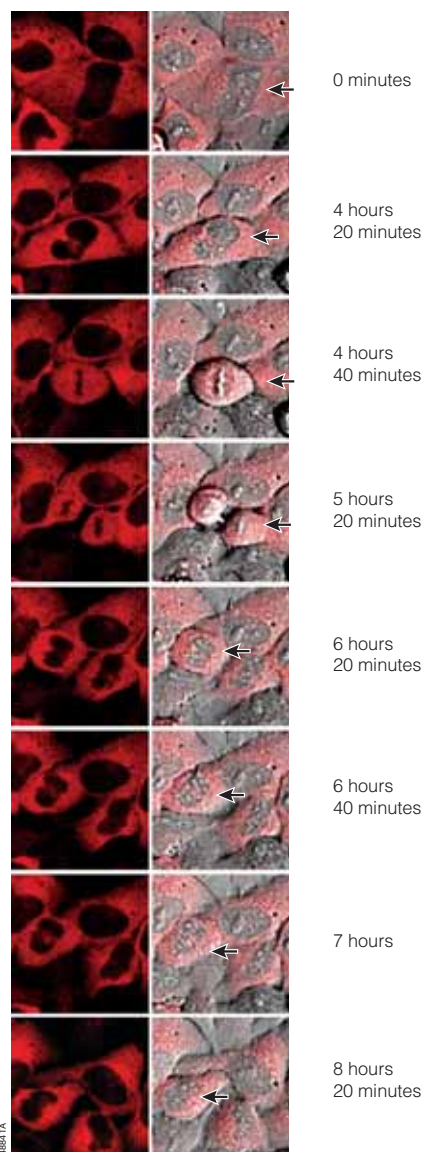


図5. p65-HaloTag™ 融合タンパク質を発現するHeLa細胞の動態イメージング p65-HaloTag™ 融合タンパク質をコードするプラスミドをHeLa細胞へトランジェントにトランスフェクションした後 5 μ M HaloTag™ TMR Ligandで37 °C、15分間標識した(3)。イメージはオリンパス FV500共焦点顕微鏡 (TMR蛍光用または可視光用のフィルターセットを使用) により撮影。イメージングは8時間20分をかけた20分間隔で行った。

ディファレンシャル ラベリング

HaloTag™ テクノロジーの柔軟な特性は、多様なHaloTag™ リガンドで異なるタンパク質プールを標識し、異なる波長で細胞をイメージングすることによりこれらのプールを分離して観察することを可能にします (イメージングベースのパルスチェイス実験)。このアプリケーションを実証するためにp65-HaloTag™ -FLAG 融合タンパク質を発現する細胞をHaloTag™ TMR Ligand (パルス) で標識しました。未結合のリガンドを洗浄除去した後、標準的な培養条件下に戻しました。続いてHaloTag™ diAcFAM Ligandによる標識18時間後にイメージングを行いました。

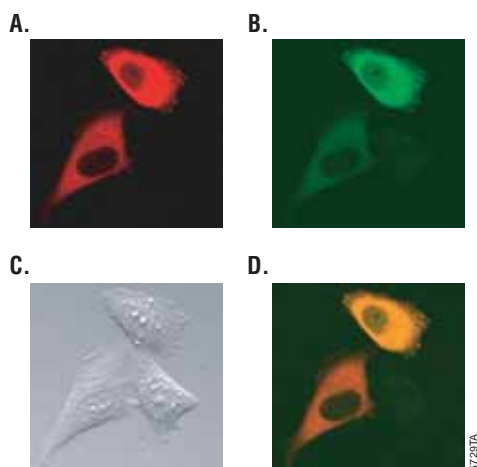


図6. p65-HaloTag™-FLAG融合タンパク質のパルス-チェイス標識

p65-HaloTag™-FLAG融合タンパク質をコードするベクターをHeLa細胞へトランジェント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、HaloTag™ TMR Ligandで細胞を標識した(5μM, 37℃, 15分; パネルA)。未結合のリガンドを洗浄除去し、標準的な条件下で18時間維持した。その後、HaloTag™ diAcFAM Ligand (1μM, 37℃, 30分; パネルB)で標識し、オリンパス FV500共焦点顕微鏡(適切なTMR, FAM用のフィルターセットおよび可視光、シーケンシャルモード)でイメージングした。パネルC, 可視光; パネルD, TMRとFAM蛍光のオーバーレイ。

