

HaloTag® Protein:A Novel Reporter Protein for Human Neural Stem Cells

HaloTag® タンパク質: ヒト神経幹細胞のための新規なレポータータンパク質

By Soshana Svendsen, Ph.D.¹, Erin McMillan, B.S.², Chad Zimprich, B.S.¹, Clive N. Svendsen, Ph.D.², Georgyi V. Los, Ph.D.¹, ¹Promega Corporation, ²University of Wisconsin-Madison

アブストラクト

幹細胞やそれに関連するタンパク質は、多くの科学研究でフォーカスされています。幹細胞内で特定のタンパク質を標識できる技術は、タンパク質のダイナミクスと機能に関する重要な情報を提示します。本稿で我々は、特別に設計されたレポーターHaloTag® タンパク質に異なる波長の蛍光物質を共有結合させる技術を用いました。HaloTag® タンパク質単独あるいは目的タンパク質と融合したものをヒト神経幹細胞 (hNSC) で発現させ、いくつかのHaloTag® リガンドによる標識に成功しました。異なる色の細胞非透過性および細胞透過性の蛍光物質は、生きたhNSCにおいて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分離およびリアルタイムでの移行を示しました。さらに、HaloTag® タンパク質はhNSCから神経細胞やアストロサイトへの分化後も引き続き発現します。そのため、HaloTag® テクノロジーは、幹細胞におけるタンパク質生物学をより深く調べるための新しい研究ツールとしての使用をはじめ、その他様々な目的タンパク質の研究に使用することができます。

イントロダクション

生細胞におけるタンパク質の特異的な標識は、複雑な細胞内環境の中でその機能とダイナミクスについての詳細を提供すると考えられます。遺伝子レベルの融合を利用した新しいタンパク質標識法の開発により、細胞生物学の理解をより深めました。幹細胞は基礎生物学の研究、薬剤のスクリーニング、ヒトの疾患モデルや潜在的な治療などに使用されています (1)。本稿ではHaloTag® テクノロジーをヒト神経幹細胞 (hNSC) で使用し、HaloTag® レポータータンパク質単独または目的タンパク質との融合タンパク質を可視化しました。

HaloTag® テクノロジーの概要

HaloTag® テクノロジーでは、1つの遺伝子レベルのコンストラクトから発現するレポータータンパク質に異なる波長を持つ蛍光物質を結びつけることができます (2)。HaloTag® レポータータンパク質は、遺伝子を改変したバクテリア - ヒドロラーゼの不活性化型改変タンパク質です。HaloTag® リガンドは、HaloTag® タンパク質との共有結合を形成する共通のHaloTag® 反応性リンカー部と機能部 (レポーター [例: 蛍光色素] や親和性タグ [例: ビオチン]) の2つの重要な部位で構成されています。

ヒト神経幹細胞におけるHaloTag® の発現と標識

我々は、ニューロスフェアとよばれる球状細胞塊を維持した、発達過程のヒト中枢神経系に由来する幹細胞を使用しました (図1、パネルA; 3)。ニューロスフェアは単一細胞に分離後、トランスフェクションを行うことができ、播種後に成熟した神経表現型に分化します。

我々はこれまでに様々な哺乳動物細胞株におけるHaloTag® タンパク質の発現例を示しましたが、今回はhNSCでHaloTag® レポータータンパク質を発現させました。細胞は、HaloTag® レポータータンパク質の発現およびHaloTag® TMR Ligandによる標識後も健全で正常な形態を維持しました (図1、パネルB)。

