

Reef Coral Fluorescent Protein Vectors

シアン、緑、黄、赤の4色が選べる4種類の新規タンパク質

- リアルタイムの遺伝子発現モニタリングに理想的
- 特別に設計された鮮明な蛍光
- 哺乳類細胞で良好な発現

Clontechでは、Reef Coral Fluorescent Protein(RCFP、表1)の全コレクションを提供しています。現在DsRed2やDsRed-Express、HcRed1に加えて、**AmCyan**、**ZsGreen**、**ZsYellow**、**AsRed**をコードする細菌と哺乳類細胞の発現ベクターの完全セットをご利用いただけます。これら4種類のタンパク質はDsRedと同様、*Anthozoa*類に属する一群の造礁サンゴに由来します(1)。上記のタンパク質は、さらに可溶性と発光輝度を高め、より短時間で発光団が成熟するRCFPを発現するように各全長cDNAに一連の変異を導入し、*in vivo* レポーターとして使用可能なように改変されています。また、哺乳類細胞での翻訳効率を高めるため、ヒトのコードに合わせて最適化した各cDNAをご用意しています。

RCFPではシアンから長波長赤色まで幅広く揃えておりますので(図1)、多色標識での使用に適しています。それぞれが蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーにより容易に検出可能な異なる波長を発します。適切なフィルターと励起波長を使用すれば、同一細胞または細胞集団で3種類から場合

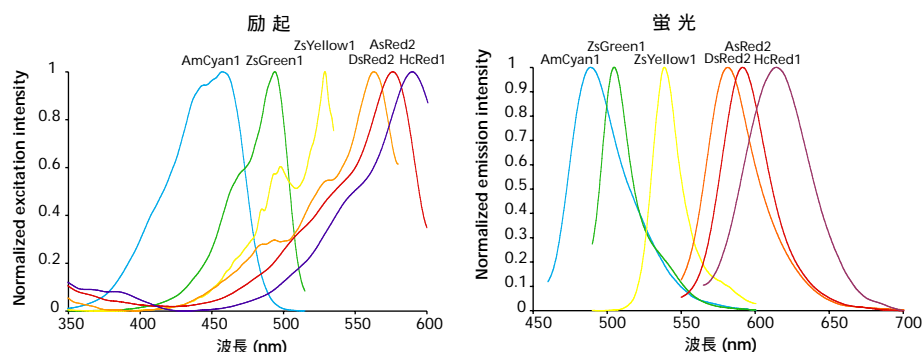


図1 Living Colors Reef Coral Fluorescent ProteinであるAmCyan1、ZsGreen1、ZsYellow1、DsRed2、AsRed2、HcRed1の励起スペクトルと発光スペクトル DsRed-Expressのスペクトル(上図では省略)はDsRed2と非常に似ていますが、DsRed-Expressの残存緑色蛍光はDsRed2よりはるかに低レベルです。

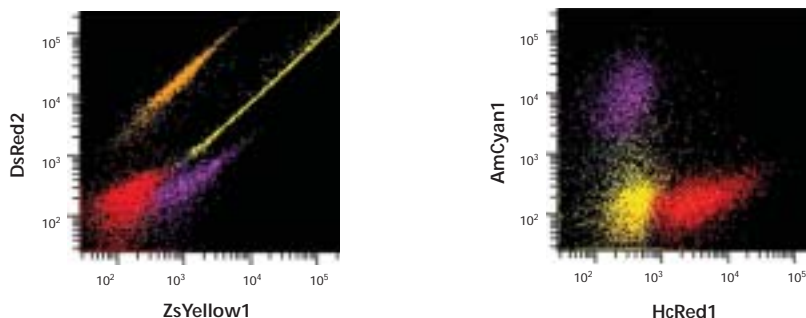


図2 フローサイトメトリーによるRCFP発現細胞の4色分離 DsRed2、ZsYellow1、HcRed1またはAmCyan1を発現している混在細胞集団をフローサイトメトリーにより分離しました。FACS Aria™ Cell Sorterで使用した3種類のレーザー光は、AmCyan1を励起させる波長が407nm、DsRed2とZsYellow1には488nm、HcRed1では633nmです。