2つの蛍光標識タンパク質プールを抽出しました(図6)。片方はタイム0において細胞内に存在するタンパク質プールでTMRリガンドで標識しました。もう片方のプールはdiAcFAM Ligandで標識し、これは18時間のインキュベーション時間内に合成されたタンパク質を意味しています(図6、パネルB)。TMRおよびFAMのシグナル強度、すなわち細胞内における新旧のタンパク質プールのサイズは細胞によって様々で、トランジェントにトランスフェクションした細胞内におけるタンパク質の合成と分解の細胞間での違いを反映していました。細胞から未結合TMR Ligandを洗浄した直後にdiAcFAM Ligandを添加してもFAM標識体は検出されませんでした(データ未掲載)。これらのデータは、複数のタンパク質プールを異なる色素で標識すること(すなわちパルス-チェイス実験)により生細胞内でのタンパク質の合成や分解、細胞内局在性、刺激によるタンパク質動態などの分析が行えることを示しています。

HaloTag™ テクノロジーによる固定細胞イメージング

HaloTag™ Ligandは細胞固定後も蛍光特性を維持することから免疫細胞染色法 (ICC, 10) を利用したマルチプレックス実験を可能にします。我々はHaloTag™-α-tubulinを発現する細胞をTMR LigandまたはdiAcFAM Ligandで標識し、抗βIII-tubulin 1次抗体およびAlexa Fluor™ 488またはCy3™ 標識2次抗体を用いたICCに供しました。全てのHeLa細胞は細胞質でβIII-tubulinを発現していました(図7)。一方、HaloTag™-α-tubulin レポーターは、トランスフェクションした細胞の多くで細胞質に局在していました。この観察結果は両方の蛍光体セットで類似していました。これらの結果は複数の細胞質タンパク質を区別して標識する上でHaloTag™ テクノロジーとICCを用いた2色イメージングが利用可能であることを示していました。

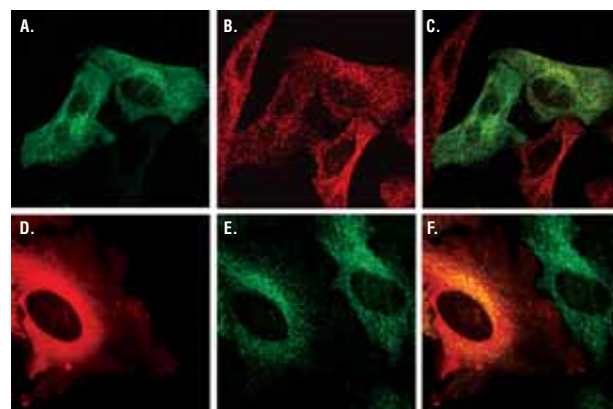


図7. HaloTag™ 標識および免疫細胞染色によるマルチプレックス分析

HeLa 細胞にHaloTag™-α-tubulinをトランスフェクションし、HaloTag™ diAcFAM (パネルA-C)またはTMR リガンド(パネルD-F)で標識した後、図1に記載したように洗浄、固定を行った。0.1% Triton® X-100で透過処理しAnti-βIII-Tubulin mAb (5,000倍希釈, カタログ番号 G7121) で免疫標識した。細胞は、500倍に希釈したAlexa Fluor™ 488 標識2次抗体(パネルA-C)またはCy3™ 標識2次抗体(パネルD-F)とともにインキュベーションした。パネルAおよびD: HaloTag™ リガンドのみで標識した細胞(パネルA: diAcFAM リガンド、パネルD: TMR リガンド)、パネルBおよびE: βIII-Tubulinを標識。パネルCおよびF: HaloTag™ タンパク質およびβIII-Tubulinの2重染色。

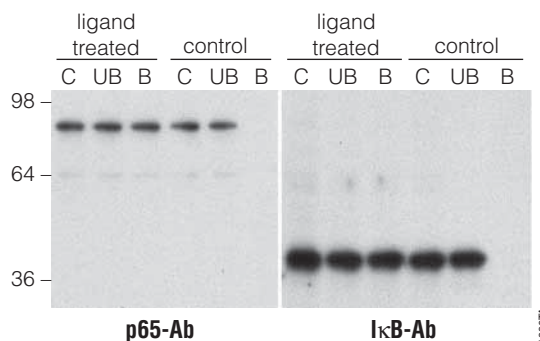


図8. ストレプトアビジンコート磁性体粒子 (SA-PMP) を用いた p65-HaloTag™ 融合タンパク質およびIkBの効率的な捕捉

p65-HaloTag™ 融合タンパク質を発現するCHO-K1細胞を25μM HaloTag™ Biotin Ligandの存在下または非存在下でインキュベーションした。細胞を溶解し、ストレプトアビジンコート磁性体粒子(カタログ番号 Z5481) でビオチン標識タンパク質を捕捉した。タンパク質はSDS-PAGEで分離し、anti-p65 antibody (BD Bioscience, 左パネル)またはanti-IkB antibody (BD Bioscience, 右パネル)を用いたウエスタンブロットティングで分析した。記号: C= cell lysate, UB=unbound protein, B=bound protein。

