

HaloTag® Technology: Convenient, Simple and Reliable Labeling from Single Wells to High-Content Screens

HaloTag®テクノロジー：1ウェル観察からハイコンテンツスクリーニングまで応用できる便利、シンプルな信頼性の高い標識技術

By H       A. Benink, Promega Corporation

原文 (英語) は http://www.promega.com/pnotes/101/17252_05/17252_05.pdf 参照

イントロダクション

タンパク質の蛍光標識技術の出現によって、生細胞内における正確なタンパク質の局在性や動態を観察する手段ができたことで細胞生物学は大きな革新を遂げました。この技術の進展に伴い、スペクトルが異なる蛍光ラベルが数多く入手できるようになり、それを検出する顕微鏡も進化しました。実際、単一の細胞において異なる蛍光を共に使用する洗練された研究が、現在の文献では一般的に見られるようになりました。しかし、従来型の蛍光レポーター技術自体には、蛍光標識タンパク質を作成するたびに目的の遺伝子に蛍光タグ配列を融合させるためのクローニングがその都度必要であるという1つの根本的な問題が依然として存在しています。言い換えると、目的のタンパク質に望みの“蛍光色”を有するタグを付けるために異なるコンストラクトを作成する必要があります。HaloTag® labeling technologyでは、生物学者にとってのこのような時間のかかる問題を解決することができます。

HaloTag® 技術の概要

HaloTag® Technologyを使用して、研究者は対象となる遺伝子をHaloTag®タンパク質コード配列を有するベクターにクローニングします。発現すると、この融合タンパク質はスペクトルの異なる多様な蛍光タグで特異的かつ効率的に標識することができます (表1)。これらの小さなタグはHaloTag® Ligandと呼ばれ、HaloTag®タンパク質と共有結合するリンカー部位と蛍光部位で構成されています。ここで重要なことは、HaloTag®タンパク質とこれらのリガンドは、細胞に対して完全に無毒だということです。HaloTag®タンパク質自体は真核生物に類似のタンパク質が内在しないため、融合相手のタンパク質が本来有する細胞内での機能に干渉することはありません (1-6)。さらにHaloTag®タンパク質とそのリガンドの間に形成される共有結合は変性にも耐え

表1. HaloTag® Ligandのラインナップ

標識プロトコル	製品名	E _x /E _m (nm)	サイズ	Cat#
Rapidラベリング (細胞透過性)	HaloTag® TMR Ligand	555/585	15��l	G8252
			30��l	G8251
	HaloTag® Oregon Green® Ligand	496/516 (after hydrolysis)	15��l	G2802
			30��l	G2801
	HaloTag® diAcFAM Ligand	494/526 (after hydrolysis)	15��l	G8273
			30��l	G8272
	HaloTag® Coumarin Ligand	353/434	15��l	G8582
			30��l	G8581
Rapidラベリング (細胞非透過性)	HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	494/517	15��l	G1002
			30��l	G1001
No-Wash ラベリング (細胞透過性)	HaloTag® TMRDirect™ Ligand	555/585	30��l	G2991
	HaloTag® R110Direct™ Ligand	502/527	30��l	G3221

るので、このシステムの応用範囲は広く、細胞固定やゲルでの解析においても信頼性のある結果が得られます。HaloTag® Technologyでは、蛍光リガンドの代わりに固相に対する親和性を持つリガンドを選ぶこともできるため、1つのコンストラクトでタンパク質：タンパク質相互作用やタンパク質：DNA相互作用の研究にまで応用することができます。

