

Cell-Based Applications of Living Colors™ Proteins

多重発光スクリーニング用途の貴重なツール

- Pathway HT共焦点バイオイメージングシステムなど、他のさまざまな測定機器と連動・連携して使用できる簡便な検出装置
- 細胞内タンパク質トラフィッキングやハイコンテックススクリーニングアッセイに最適
- 補助因子や酵素基質の添加が不要

スクリーニング技術が、「費用対効果の観念」と「生命科学分野における重要な意義」に向けて変身しながら発展してきたため、細胞を用いた種々のアッセイ法も、近年、非常に勢いで開発・発展してきました。スクリーニング技術のこうした変化は細胞の新しいアッセイシステムを目指すようになりました。従来のさまざまな*in vitro*アッセイ系に対し、真実をより忠実に反映し、より多くの複雑な情報が得られるようなものでなければなりません。

蛍光タンパク質は、生きている細胞に対して非侵襲的で、リアルタイムの情報が得られる実験手段としてその有用性がすでに確立している研究ツールです。そしてその蛍光タンパク質は、今、試薬不要の、均質性を誇るさまざまなアッセイ系に使われています。こうした新しいスクリーニングアッセイの登場は、従来のスクリーニングアッセイに足りなかった要素を反映しているといえるでしょう。

蛍光タンパク質のスペクトル特性は、蛍光測定装置、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡で用いられる多重発光・測定に極めて適しています。従って、医薬品開発における新薬候補化合物の探索やスクリーニング工程を見直してさらに一層能率化させるという観点から見た場合、蛍光タンパク質は非常に大きな可能性を秘めているといえます。

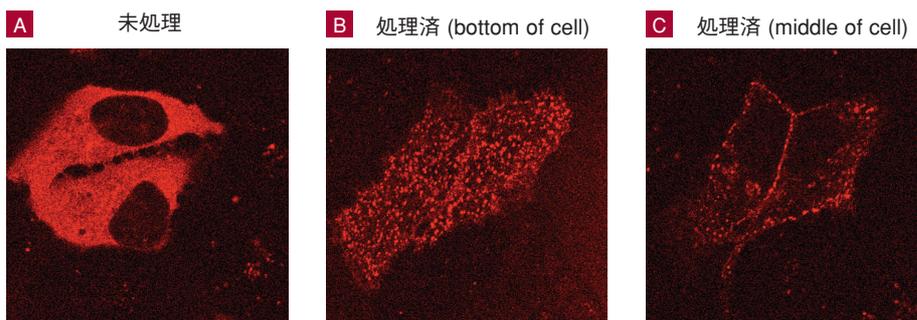


図1 TransfluoアッセイにおけるLiving Color DsRed2との融合タンパク質で見たGタンパク共役受容体の活性化 U-2 OS細胞に、 β_2 アドレナリン受容体および β アレスチン2・DsRed2融合タンパク質との同時トランスフェクションを行い、 $1\mu\text{M}$ イソプロテレンールで30分間処理しました。細胞は63倍の倍率で共焦点顕微鏡を用いて観察しました。パネルA. 未処理の細胞 パネルBとC. 処理された細胞の蛍光画像 細胞とプレートとの接着面 (B)、細胞の切片 (C)

BiosciencesがおすすめするClontech Novel Fluorescent Protein (NFPs) シリーズには、Reef Coral Fluorescent Proteins (RCFPs) としてAmCyan1、ZsGreen1、ZsYellow1、DsRed、AsRed2、HcRed1があり、さらに、弊社の新しい単量体蛍光タンパク質であるDsRed-Monomer (赤色)とAcGFP1 (緑色)が加わりました (1-3; 本文2~7ページも参照)。DsRed-Monomerは、製品として唯一の赤色の単量体蛍光タンパク質で、融合タンパク質タグとしてAcGFP1と二重標識するのに大変適しています。

これらの蛍光タンパク質は、従来のものとは異なる、新規の蛍光タンパク質で、489nm (AmCyan1) から618nm (HcRed1) (4, 5) に渡る広範囲の蛍光スペクトルをカバーしています。検出に補助因子や酵素基質を一切必要としないので、実験系が簡単になり、能率も上がります。