表1 Living Colors Fluorescent Protein の内容

蛍光タンパク質	励起極大波長	蛍光極大波長	検出までの時間(時間)*	蛍光強度(対EGFP)	構造	レポーター活性	融合タンパクの適否	コメント
	Max (nm)	Max (nm)						
Reef Coral Fluorescent Proteins								
AmCyan1	458	489	8-12	+++	四量体	+++	+	ECFPに代わる安定蛍光型
ZsGreen1	493	505	8-12	++++	四量体	++++	+	明るい緑色
ZsYellow1	529	539	8-12	++	四量体	+++	+	多色標識に最適な真の黄色放射
DsRed-Express	557	579	8-12	+++	四量体	+++	++	緑色放射が少なく成熟が早いため、FACSに適したDsRed変異体
DsRed2	563	582	24	+++	四量体	+++	++	低い凝集傾向
AsRed2	576	592	8-12	++	四量体	+++	+	
HcRed1	588	618	16	+	二量体	+	++	4色多重解析が可能な長波長赤色蛍光
Aequorea victoria GFP variants								
ECFP	439	476	8-12	+	単量体	+	+++	EGFPやEYFPと比較して不安定型蛍光
EGFP	484	510	8-12	+++	単量体	+++	+++	
EYFP	512	529	8-12	++	単量体	+++	+++	緑と黄色の間色蛍光

RCFPはAequorea victoriaの緑色蛍光タンパク質(GFP)と別の生物種に由来しますが、構造的相同性を備えています。しかし、Aequoreaに由来するGFPの色彩変異体と異なり、RCFPは単一蛍光タンパク質の突然変異体ではなく、異なる遺伝子にコードされた独自のタンパク質です。HcRed1を除くすべてのRCFPは、野生型DsRedと同じ4量体構造であると考えられています。

*一過性にトランスフェクトした哺乳類培養細胞を用いてFACS解析した測定値。

Reef Coral Fluorescent Protein Vectors...continued

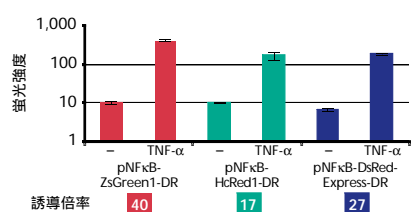


図3 プロモーター活性の発現を検出 ZsGreen、HcRed1、DsRed-Expressの不安定型変異体を用いて(11)、TNF-αに反応するNFκBプロモーターの誘導を測定しました。上に示すベクターに存在する蛍光レポーター遺伝子のMCS上流に本プロモーターをクローニングした後、HeLa細胞へ一過性にトランスフェクトした後、HeLa細胞へ一過性にトランスフェクトした後、最初に基準となる蛍光を測定するためフローサイトメトリーにより細胞を解析し、次に100μg/mlのTNF-αで処理して4時間後に誘導倍率を測定しました。

によっては4種類のRCFPを分離解析することができます。本法は例えば混在細胞集団の分離や(図2)、異なるプロモーターからの遺伝子発現開始の検出に使用できます(図3)。ZsYellow1の発光は、ZsGreen1とAsRed2の間に理想的に位置していることにご注目ください。実際に3種類のタンパク質から得られるすべてのシグナルは、1種類のレーザー励起光(488nm)と共通の検出チャンネルを用いてフローサイトメトリーにより分離することができます。

安定した鮮明色

Reef Coral Fluorescent Proteinは広範囲の原核細胞と真核細胞で発現・検出が可能であり、極めて安定した蛍光を発するため長時間にわたる蛍光観察が容易です。RCFPは*Aequorea*に由来するGFP変異体と同様に、細胞または生物個体全体で発現させることが可能であり、検出のために補助因子や基質を加える必要はありません。RCFPは二量体や四量体など高次多量体を形成する傾向がありますが、これまで発表された多くの研究が示すように、RCFPは正常な生理機能を妨げることなく目的タンパク質と融合可能です(2-6)。重要な点として、RCFPは哺乳類細胞での忍容性が良好であり、トランスフェクションによる安定細胞株やトランスジェニック生物の作製に有用であることが証明されています(7-10)。