HaloTag™ ベース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高い特異性を有しています。蛍光標識されたHaloTag™ タンパク質は、SDS-PAGE 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(10)。HaloTag™ タンパク質の分析はウエスタンブロッティングなど他の分析方法と組み合わせることもできます。また、HaloTag™ テクノロジーは哺乳動物細胞で発現したHaloTag™ 融合タンパク質の捕捉にも使用することができます。CHO-K1細胞にp65-HaloTag™ 融合タンパク質をコードするコンストラクトをトランジェントにトランスフェクションし、HaloTag™ Biotin Ligandとともにインキュベーションしました。さらに細胞を溶解した後、ビオチン標識融合タンパク質を捕捉するためにStreptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particleでインキュベーションしました。タンパク質はSDS-PAGEで分離後、ウエスタンブロッティングにより分析しました。予想通り対照およびリガンド処理細胞は融合タンパク質を発現していました(図8、左パネル)。しかし、p65-HaloTag™ タンパク質の捕捉にはリガンドが必要でした(図8、左パネル)。さらに固定化したp65-HaloTag™ タンパク質は1kBを捕捉し、ブルダウンすることができました(図8、右パネル)。

まとめ

ネイティブな環境下でタンパク質を標識、分析できる特性は、生物学的パスウェイや細胞内における機能を詳細に理解する上で重要な意味を持ちます。新しく開発されたHaloTag™ Interchangeable Labeling Technologyは、融合タンパク質を生細胞内あるいはin vitroで直接的、効率的に標識することのできる柔軟なシステムです。蛍光標識されたHaloTag™ 融合タンパク質は生細胞あるいは固定細胞でもイメージングすることができます。このような機能により、リアルタイムでのタンパク質動態の観察やハイコンテックス分析における異なる免疫細胞染色法とHaloTag™ テクノロジーを併用したマルチプレックス分析を行うことができます。さらに、HaloTag™ タンパク質-リガンド相互作用は非常に安定であるため、標識された融合タンパク質は直接SDS-PAGEで分析することができます。最後にHaloTag™ テクノロジーはタンパク質間相互作用を探索する上でも重要なツールです。

参考文献

1. Giuliano, K.A. and Taylor, D.L. (1998) *Trends Biotechnol.* **16**, 135–40.
2. Chapman-Smith, A. and Cronan, J.E. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359–63.
3. *HaloTag™ Interchangeable Protein Labeling Technology Technical Manual #TM240*, Promega Corporation.
4. Uhr, M. *et al.* (2005) *Promega Notes* **92**, 24–9.
5. Los, G. (2005) *Cell Notes* **11**, 2–6.
6. Quershi, M.H. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 46422–8.
7. Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) *Ann. Rev. Immunol.* **16**, 225–60.
8. Karin, M., Yamamoto, Y. and Wang, Q.M. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 17–26.
9. Burnstein, E and Duckett, C.S. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 732–7
10. Los, G. *et al.* (2005) *Promega Notes* **89**, 2–5.

プロトコル

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

オンライン-アニメーション

- ◆ HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology
www.promega.com/paguide/animation/selector.htm?coreName=halotag01

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HaloTag™ pHT2 Vector	20 µg	G8241	48,000
pFC8A (HaloTag™) CMV Flexi® Vector	20 µg	C3631	48,000
pFC8K (HaloTag™) CMV Flexi® Vector	20 µg	C3641	48,000
HaloTag™ TMR Ligand	30 µl	G8251	75,000
HaloTag™ diAcFam Ligand	30 µl	G8271	75,000
HaloTag™ Coumarin Ligand	30 µl	G8581	75,000
HaloTag™ Biotin Ligand	30 µl	G8281	75,000
HaloTag™ PEG Biotin Ligand	30 µl	G8591	75,000
HaloLink™ Resin	2 ml	G1911	27,000
	5 ml	G1912	58,000