

# Living Colors™ Fluorescent Timer

## 緑から赤へ - 時間経過に応じて色彩の変化する蛍光タンパク質

プロモーターの調節を *in vivo* でリアルタイム分析  
 発生過程におけるプロモーター活性の変化を検出  
 様々な細胞系譜におけるプロモーター活性を可視化

時間経過に伴い色彩が緑から赤にシフトする蛍光タンパク質、Living Colors™ Fluorescent Timerはプロモーター研究に革命をもたらす製品です。この色彩の変化により、プロモーター活性の時間枠を可視化し、生体内のどこでプロモーターが活性化されるかだけでなく、不活性化するタイミングをも示すことが可能です。このような現象の可視化は、これまででは不可能でした。また、本レポーターは蛍光タンパク質であるため、コファクターや基質の添加といった追加処理を必要とせずに、プロモーター活性を観察できます。

### プロモーター活性を簡単にキャラクタライズ

Fluorescent TimerはDsRed<sup>+</sup> 蛍光レポーターの変異型タンパク質です。このタンパク質は使用する発現系に依存して数時間をかけて成熟し、それに伴い色彩が緑から赤に変化します（図1Aおよび1B）。つまり、緑色の蛍光は翻訳直後のタンパク質を表わし、赤い蛍光は時間経過に伴い緑から赤に波長がシフトした成熟タンパク質を表わしています。各時間における赤と緑の蛍光の比を測定し、前もって準備した較正曲線と比較することにより、対象のプロモーターが不活化された時点を決することが可能です。また、実験中にプロモーターが活性であったか否か、または調節されたか否かを決定することもできます。Fluorescent Timerは様々な細胞系譜または異なる条件下におけるプロモーター活性の調査に有用です。

### プロモーターの変化を *in vivo* で可視化

図2は *C. elegans* のトランスジェニック胚における、熱ショックプロモーター *hsp16-41* の制御下においたFluorescent Timerの様子を示しています（1）。ストレスを与えていない生体では *hsp16-41* の発現は最小に抑えられていますが、熱ショックを与えると、生体中のプロモーター活性が上昇します。標準的な熱ショック処理後、回復期に入ってからわずか2時間後には胚中に緑色の蛍光が観察され、5時間後には赤色の蛍光が検出されました。赤色蛍光は時間経過に伴

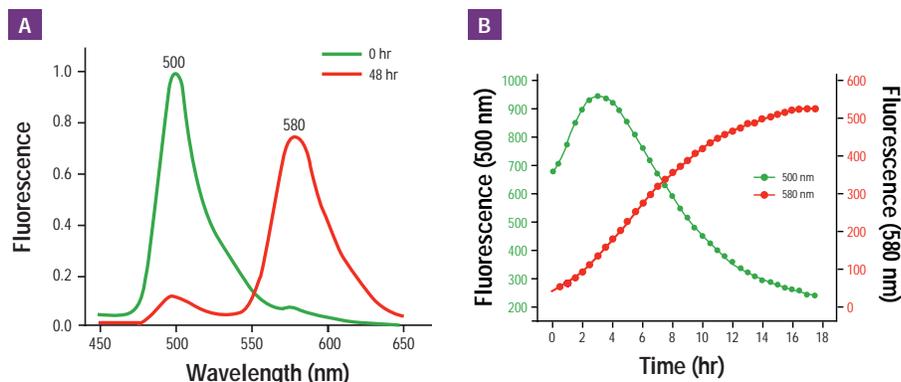


図1. Fluorescent Timerは時間経過に伴い緑色から赤色に変化。パネルA. *E. coli* 一晚培養から新たに単離してすぐの精製Fluorescent Timerタンパク質は500nm (緑色) の蛍光を発しますが、単離から48時間後には580nm (赤色) の蛍光を発するようになります。パネルB. 各時点における緑色および赤色放射の測定値。

