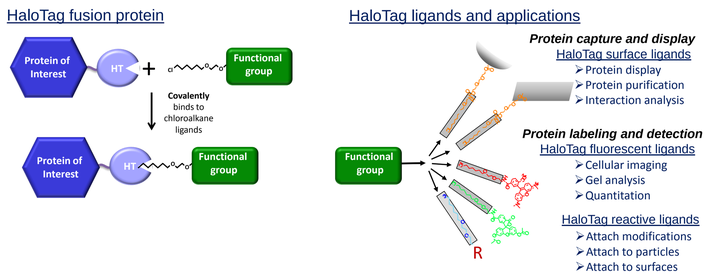
Functional proteomics characterization of human macromolecular complexes using new surface display and imaging technology.

Tsuya Taneda[1], Akira Hasegawa[1], Danette Daniels[2], Jacqui Méndez[2], Nancy Murphy[2], Richard Jones[3], David Allen[3], Hélène Benink[2], Brad Hook[2], Trista Schagat[2], Nathan Greve[2], Nadine Nassif[2], and Marjeta Urh[2]
[1]Promega KK Matsumoto Building 14-15 Nihonbashi-Odemacho Chuo-Ku, Tokyo 103-0011, JAPAN
[2]Promega Corporation 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI U.S.A. 53711
[3]MS Bioworks, LLC 3950 Varsity Drive Ann Arbor, MI 48108

Abstract and introduction

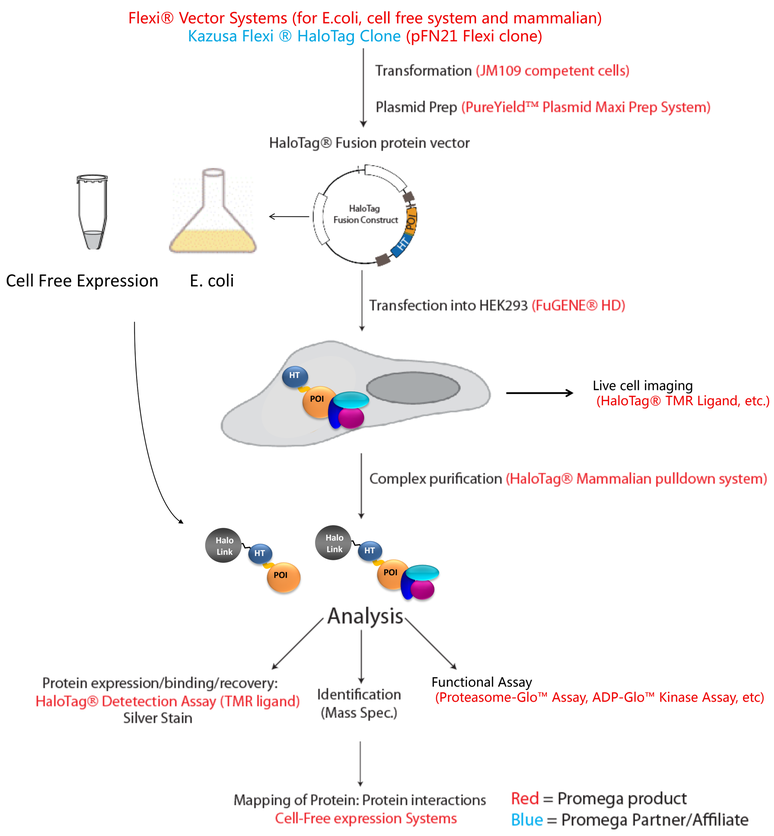
The understanding of protein complex assembly and mapping of protein interactions has rapidly grown in recent years due to significant advances in mass spectrometry. As experiments turn toward characterization of the human proteome and the complexity it presents, a need remains to efficiently capture complexes intact, particularly weak or transient interactors as well as large multiprotein complexes. Here we present a new technology based upon the use of a protein fusion tag, termed HaloTag, which allows for highly specific, oriented, and covalent immobilization of proteins on surfaces, as well as the ability to do correlative localization, trafficking, and protein turnover studies within the cell using a variety of fluorescent ligands. This technology was applied in studies of numerous complexes in mammalian cells, including several macromolecular machines. Incorporation of respective HaloTag fusion proteins into their proper complexes and isolation of interacting partners were verified by mass spectrometry analysis. Complementary fluorescent imaging analysis was also performed to characterize cellular localization for the complexes. Taken together, the multiple capabilities of this technology enable a more complete characterization of protein:protein complexes in eukaryotic systems and further understanding of cellular function.