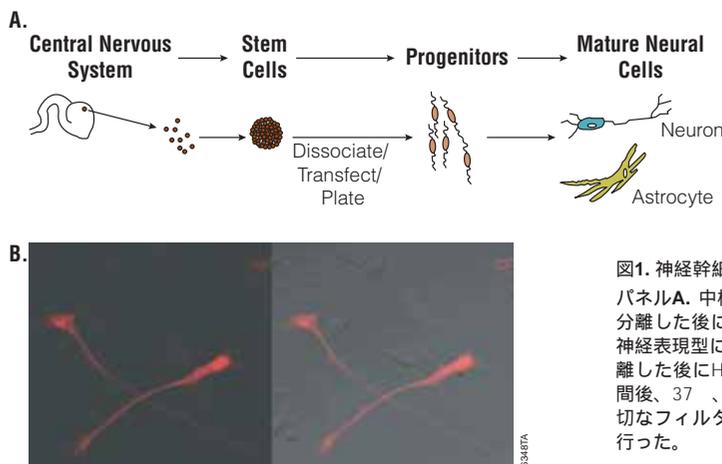


図1. 神経幹細胞におけるHaloTag® レポータータンパク質の発現

パネルA. 中枢神経系に由来する幹細胞はニューロスフェアを形成し、単一細胞に分離した後にトランスフェクションを行うことができ、これを播種すると成熟した神経表現型に分化させることができる。パネルB. ヒト神経幹細胞を単一細胞に分離した後にHaloTag® 発現ベクターをトランスフェクションした。細胞播種48時間後、37 °C、15分間 5µM HaloTag® TMR Ligandで標識し、灌ぎを行った後、適切なフィルターセットを用いたOlympus FV500 共焦点顕微鏡でイメージングを行った。

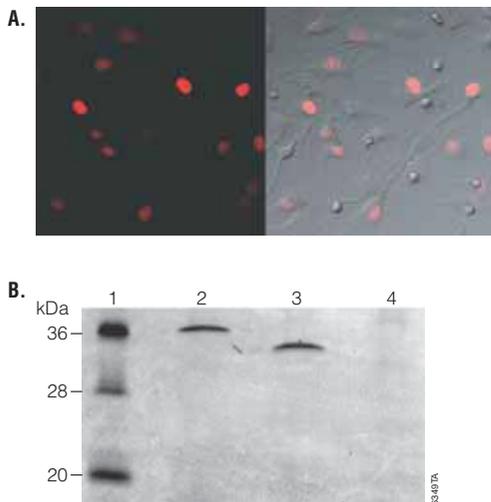


図2. 神経幹細胞におけるHaloTag®タンパク質の細胞内局在性
 パネルA. HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質を発現する細胞を5μM HaloTag® TMR Ligandで37、15分間標識し、適切なフィルターセットを用いたFV500 共焦点顕微鏡でイメージングを行った。パネルB. HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質(レーン2)またはHaloTag®タンパク質単独(レーン3)を発現する細胞、非トランスフェクション細胞(レーン4)をHaloTag® TMR Ligandで標識し、溶解した後にラダーマーカー(レーン1)とともにSDS-PAGEに供した。

ヒト神経幹細胞におけるHaloTag®の細胞内区画局在性

HaloTag® タンパク質は、単体、目的タンパク質との融合タンパク質あるいは特定の細胞内区画へ融合タンパク質を導く標的配列との融合体としても発現させることができます。我々は、SV40 large T-抗原由来の核局在配列の3回繰返し配列をHaloTag® タンパク質 C末端に融合させたものを発現させました(4, 5)。HaloTag® TMR Ligandで標識したhNSCの生細胞イメージングでは、HaloTag®-(NLS)₃タンパク質のみが核に局在し、トランスフェクション 120時間後までこの融合タンパク質の発現を確認しました(図2、パネルA)。

HaloTag® リガンドで標識したHaloTag® タンパク質から蛍光シグナルの低下は認められず、電気泳動で分離することができるため、HaloTag® タンパク質をin vitroで分析することができます。HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質、HaloTag® タンパク質単独を発現するhNSCおよび非トランスフェクションhNSCをHaloTag® TMR Ligandで標識し、溶解した後にSDS-PAGEで分析しました。その結果、HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質の明瞭なバンドとそれより分子量の小さいHaloTag® タンパク質単独のバンドが観察されました(図2、パネルB)。トランスフェクションを行わなかったhNSCではタンパク質のバンドが観察されなかったことからHaloTag® テクノロジーの特異性が改めて示されました。

分化したヒト神経幹細胞におけるHaloTag®の発現

HaloTag® リガンドの蛍光特性は細胞固定後も維持されるため、HaloTag® テクノロジーでは生細胞標識後に免疫細胞染色 (ICC) を併用したマルチプレックス実験を可能にします。我々は、hNSCから分化した神経細胞やアストロサイトでもHaloTag® 融合タンパク質を発現し続けるか否かを評価するためにこの特長を利用しました。HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質を発現する生きたhNSCをHaloTag® TMR Ligandで標識し、固定後に免疫細胞染色に供しました。抗体は神経細胞マーカーであるα-チューブリンに対する抗体およびアストロサイトのマーカーであるglial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する抗体を用いました(図3、パネルA, B)。その結果、HaloTag® タンパク質が、トランスフェクションしたhNSCより分化した神経細胞やアストロサイトでも発現していることが示されました。