さまざまな応用例

弊社の蛍光タンパク質は、さまざまな種類のアッセイ系を組み立てる際の極めて強力なツールとなります (4の総説参照)。RCFPsは、ユーザーが目的とするタンパク質を標識する融合タンパク質の担い手として、これまで好評のうちに使用されてきました。さらに、細胞自体や細胞内小器官の理想的なマーカーでもあります (6-7; 本文2~7ページも参照)。単量体のAcGFP1およびDsRed-Monomerは、完全長の融合タンパク質が必要な研究には最適の選択となり得ます。完全長のアクチン、チューブリン、インシュリンなどがその例で、満足のいく結果が得られています (データ未提示)。

さらにRCFPsは、さまざまな個体 (植物から動物に至るまで) でのタンパク質発現でよい結果を残しています (1; データ未提示)。RCFPsのうち、特に明るくかつ不安定化ベクターとして用いることができる蛍光タンパク質 (例えば、ZsGreen1、HcRed1、DsRed-Expressなど) はいずれも理想的な転写レポーターとして働きます (4, 6)。RCFPsシリーズ、特にZsGreenは、転移癌の浸潤モデルの一つである*in vitro*遊走アッセイのマーカーとして使えることに加えて、生きている細胞のプロテオソーム活性をモニターする研究においても強力かつ高感度のバイオセンサーとなることが示されています (8; データ未提示)。

Cell-Based Applications...continued

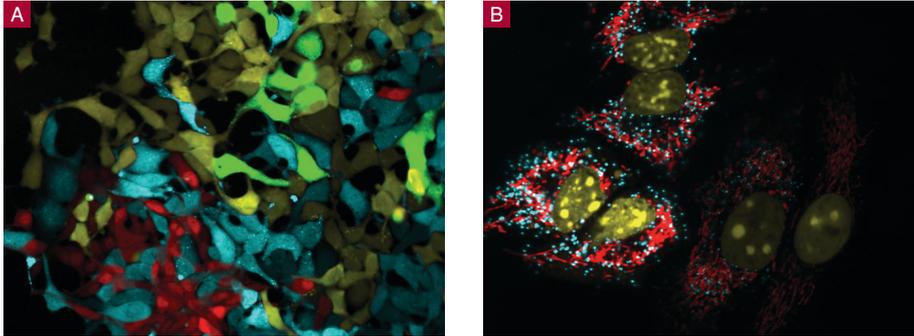


図2 Pathway Confocal Bioimagerで画像処理したLiving Colors Novel Fluorescent Proteinsの4色発光可視化 パネルA. AmCyan1、ZsGreen1、ZsYellow1、HcRed1のいずれかを安定的に発現しているクローン化されたHEK293各細胞株を混合し同一のウェルに播種した後、20倍の倍率で Pathway Confocal Bioimagerで画像処理しました。Chroma Technology社のフィルターセットを用いてそれぞれの蛍光タンパク質からのシグナルを分離しました (AmCyan1タンパク質に対しては、HQ440/30、470DCXR、HQ488/35のフィルターの組み合わせ; ZsGreen1タンパク質に対しては、HQ488/10、84100 beam splitter、HQ540/50; ZsYellow1タンパク質に対しては、HQ500/40、530DCLP、HQ555/40; HcRed1タンパク質に対しては、HQ575/50x、Q610LP、HQ640/50m)。パネルB. HEK293細胞は、AmCyan1-Peroxi (ペルオキシソーム)、ZsYellow1-Nuc (細胞核)、HcRed1-Mito (ミトコンドリア)、それぞれの融合タンパク質をコードしているコンストラクトを一過性的にトランスフェクションしました。60倍の倍率で油浸対物レンズを用いて上記の方法に従い画像処理しました。

