

細胞標識用の改良型赤色蛍光タンパク質DsRed-Express2の作製と幹細胞における利用

Rita L. Strack^{1,4)}, Daniel E. Strongin^{2,4)}, Dibyendu Bhattacharyya²⁾, Wen Tao³⁾, Allison Berman²⁾, Hal E. Broxmeyer³⁾, Robert J. Keenan¹ & Benjamin S. Glick²⁾

1) Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637, USA

2) Department of Molecular Genetics and Cell Biology, and Institute for Biophysical Dynamics, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637, USA

3) Walther Oncology Center, Indiana University School of Medicine, Indiana 46202, USA

4) These authors contributed equally to this work.

本記事は*Nature Methods* (1)に掲載された記事から引用したものである。

蛍光タンパク質の重要な用途の一つは細胞全体の標識 (whole-cell labeling) である(2)。しかし、特に幹細胞など感受性の高い細胞で既存の赤色蛍光タンパク質を長期間発現させることには限界があるというデータもある(3)。そのため、我々は細胞標識用の改良型赤色蛍光タンパク質、**DsRed-Express2**を遺伝子組換え技術によって作製した。

細胞標識には強力なプロモーターが一般的に用いられるため、高レベルの蛍光タンパク質を含む細胞がうまく増殖できなかつたり、蛍光タンパク質マーカーが不安定になったりすることがある(3, 4)。

増大した溶解性

細胞毒性の主な要因は過度な凝集である(3)。そのため、我々は凝集の少ない赤色蛍光タンパク質(RFP)を開発することにした。DsRed-Expressは発色団形成(maturation)が速く蛍光安定性が高いため、それを出発材料として選び、凝集を軽減するためにそのタンパク質表面に変異を導入した(表1; 1)。

表1. DsRed変異体 (variants) の蛍光特性

赤色蛍光タンパク質変異体	励起/蛍光極大波長 (nm)	吸光係数	蛍光量子収率	相対輝度 (%WT DsRed) ^a	発色団形成の $t_{0.5}$ (hr)	退色の $t_{0.5}$ (sec) ^b
DsRed-Express2	554 / 591	35,600	0.42	0.41	0.7	64 ± 4
DsRed-Express	554 / 586	33,800	0.44	0.41	0.6	71 ± 3
TagRFP	554 / 582	77,000	0.47	0.98	1.5	8 ± 4
TurboRFP ^c	550 / 573	n.d. ^e	n.d. ^e	n.d. ^e	1.5	32 ± 1
WT DsRed ^d	558 / 583	51,500	0.71	1	11	n.d.

a: 輝度 (brightness) は吸光係数と量子収率の積として計算し、野生型 (WT) DsRedの値を1として相対化した。

b: 広視野照明における退色 (photobleaching) の半減時間 ($t_{0.5}$) は、3つ実験における平均値±標準誤差として示した。

c: TurboRFPは溶解性が低いため測定ができず、このタンパク質の輝度は計算できなかった。

d: WT DsRedの発色団形成速度は参考文献6から引用した。in vivoでのWT DsRedの退色は、発色団形成が遅いため、高い信頼度で測定することは不可能と思われる。

e: n.d.=測定不可

次に、新たに創製したDsRed-Express2の凝集軽減を大腸菌でのアッセイによって確認した(5)。もとのDsRed-Expressの場合では、組換えタンパク質の50%以上が不溶性であった。しかし、DsRed-Express2の大部分は大腸菌抽出液の可溶性画分に存在し、単量体enhanced GFP (mEGFP;図1)と同様な溶解性を示した。

