

Cell Surface HaloTag® Technology: Spatial Separation and Bidirectional Trafficking of Proteins

細胞表面におけるHaloTag® テクノロジー： 空間的な分離と双方向的なタンパク質の輸送

By Soshana Svendsen, Ph.D.¹, Chad Zimprich, B.S.¹, Mark G. McDougall, Ph.D.², Dieter H. Klaubert, Ph.D.², Georgyi V. Los, Ph.D.¹

¹Promega Corporation; ²Promega Biosciences

アブストラクト

生細胞内でタンパク質を特異的に標識する技術は、タンパク質のダイナミクスや機能に関する重要な情報を提供してくれる可能性があります。本稿では、異なる波長の蛍光物質を特別に設計したHaloTag® レポータータンパク質に共有結合でつなぎ止める技術を使用しました。我々は欠失型インテグリンに融合させたHaloTag® レポータータンパク質を細胞表面で発現させました。さらに、新規な細胞膜非透過性の蛍光物質を開発しました。異なる蛍光色を持つ細胞透過性または非透過性の蛍光物質を用いることにより、細胞膜タンパク質プールと細胞内タンパク質プールの空間的な分離状態を可視化することができました。識別可能な蛍光物質で標識した欠失型インテグリンタンパク質をリアルタイムで追跡することができるため、細胞表面タンパク質プールと細胞内タンパク質プールの転移を研究する上で有用です。HaloTag®-インテグリン融合タンパク質を用いることで、HaloTag® テクノロジーが生細胞内におけるタンパク質プールの空間的な分離とリアルタイムな転移を研究する上で強力なツールであることを示しました。

イントロダクション

生細胞でタンパク質を特異的に標識することにより複雑な細胞内環境におけるタンパク質の機能やダイナミクスに関する詳細を理解することができます。遺伝子融合によるタンパク質標識法を開発することで細胞内構成物への理解が深まっています。しかし、同一タンパク質から成る複数のプールを空間的、時間的に見定めることはGFPなどのレポータータンパク質では技術的な困難がつきまといまいます。HaloTag® テクノロジーを用いれば、1つの遺伝子レベルのコンストラクトだけでレポータータンパク質に異なる波長の蛍光物質を連結させることができます (1)。HaloTag® レポータータンパク質は、バクテリアのヒドロラーゼを改変し、触媒作用を不活性化した誘導体で、HaloTag® Ligand と共有結合を形成します。HaloTag® Ligandは2つの重要な構成部分を有しています (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、2: 蛍光色素あるいはビオチンなどの親和性ハンドルからなる機能性レポーター部)。本稿ではHaloTag® レポータータンパク質を細胞表面で発現させ、細胞膜を透過しない蛍光 HaloTag® Ligand を作製することにより、HaloTag® テクノロジーの用途を広げることができました。これらの成果は、細胞膜関連タンパク質プールと細胞内タンパク質プールを視覚的に分離し、タンパク質の転移をリアルタイムで分析できるようになりました。

細胞表面に提示されたHaloTag® タンパク質

我々はこれまでにHaloTag® タンパク質を目的のタンパク質に融合させ、この融合タンパク質が特異的な細胞内区画へ適切に運ばれることを示しました。例えば、核への特異的な局在化は、simian virus large T 抗原に由来する核局在化配列の3回繰返し部位 (NLS)₃をHaloTag® タンパク質に付加することにより起こります (2, 3)。本稿では、細胞表面に提示されたHaloTag® タンパク質と特定のタンパク質プールの空間的な分離やリアルタイムで起こる転移の視覚化を可能にする細胞表面に特異的なリガンドについて説明します。

我々はHaloTag® レポータータンパク質を欠失型 $\beta 1$ インテグリン ($\beta 1$ Int) シグナル配列下流域に存在する細胞外ドメインへ融合させることにより細胞表面に発現させることができました (図1, パネルA; 4)。この $\beta 1$ Int-HaloTag® 融合タンパク質の発現に成功し、CHO、HeLa、HEK293、U2OSやヒト神経幹細胞で許容されました(5)。非透過性細胞の標識のためにHaloTag® タンパク質および $\beta 1$ インテグリンに対する抗体を用いた免疫細胞染色を行った結果、 $\beta 1$ Int-HaloTag® 融合タンパク質は内性 $\beta 1$ インテグリンと同様のパターンで細胞表面に発現していました (図1, パネルB)。