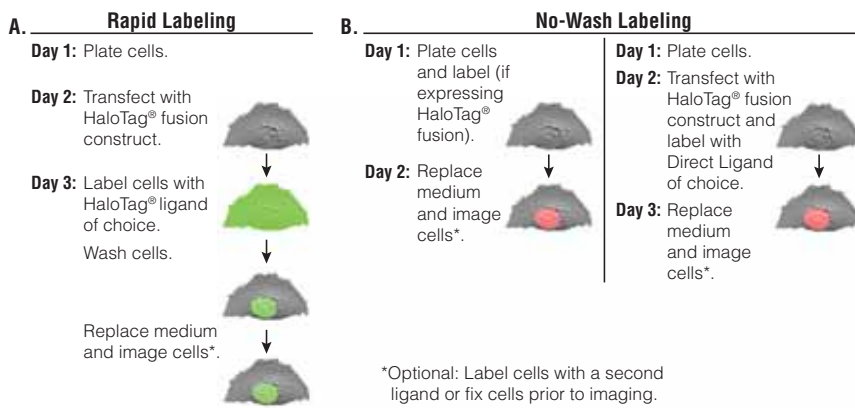


図1. HaloTag® Technologyによる生細胞ラベリング

模式図で生細胞ラベリングのオプションを示す。パネルA. 迅速なRapidラベリング。パネルB. 洗浄不要なNo-Washラベリング。

“迅速”生細胞ラベリング

イメージングのためのHaloTag®標識技術によって、生細胞内で発現したHaloTag®融合タンパク質を迅速かつ簡便に標識することができます。“Rapid”ラベリングと呼ばれるこの方法を用いれば、HaloTag®融合タンパク質は細胞透過性あるいは非透過性の多様なリガンドで標識することができます。リガンド存在下で推奨される短時間のインキュベーションを行っている間に、細胞透過性リガンドは自由に細胞および細胞内コンパートメントに入り、HaloTag®融合タンパク質と共有結合します(図1、パネルA)。次の洗浄段階で未結合のリガンドは細胞外に排出されるので、結果的に非常に低いバックグラウンドノイズで強度の高い特異的シグナルを観察することができます(図2)。

利用可能な数多くの蛍光物質を用いれば、HaloTag® Rapidラベリングによって単一細胞中で発現したタンパク質を1種類以上の蛍光色で迅速かつ効率的に標識することができます。既に示したように(3、4)、細胞膜非透過性の緑色蛍光リガンドで細胞表面をパルス標識し、細胞透過性の赤色蛍光リガンドでチェイス標識することで、単一タンパク質の細胞膜結合プールと細胞内プールを区別して標識することができます。このようにしてHaloTag® Technologyはタンパク質の移行とターンオーバーを研究する上でシンプルかつパワフルな手段を提供します。

“洗浄なし”生細胞ラベリング

新しいTMRDirect™あるいはR110Direct™ Ligandと“No-Wash”ラベリングプロトコルを用いれば、最低限の操作で生細胞を特異的かつ効率的に標識することができます。図1に模式的に示したとおり、Direct Ligandはプレーティングあるいは遺伝子導入段階で培地に添加して一晩静置します。細胞は翌朝のイメージング前に1回だけ培地を置換します。

このような方法を可能にする理由としては、第一にHaloTag® Direct Ligandの高い安定性が挙げられます。Direct Ligandは長時間にわたる生細胞のイメージング実験の間や細胞固定後にも、安定な明るいシグナルを保つことができます。第二に、このような低濃度のリガンドを細胞に透過させるには、より長い時間を用いるためです。HaloTag®タンパク質はリガンドに対して高い親和性を示すように最適化しているので、細胞内に入りさえすればDirect LigandはすぐにHaloTag®タンパク質に結合します。最後に、この方法で用いる濃度では、Direct Ligand



図2. HaloTag® Rapidラベリングにより得られた明瞭かつ特異的なシグナル

HaloTag®-NLS₃ (核局在配列)を発現するU2OS細胞をHaloTag® TMR Ligandを用いてRapidラベリングプロトコルにより標識し共焦点イメージを観察すると、核に限定的な強い蛍光シグナルが得られた。パネルは左から右の順に、蛍光、DICイメージ、2つの重ね合わせ像。イメージは、蛍光色素に適したフィルター装置と、イメージング中に温度37℃とCO₂を保つ環境制御チャンバーをセットした共焦点顕微鏡により得た。

を洗浄・除去する必要が無く、しかもこの標識の結果 得られる蛍光シグナルは明るさと特異性を維持しています(図3)。HaloTag® Direct Ligandで細胞内構造もよく標識され、はっきりした核のシグナルを確認することができます(図3、パネルA)。また、神経幹細胞を含む様々なタイプの細胞内においても高い特異性を示します(3-5)。

何よりも重要なのは、HaloTag® No-Washラベリングプロトコルの数少ないステップは、細胞ベースの実験でごく日常的に行われているステップと同じだということです。具体的には、細胞のプレーティング、その後の一晩のインキュベーション、実験前の培地交換がこれに当たります。それに加えて、細胞はラベル存在下で凍結・融解することができ、これによる明らかな悪影響はありません(データ未掲載)。このように新しいNo-Washプロトコルには特筆すべき利点があり、特に1つステップが増える毎に多くの時間を要するようなウェル数の多い実験においては、たとえそれが自動化されていても非常に有効です。HaloTag® Direct LigandとNo-Washプロトコルを用いた実験は384ウェルのフォーマットでも成功しています。生細胞あるいは固定した細胞でも、共焦点顕微鏡と広視野顕微鏡のどちらでも、このフォーマットでイメージを観察することができます。図4では384ウェルのプレートにおいて広視野顕微鏡で観察した生細胞を示しています(Greiner Bio-One)。