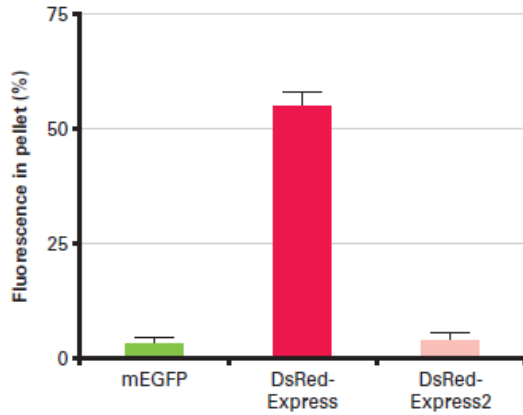


図1. DsRed-Express2は溶解性が高い

各蛍光タンパク質を発現している大腸菌を溶解し、遠心した。各大腸菌ライセートのペレット中の蛍光%を8連で測定した。ペレット中の蛍光%が高いものは、組換えタンパク質の溶解性が低いことを示している。mEGFP由来のシグナルは本アッセイのバックグラウンドを示している。

優れた細胞生存能

凝集の減少によって細胞毒性が予想通り減少していることを確認するために、HeLa細胞にDsRed-Express2、mEGFP、または他のRFPを一過性にトランスフェクトし、フローサイトメトリーによって発現を測定した。DsRed-Express2は青色および緑色レーザーで効率よく励起されるため、フローサイトメトリーによる測定に特に適している。

DsRed-Express2は、テストした他のどのRFP（赤色蛍光タンパク質）よりもはるかに優れていた。すなわち、DsRed-Express2を発現している細胞はほとんど一定の蛍光を保持し、mEGFPに匹敵するものであった。また、高発現している細胞が長時間にわたって生存を維持した(図2)。

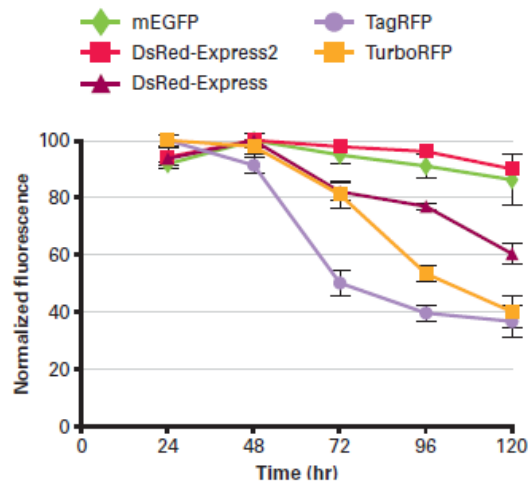


図2. DsRed-Express2は低毒性である

図に示す蛍光タンパク質を構成的に高発現させるために、HeLa細胞を一過性にトランスフェクトした。各蛍光タンパク質を3つのウェルでフローサイトメトリーにより毎日測定した。各蛍光タンパク質で得られた最大のシグナルを100ユニットと定義した。mEGFPおよびDsRed-Express2の場合では、細胞内の蛍光の平均値は24~120時間までほとんど一定であった。他のRFPの場合では、高発現する細胞が優先的に死滅したため、蛍光の平均値は時間の経過とともに減少した。

次に我々は、クロンテックのLenti-X™ Expression Systemを用いて安定発現細胞株を作製し、DsRed-Express2の性能を調べた。まず、同じ力価の組換えレンチウイルスを用いて、DsRed-Express2、mEGFP、または他のRFP遺伝子をHeLa細胞に導入した。培養の3日後および10日後に、蛍光タンパク質を発現している生存細胞をフローサイトメトリーで測定した。DsRed-Express2の場合では、他のどのRFPよりも蛍光シグナル/バックグラウンドの比率が高く、mEGFPに匹敵するものであった(図3)。平均蛍光強度は、mEGFPおよびDsRed-Express2の場合では10日後もほとんど変わらなかったが、他のRFPの場合ではかなり減少した。おそらくRFPを高発現している細胞が優先的に死滅したためであろうと思われる。かなり早い時点(3日目)で、TagRFPまたはTurboRFPを発現している細胞が相対的に減少していることを認めており、おそらく発現の初期の過程で細胞毒性が現れた結果であろうと思われる。