さらに我々は、細胞表面上のHaloTag® タンパク質が (結合) 機能を有していることを確認するために、HaloTag® PEG-Biotin Ligandを用いた実験を行いました。 $\beta 1$ Int-HaloTag®融合タンパク質を安定に発現するHEK293細胞をHaloTag® PEG-Biotin Ligandおよびストレプトアビジン結合Alexa Fluor® 488で標識し、さらに同じ細胞を細胞透過性のHaloTag® TMR Ligand で標識しました。生細胞イメージングの結果、HaloTag® PEG-Biotin Ligandおよびストレプトアビジン結合Alexa Fluor® 488は明らかに細胞表面を標識し、細胞透過性のHaloTag® TMR Ligandは細胞内の $\beta 1$ Int-HaloTag®を標識していることを示していました (図1, パネルC)。これらの結果を総合すると、HaloTag® タンパク質は細胞表面に露出され、さらに表面に提示されたHaloTag® タンパク質はHaloTag® Ligandが完全に結合するまでその結合機能が維持されていることを示していました。

細胞表面に特異的なリガンド

我々は、生細胞で表面に提示されたHaloTag® タンパク質を特異的に標識する細胞非透過性の蛍光HaloTag® リガンドを開発しました（図2、パネルA）。この新しいHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandは、推奨される標識条件（Technical Manual #TM260に記載）では細胞毒性や形態上における副作用が認められないことがCellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayによる評価で示されました（データ未掲載）。生細胞イメージングでは、β 1Int-HaloTag® タンパク質を安定に発現するHEK293細胞の細胞表面のHaloTag® タンパク質がHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand で特異的に標識され（図2、パネルB）、HaloTag® -(NLS)₃ タンパク質を安定に発現するHEK293細胞の細胞内HaloTag® タンパク質は標識されていないことを示していました（図2、パネルC）。さらに、HaloTag® リガンドの蛍光特性は細胞固定後も維持されているため、生細胞標識と細胞免疫染色を組み合わせたマルチプレックス実験も可能です。β 1Int-HaloTag® タンパク質を安定に発現するHEK293生細胞をHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand で標識した後に固定し、透過処理は行いませんでした。細胞の透過処理を行わなかったため、Anti-HaloTag® polyclonal antibody（カタログ番号 G9281）は細胞表面のタンパク質のみを標識しました。生細胞の標識による緑色蛍光および免疫細胞染色による赤色蛍光のオーバーレイにより、細胞表面への新規なHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandの局在性が示されました（図2、パネルD）。細胞内でも一部にHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで標識されたβ 1Int-HaloTag® タンパク質が存在しており、これは表面のタンパク質が迅速に細胞内移行したことを示していました。

生細胞における空間的な分離

細胞表面のタンパク質を特異的に標識する細胞非透過性のHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand による生細胞の標識に引き続き、細胞内タンパク質を標識する細胞透過性のHaloTag® TMR Ligandを用いることで、β 1Int-HaloTag® タンパク質を2つに区別できるタンパク質プールとして観察することができます（図3、パネルA）。β 1Int-HaloTag® タンパク質を発現する細胞にHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandでパルスをかけ、HaloTag® TMR LigandでチェイスすることによりSDS-PAGE分析で2つの明瞭なタンパク質プールを確認することが出来ます（図3、パネルB、レーン4）。我々はグリカナゼ処理を行うことにより、高分子量側のβ 1Int-HaloTag® タンパク質の緑色蛍光で標識された細胞表面プールが、赤色蛍光の細胞内プールに比べ、嚴重なグリコシル化を受けていることを示しました（投稿準備中）。HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand 単独では細胞表面のHaloTag® タンパク質のみを特異的に標識するため、グリコシル化されたタンパク質プールのみを標識することになります（レーン3）。HaloTag® TMR Ligandは細胞表面または内部のタンパク質を標識するため、両方のタンパク質プールを標識します（レーン2）。β 1Int-HaloTag® タンパク質の2つのプールのSDS-PAGE泳動パターンは、予想されたインテグリンのグリコシル化を示しており、HaloTag® タンパク質に融合したβ 1インテグリンが生理的に適切な過程を経てプロセッシングされていることを示唆していました。

また、HaloTag® Alexa Fluor® 488 LigandによるパルスとHaloTag® TMR Ligandによるチェイスを行った細胞のイメージングでも、2つのタンパク質プールのβ 1Int-HaloTag® タンパク質を示していました。β 1Int-HaloTag® タンパク質を一過性に発現するHeLa細胞でも、HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで特異的に標識された細胞表面上のタンパク質とHaloTag® TMR Ligandで標識された細胞内タンパク質が空間的に分離されて観察されました（図3、パネルC）。

