

# Proteasome Sensor Vector

生細胞でプロテアソーム活性をモニターする新しい蛍光レポーター

- 他の補助因子や細胞溶解を必要としない容易で非侵襲的な検出法
- 集団全体または個々の細胞でリアルタイムにプロテアソーム活性を研究
- プロテアソーム阻害剤をアッセイするためのマルチウェルスクリーニングが可能
- 新しい蛍光タンパクZsGreenをコード

タンパク質の分解は遺伝子転写や細胞周期進行、DNA修復、細胞分化、ウイルス感染、発癌など多様な生物過程や病的過程に重要な役割を果たしています(1)。細胞が有するこの分解機構は損傷を受けたり誤って折り畳まれたタンパク質を除去すると同時に、不要になったタンパク質を常に監視しています。その中には、活性タンパク質や寿命が短いタンパク質のほか、目的を遂行しさらに活性が持続すると細胞に悪影響を及ぼす恐れがある極めて強力なタンパク質も含まれています。しかし、何がこの極めて特異的で不可逆的な過程を制御しているのでしょうか？

ほとんどの場合それはプロテアソームであり、逸脱したタンパク質を探索するため細胞内の移動に時間を費やしている巨大な(26S)タンパク質複合体です。Clontechの新しいProteasome Sensor Vectorを使用すると、生細胞でこの活性を研究することができます(図1A)。本ベクターは、プロテアソームにより速やかに分解される不安定型緑色蛍光タンパク質(ZsGreen)をコードしています。例えば、ある化合物の添加によりプロテアソームが阻害されると、この蛍光タンパク質は蛍光顕微鏡やフローサイトメトリー、マイクロプレート蛍光測定法で検出可能なレベルまで速やかに蓄積します(図1B~D)。

ZsGreenをプロテアソームの基質に変換するためC末端に特別の分解モチーフを融合し、26Sプロテアソームによる除去の標的となるようにしました(2)。他の多くのプロテアソームの基質と異なり、この蛍光融合タンパク質(ZsProSensor)は分解されるためにユビキチンによる修飾を必要としないため、翻訳後直ちにプロテアソームの標的となります。実際に、蛍光団が完成する前に分解されると考えられます。その結果、正常で健全な対照集団で観察されるバックグラウンドの蛍光は極めて低くなっています(図1Bと1D)。

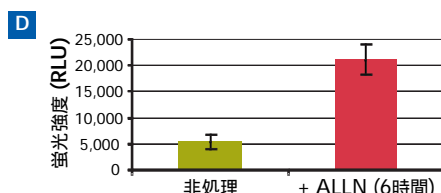
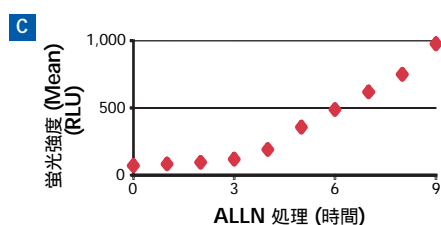
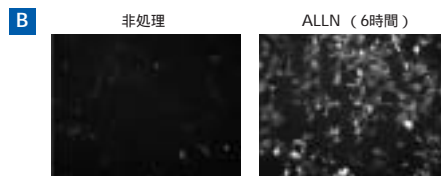
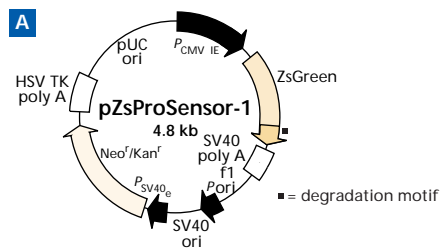


図1 生細胞におけるプロテアソーム活性の検討  
Proteasome Sensor Vectorをトランスフェクトした安定HEK 293細胞(パネルA)をG418で選択し、10 $\mu$ MのALLNで表示した時間だけ処理しました。ALLNはプロテアソームのキモトリプシン活性を可逆的に阻害するペプチダルデヒド(Ac-Leu-Leu-Nle-al)であり、プロテアソーム複合体によるZsProSensorタンパク質の分解を阻害します。その結果、直ちにタンパク質が蓄積し、蛍光顕微鏡(パネルB) フローサイトメトリー(パネルC)または96穴プレートリーダーを用いた蛍光測定法(パネルD)で測定可能な強い緑色発光シグナルを発生しました。

## 基質や細胞溶解を必要としない簡単な蛍光検出法

天然造礁サンゴ*Zoanthus sp.*のタンパク質(3)であるZsGreenは、標準的FITCフィルターセットで容易に検出可能な明瞭な緑色光( $\lambda_{Max}$  = 505 nm)を放射します。*Aequorea victoria*の緑色蛍光タンパク質GFPの検出用に設計したフィルターでも良好な結果が得られます。ZsGreenはGFPと同様、蛍光を発するため励起光( $\lambda_{Max}$  =

4月1日よりカタログ番号が新しくなりました。

品名	サイズ	カタログ番号	価格	NEW!
Proteasome Sensor Vector <sup>a</sup>	20 $\mu$ g	632425	¥126,000 <sup>b</sup>	

a ご注文の際、ライセンス確認書が必要となります。  
b 非営利施設対象価格です。営利施設の場合、ご注文前にライセンス契約を結んでいただく必要があります。ライセンス契約と価格についてはクロンテックテクニカルサポートにお問合せください。

価格は予告なしに変更する場合があります。

## 購入される方へのご注意

Living Colors に関するライセンス確認事項(27ページ)をご覧ください。

493nm)以外に補助因子や基質を必要としません。このため、非侵襲的にリアルタイムでプロテアソーム活性を研究することができます。図1Cのデータが示すように、ほとんどの培養条件で速やかに緑色蛍光を発生します。この例では、阻害剤添加3~4時間後に蛍光増大が検出され、その後シグナルは直線的に増大しました。

## プロテアソームの機能研究と阻害剤の特定

Proteasome Sensor Vectorはプロテアソーム活性を阻害する化合物や物理的因子の特定に特に有用です。例えばマルチウェル培養プレートを用いて(図1D)、多数の化合物や処置の作用を解析することができます。本ベクターは一過性または安定にトランスフェクトした培養細胞を作製可能なように設計されており、その後顕微鏡で個々の細胞を解析したり、蛍光測定法または488 nmレーザーを用いた蛍光細胞分析分離法(FACS)により集団全体として解析することが可能です。

## 参考文献

1. Adams, J. (2002) *Trends Mol. Med.* **8**(4 Suppl):S49-S54.
2. Li, X., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**:34970-34975.
3. Matz, M. V., et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**:969-973.