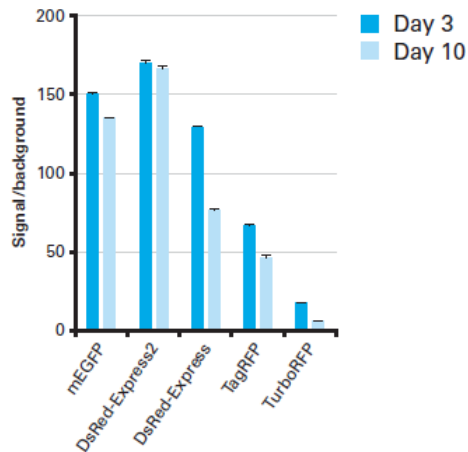


図3. レンチウイルスによる遺伝子導入後、DsRed-Express2は細胞毒性を示さない
 図に示す蛍光タンパク質をコードする、あるいはそれらをコードしないレンチウイルス(クロンテック社)をHeLa細胞に感染させた。感染の3日および10日後に、各蛍光タンパク質を3つのウェルでフローサイトメトリーにより分析した。生細胞に由来する蛍光を488 nmレーザーとFITCフィルターのセット(mEGFPの場合)または543 nmレーザーとPEフィルターのセット(RFPの場合)を用いて検出した。コントロールレンチウイルスのバックグラウンドに対する蛍光シグナルの相対平均値をプロットした。エラーバーは平均値の標準誤差(s.e.m.)を示す。

幹細胞での使用

蛍光タンパク質の細胞毒性が実験を妨げるという報告(3)があったため、我々はDsRed-Express2を幹細胞に導入して試験を行った。DsRed-Express、DsRed-Express2またはEGFPを発現するレンチウイルスをマウス骨髄細胞に感染させてそれらの遺伝子を導入した。87時間後、蛍光を発する生細胞をフローサイトメトリーで回収し、それぞれ20,000個の細胞から培養を開始した(0日)。各培養液について、3日、6日、10日後に、細胞総数と蛍光を発する細胞の数を測定した。0日では、DsRed-Express2を含む細胞は、DsRed-Expressを含む細胞よりも豊富に存在し、輝度も平均して2倍高かった(図4)。

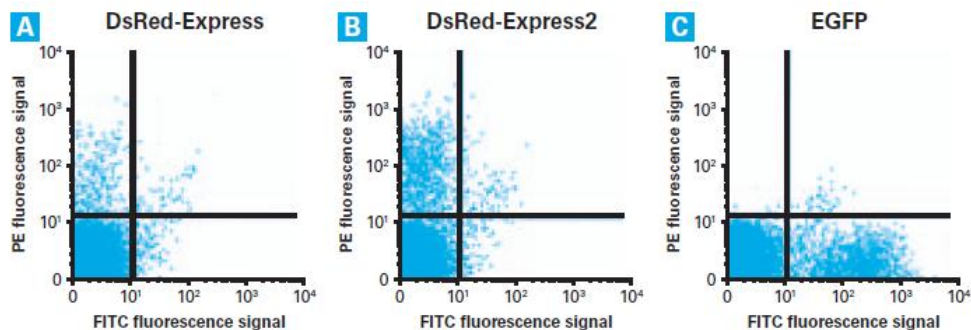


図4. マウス造血幹細胞および前駆細胞におけるDsRed-Express2の発現

DsRed-Express(パネルA)、DsRed-Express2(パネルB)またはEGFP(パネルC)をコードするレンチウイルスを用いて単核骨髄細胞にそれぞれの遺伝子を導入した。蛍光を発する細胞を87時間後に分取した。赤色および緑色蛍光シグナルをそれぞれPEおよびFITCフィルターセットを用いて検出した。図中のラインは、遺伝子導入しなかった細胞の分析によって規定されたゲートを表す。

DsRed-Express2を含む細胞は、EGFPを含む細胞と同程度まで増殖したが、DsRed-Expressを含む細胞はあまり増殖しなかった（図5）。これらのデータはHeLa細胞を用いた場合で得られた結果（図2）と類似している。DsRed-Express2は幹細胞を含む種々の細胞種で毒性が低い、と我々は結論している。