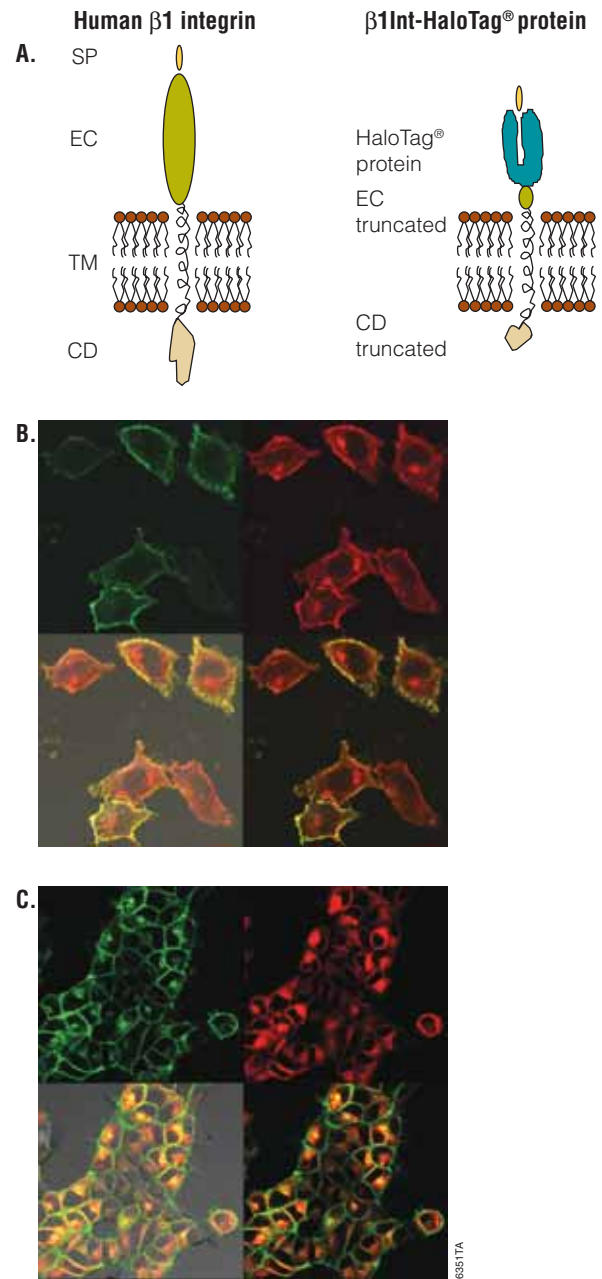


図1. 細胞表面のHaloTag® タンパク質へのターゲティング

パネルA. (左). Human β 1インテグリンをシグナルペプチド (SP)、細胞外ドメイン (EC)、膜貫通ドメイン (TM)、細胞質ドメイン (CD) で表した。パネルA (右). β 1Int-HaloTag® コンストラクト: HaloTag® タンパク質はヒトβ 1インテグリンの欠失型細胞外ドメインと融合させることにより細胞表面に提示される。パネルB. β 1Int-HaloTag® タンパク質を一過性に発現するHeLa細胞は固定後に免疫細胞染色（透過処理無し）に供した。Anti-HaloTag® pAbは使用例(6)に従い、Alexa Fluor® 488-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000, Molecular Probes) で検出した。β 1インテグリン抗体を使用し、Alexa Fluor® 594-conjugated anti-mouse antibody (1:1000, Molecular Probes) で検出した。パネルC. β 1Int-HaloTag® タンパク質を安定に発現するHEK293細胞はHaloTag® PEG-Biotin Ligand (1μg/ml, 37 °C、10分)で標識し、濯いだ後にさらにAlexa Fluor® 488-conjugated streptavidin (1μg/ml, 37 °C、15分)で標識した。再度濯いだ後にHaloTag® TMR Ligand (5μM, 37 °C、15分)で標識した。細胞のイメージングにはOlympus FV500 共焦点顕微鏡（適切なフィルターセットを用いたシーケンシャルモード）を用いた。