HaloTag technology



❖HaloTag (HT) は低分子リガンドと特異的な共有結合を形成する33kDa のタグタンパク質である。
❖蛍光種や担体などの異なる様々な機能性リガンドが用意されている。
❖蛍光標識リガンドと結合させればイメージングが可能であり、リガンドが固定化されたレジンと結合させればプルダウンやクロマチン免疫沈降などが可能である。単一のタグで色々な実験に適用できる。

Project Flow Diagram



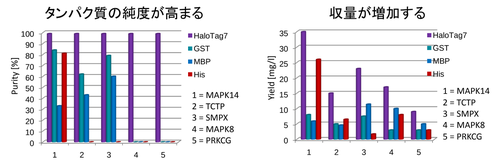
❖HaloTag®融合タンパク質は大腸菌、無細胞合成系、哺乳類などで発現するすることが可能である。HaloTag®を融合したヒトcDNAクローンが販売されている。
❖細胞内で発現したHaloTag®融合タンパク質を複合体ごとHaloLink™ Resinを使い、目的タンパク質を精製したり、タンパク質複合体の同定、機能解析などが可能である。

Higher solubility, yield and purity in E. coli

可溶性が高まる

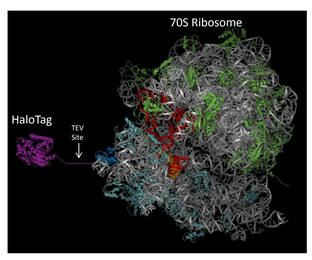
Solubility level (µg/ml)	Frequency of soluble proteins (%)			
	HT7	GST	MBP	His
High (>100 µg/ml)	26	13	26	0
Medium (<100 µg/ml)	48	26	26	22
High + Medium	74	39	52	22
Low	26	61	48	78

Ohana, R.F., *et al. Protein Exp Purif*, **68:** 1 (2009)

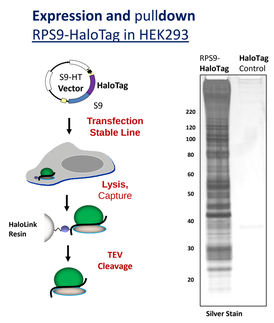


❖HaloTag ®はGST、MBP、Hisタグより可溶性が高い。
❖他のタグよりも高純度に高収量でタンパク質を回収することができた。

Capture of intact 80S Ribosome using RPS9-HaloTag



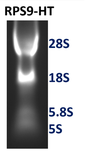
Selmer *et al.* (2006) *Science* **313**, 1935 pdb:2j00 and 2j01



Gel and Mass Spectrometry Analysis

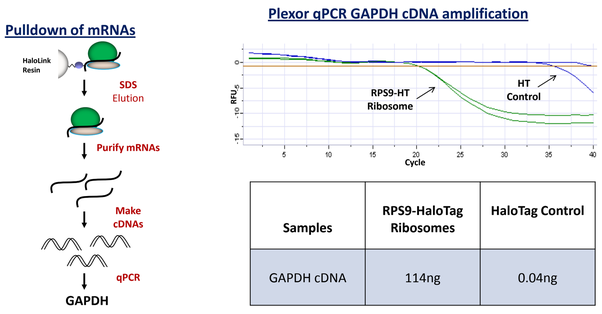
Identified by MS (LC-MS/MS)
- 31 of 33 40S proteins
- 42 of 50 60S proteins
- 2 Poly-A binding proteins
- 1 GNF exchange protein
- 9 Nuclear ribonucleoproteins
- 2 Initiation factors
- 2 Elongation factors

Purified rRNAs



❖Ribosomal proteinのひとつであるRPS9のHaloTag融合タンパク質を哺乳類細胞で発現させ、細胞のライゼートから80Sリボソームを直接単離することができた。
❖MS解析で相互作用するタンパク質を同定した結果、RNAを含むリボソームを捕捉している可能性が示唆された。