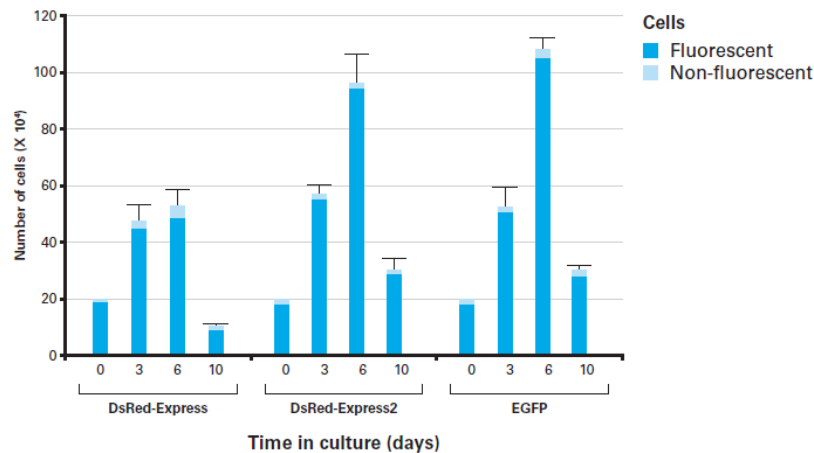


図5. DsRed-Express2を発現するマウス骨髄造血幹細胞および前駆細胞の増殖

分取した細胞（図4）を造血幹細胞の保存と増殖に適した条件で培養した。3日、6日、10日後に、これらの培養液をフローサイトメトリーで分析した。各時点で、3つのウェルを分析した。エラーバーは標準偏差を表す（s.d.）。10日目の細胞総数の減少は蛍光タンパク質に関連するものではなく、*in vitro* 細胞培養条件で常に観察される細胞の老化によるものである（3）。

トランスジェニック研究および移植研究への利用の可能性

DsRed-Express2はトランスジェニック生物でもおそらく十分に利用できるであろう。他のRFP（赤色蛍光タンパク質）は蛍光タンパク質を発現する動物の作製にすでに使用されているが（7~9）、それらの研究では、蛍光タンパク質の細胞毒性が高いため、導入遺伝子の発現レベルは比較的低いであろうと我々は推測している。DsRed-Express2は、強力で安定な蛍光を発する健康なトランスジェニック生物の作製に役立つであろう。蛍光を発する細胞を宿主動物に移植する場合（10）でも、同様な改善が期待できる。

細胞標識用の理想的な赤色蛍光タンパク質

DsRed-Express2は哺乳類細胞と同様に細菌でも十分に利用できる。DsRed-Express2を構成的に発現する大腸菌で、細胞毒性がないことが示されている（1）。DsRed-Express2は、発色団形成が速く蛍光安定性が高いというDsRed-Expressの利点と、細菌および哺乳類細胞で強力かつ安定に発現し細胞毒性および光毒性が低いという利点を兼ね備えている。したがって、DsRed-Express2は、細胞標識、*in vivo* 移植、トランスジェニック動物、および幹細胞研究などの繊細な用途に使用できる優れた赤色蛍光タンパク質であるといえる。

参考文献

1. Strack, R. L. *et al.* (2008) *Nature Meth.* **5**(11):955–957.
2. Shaner, N. C. *et al.* (2007) *J. Cell Sci.* **120**(Pt. 24):4247–4260.
3. Tao, W. *et al.* (2007) *Stem Cells* **25**(3):670–678.
4. Hadjantonakis, A. K. *et al.* (2002) *BMC Biotechnol.* **2**:11.
5. Bevis, B. J. & Glick, B. S. (2002) *Nature Biotechnol.* **20**(1):83–87. Erratum in *Nature Biotechnol.* (2002) **20**(11):1159.
6. Merzlyak, E. M. *et al.* (2007) *Nature Meth.* **4**(9):555–557.
7. Shcherbo, D. *et al.* (2007) *Nature Meth.* **4**(9):741–746.
8. Barolo, S. *et al.* (2004) *Biotechniques* **36**(3):436–440, 442.
9. De Gasperi, R. *et al.* (2008) *Genesis* **46**(6):308–317.
10. Hoff man, R. M. (2005) *Nature Rev. Cancer* **5**(10):796–806.

製品ガイド

- ▶ DsRed-Express & DsRed-Express2 蛍光タンパク質ベクター