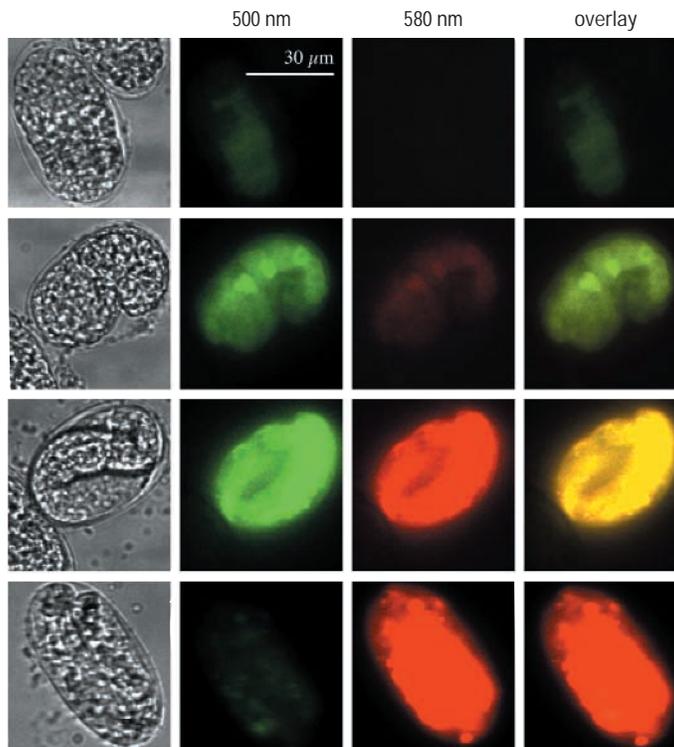


図2. Fluorescent Timerによるプロモーター活性変化の可視化。熱ショックプロモーター *hsp16-41* に融合させたFluorescent Timerを含む *C. elegans* トランスジェニック胚を33 °Cの水浴に浮かべ、熱ショックを与えました。そして、熱ショック後の回復期にプロモーター活性を分析しました。画像はChroma Polychroichビームスプリッター-86100bsフィルターセットを使用して撮影し、MetaMorph Software (Universal Imaging) を用いて解析しました。緑色と赤色の両方の蛍光が存在する場合、2つの色の重なり部分は黄色で表わされています。

# Living Colors™ Fluorescent Timer...continued

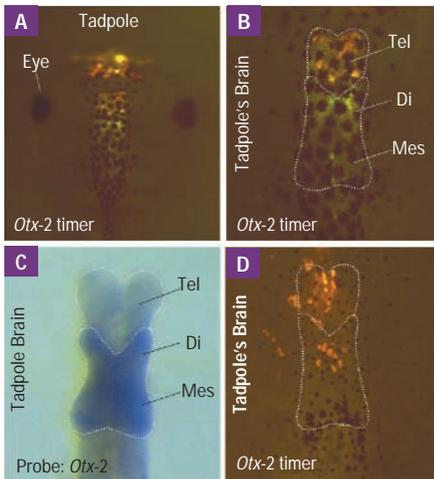


図3. **Fluorescent Timer**は発生過程における標的プロモーターの活性の空間的、時間的変化を明らかにします。8細胞期にある*Xenopus laevis*胚に、*Otx-2*プロモーターの制御下に置いたFluorescent Timer遺伝子を含むプラスミドを微量注入しました。モザイク状の蛍光画像はいくつもの細胞クローンから構成されています。パネルA. 幼生期（頭部全体）における*Otx-2*プロモーター制御Fluorescent Timer発現。パネルB. 幼生期の脳における*Otx-2*プロモーター制御Fluorescent Timer発現。パネルC. *Otx-2*によりプロービングした幼生期脳の*in situ*ハイブリダイゼーション。パネルD. 幼生期の脳における*Xanf-1*-Fluorescent Timerの発現を示す対照実験。

いたタンパク質が成熟するにつれて強度が増加しています。10時間後には赤と緑の両方の蛍光が存在しており、重なり合わせた画像では黄色で表わされています。熱ショックから50時間後までに緑色の蛍光は消失し、プロモーター活性が停止したことがわかります。