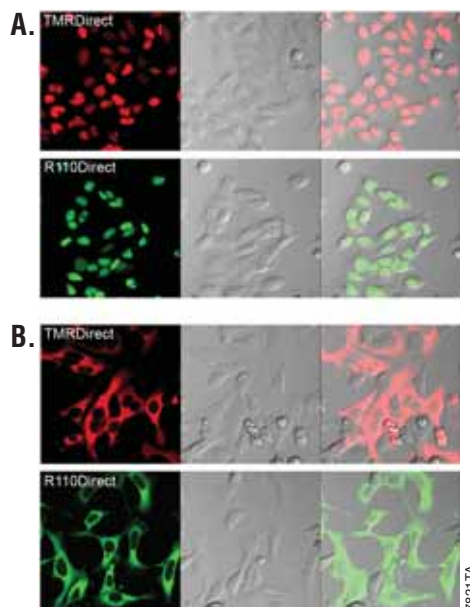


図3. HaloTag® No-Washラベリングにより得られた明瞭かつ特異的なシグナル

パネルA. HaloTag®-NLS₃ (核局在配列)を発現するU2OS細胞をHaloTag® TMRDirect™あるいはR110Direct™ Ligandを用いてNo-Washラベリングプロトコルにより標識し共焦点イメージを見ると、核に限定的な強い蛍光シグナルが得られた。パネルB. HaloTag®-p65 (静止細胞では細胞質に局在)を発現するHEK293細胞をTMRDirect™またはR110Direct™ Ligandを用いてNo-Washラベリングプロトコルにより標識して共焦点イメージを観察すると、細胞質に限定的な強い蛍光シグナルが見える。全パネルは左から右へ順番に蛍光、DICイメージ、2つの重ね合わせ像。イメージは、蛍光色素に適したフィルター装置と、イメージング中に温度37℃とCO₂を保つ環境制御チャンバーをセットした共焦点顕微鏡により得た。

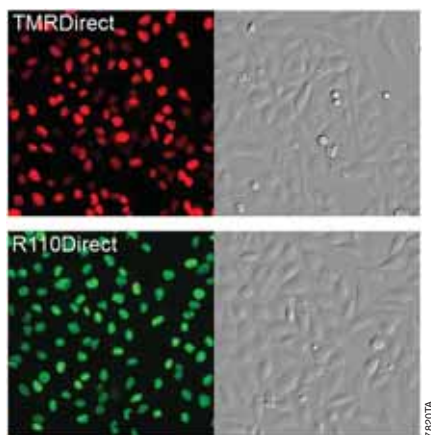


図4. 384ウェルフォーマットでHaloTag® No-Washラベリングにより得られた明瞭かつ特異的なシグナル

HaloTag®-NLS₃ (核局在配列) を発現するU2OS細胞をHaloTag® TMRDirect™あるいはR110Direct™ Ligandを用いたNo-Washラベリングプロトコルにより標識して広視野イメージを見ると、核に限定的な強い蛍光シグナルが観察できた。パネルは左から右へ順に、蛍光イメージとDICイメージ。イメージは、蛍光色素に適したフィルター装置と、イメージング中に温度37℃とCO₂を保つ環境制御チャンバーをセットした顕微鏡により得た。

まとめ

新しいNo-Washプロトコルが加わったことで、HaloTag® Technologyは固有の汎用性に加え、従来のレポーターの持つすべての利便性を提供できるようになりました。HaloTag® Technologyは、創薬分野で行われるようなハイコンテンツ分析自動化システムにも容易に適用させることができます。

参考文献

1. Los, G.V. and Wood, K. (2007) *Methods Mol. Biol.* **356**, 195–208.
2. Los, G.V. *et al.* (2008) *ACS Chem. Biol.* **3**, 373–82.
3. Svendsen, S. *et al.* (2008) *BMC Cell Biol.* **9**, 17.
4. Svendsen, S. *et al.* (2007) *Promega Notes* **95**, 20–2.
5. Lang, C. *et al.* (2006) *J. Exp. Bot.* **57**, 2985–92.
6. Reck-Peterson, S.L. *et al.* (2006) *Cell* **126**, 335–48.

プロトコル

- ◆ HaloTag® Technology: Focus on Imaging 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® TMRDirect™ Ligand	30 µl	G2991	45,000
HaloTag® R110Direct™ Ligand	30 µl	G3221	45,000
HaloTag® TMR Ligand	15 µl	G8252	45,000
	30 µl	G8251	75,000
HaloTag® Oregon Green® Ligand	15 µl	G2802	45,000
	30 µl	G2801	75,000
HaloTag® diAcFAM Ligand	15 µl	G8273	45,000
	30 µl	G8272	75,000
HaloTag® Coumarin Ligand	15 µl	G8582	45,000
	30 µl	G8581	75,000
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	15 µl	G1002	45,000
	30 µl	G1001	75,000