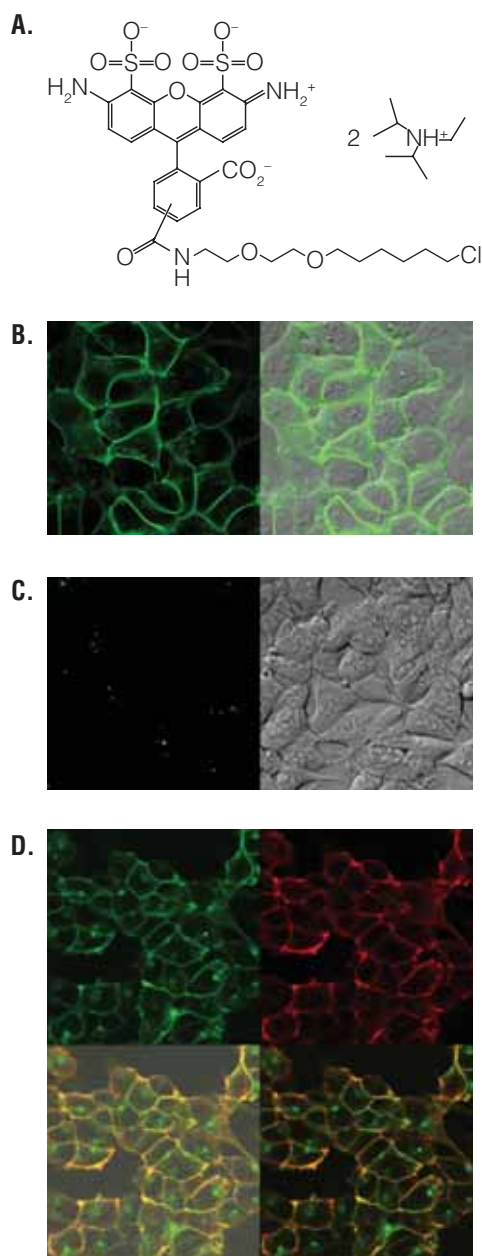


図2. 新規な細胞非透過性HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand

パネルA. HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandの構造。パネルB, C. $\beta 1$ Int-HaloTag® タンパク質 (パネルB) またはHaloTag® -(NLS)₃タンパク質 (パネルC) を安定発現するHEK293細胞をHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで標識した生細胞イメージング像 (1 μ M, 37℃、15分)。パネルD. $\beta 1$ Int-HaloTag® タンパク質を安定に発現するHEK293細胞をHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで標識し、透過処理を行わずに固定した。前述のようにAnti-HaloTag® pAbおよびAlexa Fluor® 594-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000, Molecular Probes) を用いて検出した。細胞イメージングにはOlympus FV500 共焦点顕微鏡 (適切なフィルターセットを使用) を用い、固定細胞のイメージングはシーケンシャルモードで行った (パネルD)。

生細胞におけるリアルタイムのタンパク質転移

HaloTag® テクノロジーにより、2つのタンパク質プールを空間的に識別することができ、また時間的に分離することもできます。HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand 標識でパルスを行い、HaloTag® TMR Ligand標識でチェイスを行った生細胞では、異なる標識を施したタンパク質が転移する様子がリアルタイムで観察され、赤色に標識された細胞質タンパク質プールは細胞膜へ移動し、緑色に標識された細胞表面のプールは細胞内へ移行しました (図3、パネルD)。さらに、生細胞標識後の免疫細胞染色により、膜タンパク質が予想された細胞内輸送機構で移動することを示しました (投稿準備中)。この結果とSDS-PAGEの結果は、HaloTag® レポータータンパク質の膜タンパク質への融合が、細胞における翻訳後修飾やタンパク質輸送に対して顕著な変化を与えることが無いことを示唆していました。

結 論

ネイティブな環境下で膜タンパク質を標識し、分析することを可能にする技術は、細胞膜へまたは細胞膜からのタンパク質輸送の詳細な理解を進歩させるために重要です。HaloTag® テクノロジーは応用性の高いシステムで、生細胞における融合タンパク質の効果的な標識を可能にします。HaloTag® タンパク質を欠失型 $\beta 1$ インテグリンの細胞外ドメインに融合させることにより、我々はHaloTag® レポータータンパク質を細胞表面上に発現させ、生細胞内におけるタンパク質輸送の研究に使用できることを実証しました。細胞表面のタンパク質を特異的に標識するための新規な細胞非透過性蛍光物質を開発することにより、生細胞における膜タンパク質プールは細胞内タンパク質プールと明瞭に区別することができるようになりました。色の異なる細胞非透過性および細胞透過性のHaloTag® リガンドは、SDS-PAGE分析および生細胞イメージング実験において膜タンパク質と細胞内タンパク質を空間的に分離することを可能にしました。さらに、生細胞で細胞表面のタンパク質の転移をリアルタイムで追跡できるようになりました。結論として、HaloTag® テクノロジーはタンパク質プールを空間的、時間的に分離する技術を提供し、インテグリンやその他の目的とする膜タンパク質の細胞生物学実験における強力なツールとして利用することができます。