## 過去の発生ステージにおけるプロモーター活性を観察

Fluorescent Timerを使用して、*Xenopus laevis*の発生に関与する*Otx-2*プロモーターの活性を追跡しました。*Xenopus*胚において、*Otx-2*は主に脳（終脳および間脳領域を含む）で発現しています（2）。発生が幼生期に進むと、これらの領域における発現はほぼ完全に抑制されますが、中脳領域では強く発現されます。

図3は*Otx-2*プロモーターの制御下に置いたFluorescent Timer遺伝子を含むプラスミドを作製し、それを胚期に微量注入した*Xenopus*の幼生を撮影したものです。この蛍光画像では幼生の終脳から赤色の蛍光が發せられています。これは、*Otx-2*プロモーターがこの領域でいったん活性化されたものの、現在は不活性化されており、蓄積したタンパク質が成熟するだけの時間がすでに経過したことを示しています。対照的に、中脳および間脳からは緑色の蛍光が發せられており、これは写真の時点で*Otx-2*プロモーターがこれらの領域で活性であることを示しています。

対照実験（図3D）では、Fluorescent Timerの発現を別の*Xenopus*遺伝子*Xanf-1*のプロモーター制御下に置いています。この*Xanf-1*も脳で発現されますが、*Otx-2*とは異なり、明確な空間的および時間的範囲を有しておらず、幼生期に入る前に不活性化されます。予想されるように、*Xanf-1*-Fluorescent Timerコンストラクトは幼生の脳において赤色のシグナルを生成しています。

図3Cの*in situ*ハイブリダイゼーション結果は、幼生の中脳および間脳において*Otx-2*が強く発現されていることを示しています。*In situ*ハイブリダイゼーションは蛍光で得られた結果の確認には有用なものの、現在シグナルの見られない領域において過去に発現が生じたか否かを示すことはできず、Fluorescent Timerほどの情報を与えることはできません。

## プロモーターの履歴を蘇らせる

Fluorescent Timerは対象プロモーター活性の空間的および時間的履歴を可視化することにより、プロモーターの分析を助け、発生過程におけるプロモーター活性について貴重な洞察をもたらします。

なお、Fluorescent Timerは以下の2種類の形をご用意しています：pTimerは任意の発現ベクター中のプロモーター下流にFluorescent Timerレポーター遺伝子をクローニングして使用することを意図したソースベクターです。pTimer-1はFluorescent Timerの上流に標的プロモーターを挿入して使用することを意図したプロモーターを持たないベクターです。

品名	サイズ	カタログ番号	価格
pTimer Vector	20 µg	6941-1* <sup>2</sup>	¥99,000
		6941-1A* <sup>1</sup>	¥247,000
pTimer-1 Vector	20 µg	6942-1* <sup>2</sup>	¥99,000
		6942-1A* <sup>1</sup>	¥247,000

\*1 営利施設対象価格です。  
\*2 非営利施設対象価格です。

## 関連製品

1. Terskikh, A., et al. (2000) *Science* **290**:1585–1588.
2. Ermakova, G. V., et al. (1999) *Development* **126**: 4513–4523.

## 特許出願中

## 購入される方へのご注意

本製品の購入に伴い、非営利目的の研究施設および法人には本製品を非商業的、内部的な研究目的で使用できる権利が自動的に許諾されます。営利組織が内部研究目的で使用の場合は、「DsRed」についての研究目的での無料使用およびサイトライセンスに関する同意書（Royalty-Free Research and Site License for DsRed）を弊社ホームページ（[clontech.takara-bio.co.jp](http://clontech.takara-bio.co.jp)）から入手し、署名していただく必要があります。また、本製品を他の目的で使用の場合は、クローンテックと別に使用契約を結ぶ必要があります。詳しくはクローンテックテクニカルサポートまでお問い合わせください。