ハイコンテツスクリーニング・アッセイに最適

ここで取り上げた例は、スクリーニングに特化したツールとしてすでに発表されているClontech NFPsの使用法を補うためのものです。NFPsは、例えば、Gタンパク共役受容体 (GPCR) の活性化をモニターするなど、信頼性の高いハイコンテツの細胞アッセイ系を組み立てるのに使用できます。βアレスタチン2調節タンパク質とDsRed2との融合タンパク質を使うと、β2アドレナリン受容体の活性化をモニターする、すばらしいNorak Transfluorのアッセイ系を組み立てることができます (図1)。アゴニスト非存在下では、βアレスタチン2調節タンパク質とDsRed2との融合タンパク質は、きれいに細胞質に局在し、アゴニスト添加時には、融合タンパク質は細胞膜へと移動します。細胞膜では、融合タンパク質は受容体の脱感作を起こし、クラスリン・コートドピットの内部化が起こります。このコートドピットの形成は、β2アドレナリン受容体の活性化を意味します。

複数のNFPsを行うと、同種細胞集団中の変異細胞や、細胞内内部構造の特定が可能です

AmCyan1、ZsGreen1、ZsYellow1、HcRed1のいずれかを発現している細胞が混じった集団においてはPathway HT Confocal Bioimagerのような共焦点顕微鏡を用いるシステムを使って多重発光の検出が可能に

なります (図2、パネルA、本文10~11ページも参照)。弊社のNFPsを利用すると、細胞内小器官や細胞内コンパートメントを標識し、容易に他の小器官や細胞内構造物と区別ができます (図2、パネルB)。

Clontech Fluorescent Proteins マルチプレックスの可能性と特性は、細胞アッセイを使った創薬やスクリーニング工程をより一層発展させる上で、重要性が増していくことでしょう。

参考文献

1. Matz, M. V., et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:969-973. Erratum in: *Nature Biotechnol.* (1999) 17:1227.
2. Gurskaya, N. G., et al. (2001) *FEBS Lett.* 507:16-20.
3. Gurskaya, N. G., et al. (2003) *Biochem. J.* 373:403-408.
4. Haugwitz M., et al. (2003) *Genet. Eng. News* 23(21).
5. Verkhusha, V. V. & Lukyanov, K. A. (2004) *Nature Biotechnol.* 22(3):289-296.
6. Reef Coral Fluorescent Protein Vectors (July 2003) *Clontechiques* XVIII(3):67.
7. Living Colors HcRed1 Localization Vectors (July 2003) *Clontechiques* XVIII(3):8.
8. Living Colors Cell Lines (April 2004) *Clontechiques* XIX(2):2-4.

Living Colors Products	サイズ	カタログ番号	価格
pAcGFP1-N1 Vector	20 µg	632469	¥88,000
pAcGFP1-C1 Vector	20 µg	632470	¥88,000
pAmCyan1-N1 Vector	20 µg	632442	¥88,000
pAmCyan1-C1 Vector	20 µg	632441	¥88,000
pAsRed2-N1 Vector	20 µg	632449	¥88,000
pAsRed2-C1 Vector	20 µg	632450	¥88,000
pDsRed2-N1 Vector	20 µg	632406	¥126,000
pDsRed2-C1 Vector	20 µg	632407	¥126,000
pDsRed-Express-N1 Vector	20 µg	632429	¥126,000
pDsRed-Express-C1 Vector	20 µg	632430	¥126,000
pDsRed-Monomer-N1 Vector	20 µg	632465	¥126,000
pDsRed-Monomer-C1 Vector	20 µg	632466	¥126,000
pHcRed1-N1/1 Vector	20 µg	632424	¥88,000
pHcRed1-C1 Vector	20 µg	632415	¥88,000
pZsGreen1-N1 Vector	20 µg	632448	¥88,000
pZsGreen1-C1 Vector	20 µg	632447	¥88,000
pZsYellow1-N1 Vector	20 µg	632445	¥88,000
pZsYellow1-C1 Vector	20 µg	632444	¥88,000

ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。営業施設の場合、ご購入前にライセンス (有償) を取得する必要があります。

Living Colors 関連製品

- Anti-RCFP Polyclonal Pan Antibody (Cat. No. 632475)
- Full-Length ZsGreen Polyclonal Antibody (Cat. No. 632474)
- DsRed Monoclonal Antibody (Cat. Nos. 632392 & 632393)
- DsRed Polyclonal Antibody (Cat. No. 632397)
- HcRed Polyclonal Antibody (Cat. No. 632452)
- Pathway Bioimager (inquire)

購入される方へのご注意

Living Colors 製品については31ページのライセンス確認事項をご覧ください。