免疫細胞染色の結果に定量性を補足するために、HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質をトランスフェクションした総細胞%と神経細胞およびアストロサイトに分化した総細胞%として定量しました。播種した細胞数およびトランスフェクションされた細胞数から、約30%がHaloTag® タンパク質を発現(HaloTag® TMR Ligand 標識ベース)しており、70%はアストロサイト(GFAP標識ベース)、20%は神経細胞(α-チューブリン標識ベース; 図3、パネルC)であることが分かりました。残りの細胞は、未分化の神経前駆細胞であると考えられました。分化した割合がこれまでに報告されたものと一致していたことから、hNSCはHaloTag® タンパク質に許容的であることが分かりました(3)。HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質を発現する分化細胞の約45%がアストロサイトで約30%が神経細胞(図3、パネルD)でした。この違いは有意なものではなく、HaloTag® レポータータンパク質は細胞種ごとの生存性や分化に対する選択的な影響が無いことを示唆していました。

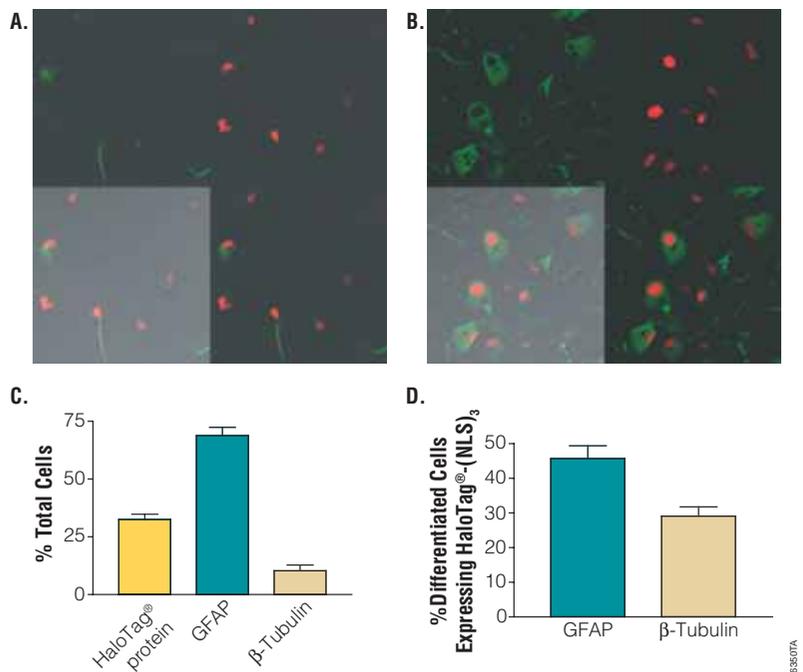


図3. 分化した神経幹細胞におけるHaloTag®タンパク質の発現
 HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質を発現する細胞は図2と同様に標識した後に固定し、α-チューブリン(マウス, 1:2,000, Sigma; パネルA)またはGFAP(ウサギ, 1:1,000, Dako; パネルB)に対する抗体、Alexa Fluor® 488-標識抗体(1:1,000, Molecular Probes)を用いて免疫細胞染色に供した。イメージは、適切なフィルターセットを用いたOlympus FV500 共焦点顕微鏡で撮像した。パネルC. 播種した細胞に対するHaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質を発現する細胞の%、アストロサイトの%、神経細胞の%。パネルD. HaloTag®-(NLS)₃融合タンパク質を発現する分化細胞に対するアストロサイトおよび神経細胞の%。