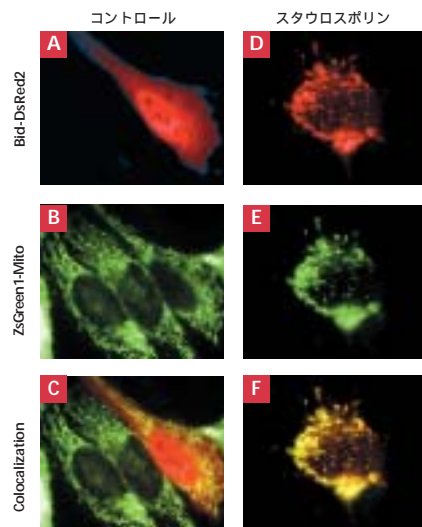


図4 DsRed2を用いたBid活性化の観察 HeLa細胞に2種類のプラスミドを一過性にトランスフェクトしました。一方はミトコンドリア局在性ZsGreen1(ZsGreen1-Mito)をコードしており、もう一方はBidと融合したDsRed2をコードしています。BidはBcl-2ファミリーに属するタンパク質であり、アポトーシス誘導時に細胞質からミトコンドリアへ移動します。アポトーシス誘導前ではパネルA: Bid-DsRed2は細胞質に存在しています。パネルB: ミトコンドリアはZsGreen1-Mitoで標識されています。パネルC: AとBの画像を重ね合わせると細胞内の局在が異なることがわかります。スタウロスポリン1μMで3時間処理してアポトーシスを誘導すると、パネルD: Bid-DsRed2、パネルE: ZsGreen1-Mitoのように変化し、パネルF: DとEの画像を重ねるとミトコンドリアマーカーZsGreen1-MitoとBid-DsRed2が共存しており、Bid-DsRed2がミトコンドリアへ移動したことがわかります。

RCFPを使用すると、細胞内のタンパク質を正確に追跡できる場合があります(図4)。抗体や色素を利用する検出法と異なり、本解析法では固定操作や多数の洗浄段階が不要であり、極めて短時間に多数の細胞を用いたアッセイが可能であるため、薬物スクリーニングの用途に最適です。ただし、RCFPは多量体構造をとり凝集傾向があるため、主にタンパク質の局在を特定するタグとして蛍光タンパク質を利用する場合は、*Aequorea victoria*に由来するGFPの強化型変異体であるECFP、EGFPまたはEYFPのいずれかを最初に検討することをお勧めします。詳細情報はwww.clontech.comをご覧ください。

ベクター	サイズ	カタログ番号	価格
pAmCyan ^{a,b}	20 μg	632440	¥126,000*
pAmCyan1-N1 ^c	20 μg	632442	¥126,000*
pAmCyan1-C1 ^c	20 μg	632441	¥126,000*
pZsGreen ^{a,b}	20 μg	632446	¥126,000*
pZsGreen1-N1 ^c	20 μg	632448	¥126,000*
pZsGreen1-C1 ^c	20 μg	632447	¥126,000*
pZsYellow ^{a,b}	20 μg	632443	¥126,000*
pZsYellow1-N1 ^c	20 μg	632445	¥126,000*
pZsYellow1-C1 ^c	20 μg	632444	¥126,000*
pAsRed2 ^a	20 μg	632451	¥126,000*
pAsRed2-N1 ^c	20 μg	632449	¥126,000*
pAsRed2-C1 ^c	20 μg	632450	¥126,000*

* 非営利施設対象価格です。営利施設の場合、ご注文の前にライセンス契約を結んでいただく必要があります。詳しくはクローンテックテクニカルサポートにお問い合わせください。

- a 細菌発現ベクター (lacプロモーター)
 b 本ベクターのRCFP遺伝子はヒトのコドンに合わせて最適化されていません。
 c RCFPとN末端融合体またはC末端融合体を作製するための哺乳類発現ベクターであり、クローニングベクターまたはトランスフェクションマーカーとしても使用可能です。本ベクター単独では*in vivo*でRCFPを発現します。本ベクターのRCFP遺伝子はヒトのコドンに合わせて最適化されています。

購入される方へのご注意

これらの製品は米国またはその他外国で特許出願中です。

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。

参考文献

- Matz, M. V., et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**:969-973. Erratum in: *Nat. Biotechnol.* (1999) **17**:1227.
- Schulz, R., et al. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**:376-384.
- Nelson, G., et al. (2002) *J. Cell Sci.* **115**:1137-1148.
- Engqvist-Goldstein, A. E. Y., et al. (2001) *J. Cell Biol.* **154**:1209-1223.
- Tsuboi, T., et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:15957-15961.
- Nechushtan, A., et al. (2001) *J. Cell Biol.* **153**:1265-1276.
- Bourett, T. M., et al. (2002) *Fungal Genet. Biol.* **37**:211-220.
- Richards, B., et al. (2002) *Cytometry* **48**:106-112.
- Handler, A. M., et al. (2001) *Biotechniques* **31**:820, 824-828.
- Feng, G., et al. (2000) *Neuron* **28**:41-51.
- Destabilized DsRed-Express and HcRed Vectors (October 2002) *Clontech* XVII(4):14-15.