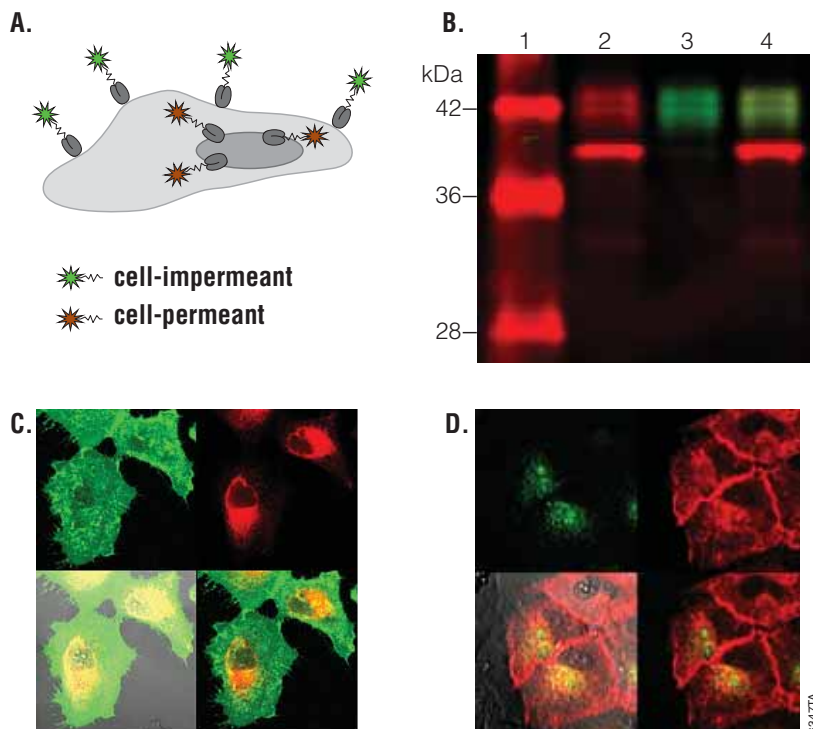


図3. HaloTag® テクノロジーを用いた空間的または時間的なタンパク質の分離

パネルA. β1Int-HaloTag® タンパク質のパルス/チェイス標識法の概略図（パルスでは細胞表面のHaloTag® タンパク質を標識するために細胞非透過性のHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandを使用し、チェイスでは細胞内のHaloTag® タンパク質を標識するために細胞透過性のHaloTag® TMR Ligandを使用）。パネルB. β1Int-HaloTag® タンパク質を安定に発現するHEK293細胞をHaloTag® TMR Ligandのみで標識（レーン2）、HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand（レーン3）または、膜タンパク質標識のためのHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandによるパルスと細胞内タンパク質標識のためのHaloTag® TMR Ligandによるチェイス（レーン4）。生細胞イメージングの後、細胞を溶解して分子量マーカー（レーン1）とともにSDS-PAGEに供し分析した。パネルC. β1Int-HaloTag® タンパク質を一過性に発現するHeLa細胞をHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandでパルス（1μM、37℃、15分）HaloTag® TMR Ligandでチェイスし（5μM、37℃、15分）濯いだ後にOlympus FV500 共焦点顕微鏡（適切なフィルターセットを用いたシーケンシャルモード）を用いてイメージングを行った。パネルD. 細胞標識12時間後のイメージング結果では、異なる標識を行ったタンパク質において細胞質から細胞膜へ移動したタンパク質や細胞膜から細胞内移行したタンパク質が観察された。

参考文献

1. Los, G.V. and Wood, K. (2006) *Methods Mol. Biol.* **356**, 195–208.
2. Kalderon, D. *et al.* (1984) *Cell* **39**, 499–509.
3. Los, G.V. *et al.* (2006) *Cell Notes* **14**, 10–14.
4. Arnaout, M., Mahalingam, B. and Xiong, J. (2005) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 381–410.
5. Svendsen, S. *et al.* (2007) *Promega Notes* **95**, 20–2.
6. Learish, R. (2007) *Promega Notes* **95**, 23–5.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	30 μl	G1001	75,000
HaloTag® TMR Ligand	30 μl	G8251	75,000
HaloTag® Coumarin Ligand	30 μl	G8581	75,000
HaloTag® Oregon Green® Ligand	30 μl	G2801	75,000
HaloTag® diAcFAM Ligand	30 μl	G8272	75,000
HaloTag® PEG-Biotin Ligand	30 μl	G8591	75,000
Anti-HaloTag® pAb	200 μg	G9281	52,000

ベクター・リガンド購入における注意点：HaloTag® Technologyで使用するリガンドをプロメガ以外で作製・入手する場合、または研究用途以外でご利用される場合、ライセンス契約の必要があります。詳細については弊社までご連絡ください (www.promega.co.jp/license/)。