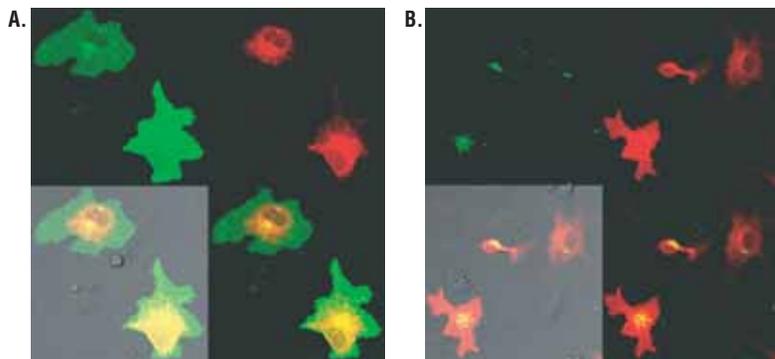


図4. 神経幹細胞におけるHaloTag®の空間的、時間的な分離

パネルA. 1Int - HaloTag® 融合タンパク質を発現する細胞を5μM HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで37℃、15分パルスし、透過処理後に5μM HaloTag® TMR Ligandで37℃、15分でチェイスし、濯ぎを行った後に適切なフィルターセットを用いたOlympus FV500 共焦点顕微鏡でイメージングを行った。パネルB. 細胞標識12時間後、異なる標識を施したタンパク質が細胞質から膜へあるいは膜から細胞内へ移行する様子が観察された。

ヒト神経幹細胞におけるHaloTag® タンパク質の空間的、時間的な分離

我々は哺乳動物細胞株において細胞表面に欠失型 1インテグリンに HaloTag® レポータータンパク質を融合させたものを発現させ、細胞非透過性蛍光HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで標識できることを示しました (6)。本稿ではhNSCでも欠失型インテグリンに融合した HaloTag® レポータータンパク質が発現することを示します。まず、hNSCは細胞非透過性HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで標識し、次に細胞透過性のHaloTag® TMR Ligandで標識しました。生細胞イメージングでは、1Int - HaloTag® タンパク質は2つの明瞭に区分されたタンパク質プールとして観察され、1つはHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandで標識された細胞表面のHaloTag® タンパク質で、もう1つがHaloTag® TMR Ligandで標識された細胞内のHaloTag® タンパク質でした (図4、パネルA)。1Int - HaloTag® タンパク質の発現およびHaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandによる標識では、hNSCの形態的变化は認められませんでした。

細胞非透過性HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligandに続き細胞透過性HaloTag® TMR Ligandで1Int - HaloTag® 融合タンパク質を標識することにより、2つのタンパク質プールを時間的に区別することもできます。1Int - HaloTag® タンパク質を発現するhNSCの標識12時間後、生細胞イメージングでは異なる標識を施したタンパク質プールが転移する様子が観察され、細胞非透過性リガンドにより緑色に標識された表面プールは細胞膜から細胞内へ移行し、細胞透過性リガンドにより赤色に標識された細胞内プールは細胞表面に移動しました (パネル4、パネルB)。

結論

HaloTag® テクノロジーは生細胞のタンパク質を研究する上で強力なツールです。神経幹細胞を用いた実例により、HaloTag® テクノロジーがhNSC内での標識タンパク質追跡に使用できることを示しました。我々は、hNSCでもHaloTag® レポータータンパク質単独または目的タンパク質との融合体が発現することを例証しました。さらにHaloTag® を発現するhNSCは、複数のHaloTag® リガンドで標識できます。HaloTag® タンパク質はhNSCに良く許容され、神経細胞やアストロサイトへの分化後も引き続き発現していました。NLS標的配列を融合させることにより、HaloTag® タンパク質は適切な細胞内区画へ導かれ、欠失型インテグリンを融合させることでHaloTag® タンパク質をhNSC細胞表面に提示することができました。hNSCにおいて細胞非透過性または細胞透過性のHaloTag® リガンドによる1Int - HaloTag® 融合体の標識は、タンパク質プールの空間的分離と細胞表面と細胞内タンパク

質プールの転移する様子を示しました。結論として、HaloTag® テクノロジーは、幹細胞バイオロジーにおいて目的の細胞内および細胞膜タンパク質を研究するための強力な柔軟なツールを提供します。

参考文献

1. Signec, I. *et al.* (2007) *Annu. Rev. Med.* **58**, 12.1–21.16.
2. Los, G.V. and Wood, K. (2006) *Methods Mol. Biol.* **356**, 195–208.
3. Svendsen, C.N. *et al.* (1998) *J. Neurosci. Methods* **85**, 141–52.
4. Los, G.V. *et al.* (2006) *Cell Notes* **14**, 10–4.
5. Kalderon, D. *et al.* (1984) *Cell* **39**, 499–509.
6. Svendsen, S. *et al.* (2007) *Promega Notes* **95**, 16–9.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HaloTag® TMR Ligand	30 μl	G8251	75,000
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	30 μl	G1001	75,000