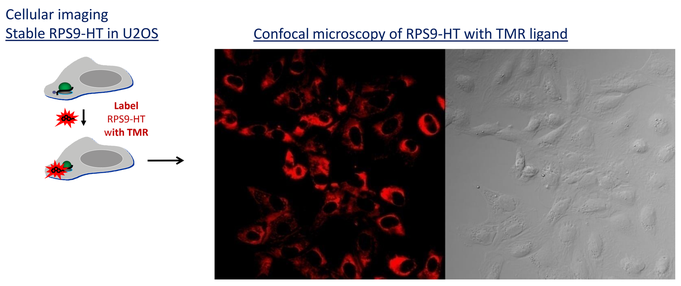
Identification of ribosomal-bound mRNAs



Samples	RPS9-HaloTag Ribosomes	HaloTag Control
GAPDH cDNA	114ng	0.04ng

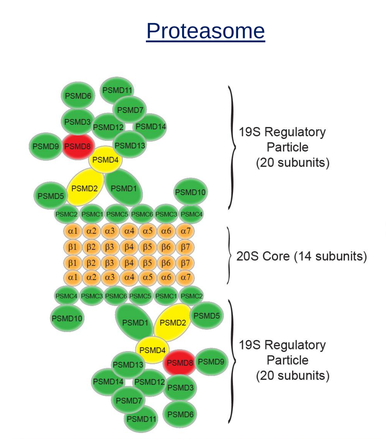
❖RPS9-HTで補足したリボソームにmRNAも含まれていた。
❖RPS9-HTは*in vivo* で80Sリボソームに取り込まれていたことが示された。

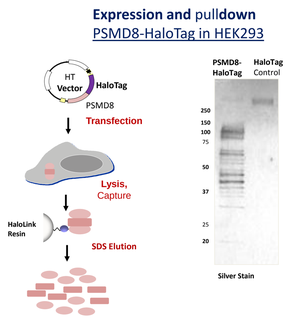
Cellular imaging and localization of ribosomes

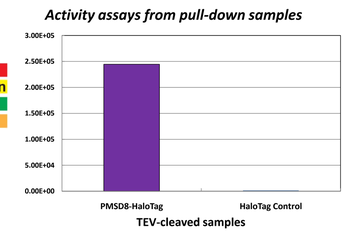


❖RPS9-HTの安定発現株をTMR蛍光リガンドを使用して効率良く蛍光標識し、細胞内局在を観察した。
❖リボソームが局在すると予想される細胞質に局在がみられた。

Isolation of active Proteasomes using PSMD8-HaloTag

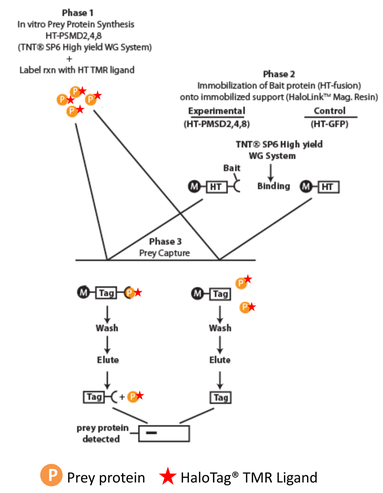


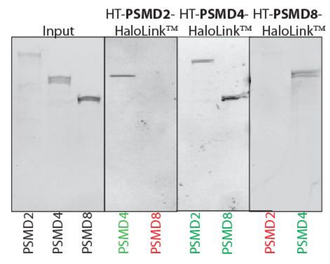


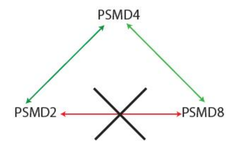


❖PSMD8-HTを哺乳類細胞で発現させ、プロテアソーム複合体を捕捉した（MS解析により同定）
❖プロテアソーム活性測定により、単離した複合体が活性を維持していることが明らかになった。

Using Cell-Free protein expression for analysis of proteins identified by Mass Spectrometry







❖ 無細胞合成系でHaloTag®融合タンパク質を合成し、相互作用を確認することができる（ネガティブコントロールを使用した実験で相互作用は検出されないことは確認している）。コンストラクションやタンパク質の精製は不要である。
❖ HaloTag® により素早く感度良くプロテアソームのサブユニットを検出できた。
❖PSMD2とPSMD4、PSMD4とPSMD8が直接的に相互作用することが明らかとなった。

Summary

❖HaloTag® technology allows for broad study of protein function both *in vitro* and *in vivo*, including complex isolation and cellular imaging.
HaloTagテクノロジーで幅広いタンパク質の解析が可能になります。
❖Intracellular protein complexes can be analyzed for interacting partners using mass spectrometry or be released from resin intact for functional assays.
プルダウンアッセイで得られたタンパク質複合体は、マススペクトロメトリーによる解析や機能アッセイに使用可能です。
❖Rapid and covalent isolation of complexes promotes maintenance of complex integrity, particularly higher order complexes.
巨大な複合体を完全な状態で単離することが可能です。
❖HaloTag® fusion proteins show proper incorporation and physiological activity in their respective macromolecular complexes.
HaloTag融合タンパク質は複合体内で適切な位置に組み込まれ、適切なタンパク質と相互作用していた。