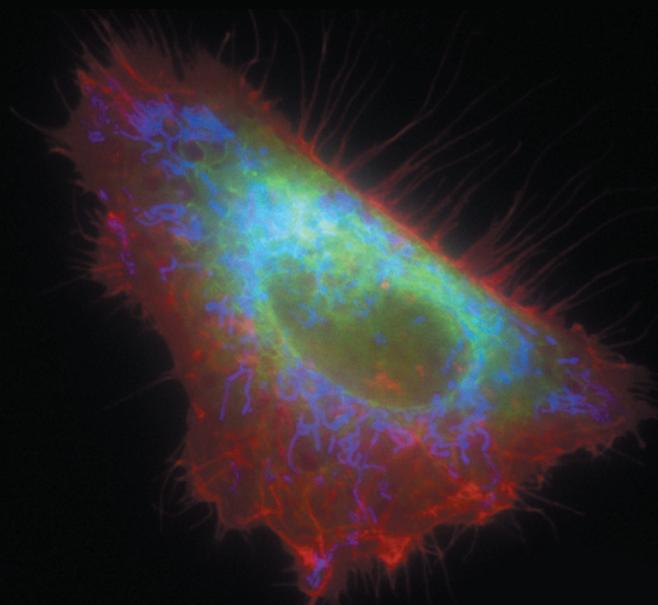


蛍光タンパク質製品 総合カタログ

多彩な蛍光タンパク質ツールにより広がる解析の可能性



- Fluoppi <新しいタンパク質間相互作用解析ツール> P.3
- CoralHue™ Fluo-chase Kit P.8
- pMitophagy Keima-Red mPark2 <マイトファジーモニタリングツール> . . P.9
- Fucci <細胞周期モニタリングツール> P.10
- 蛍光タンパク質抗体 P.11

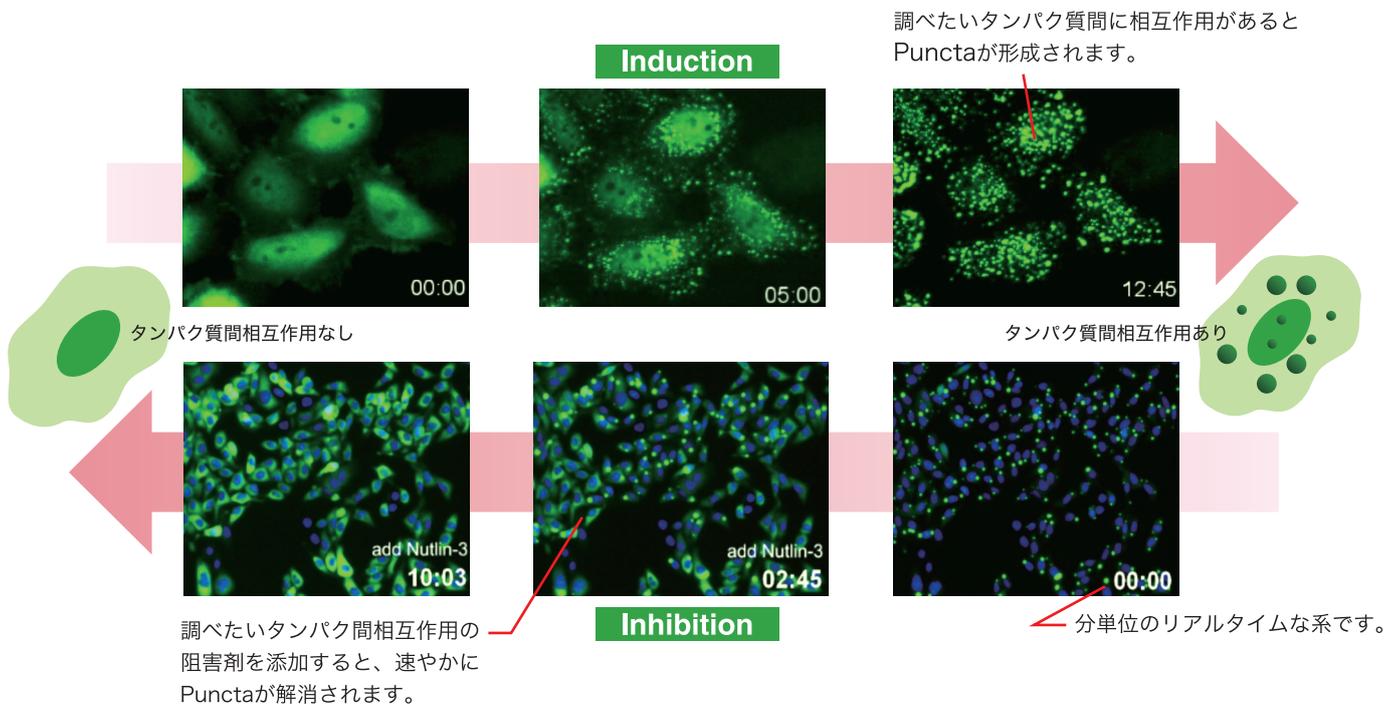
Fluoppi

新しいタンパク質間相互作用のツール

- ◎ 生きた細胞で、リアルタイムなタンパク質間相互作用を観察できます。
- ◎ 従来法に比べ、系の構築が簡単です。
- ◎ 反応が可逆的で阻害剤のスクリーニングに最適です。

Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions) (フロッピー) は、生きた細胞内でタンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) を測定するための新しい基盤技術です。Fluoppiは全く別の視点から蛍光タンパク質を利用した技術であり、PPIを細胞内の蛍光輝点 (Puncta) として検出します。PPIの存在を示すPunctaはPPIが発生した場所で直ちに形成され、PPIの解離とともに分散します。Fluoppiの最大の特徴は系の構築が簡便であり、また、得られるシグナルが明瞭である点です。

PPI研究の新しいツール、Fluoppiをご活用ください。



Fluoppi製品リスト

蛍光タンパク質	Code No.	製品名	包装
Monti-Red (赤色)	AM-8012M	Fluoppi Ver.2 : Ash-Red (Ash-MNL/MCL + Monti-Red-MNL/MCL)	10 µg each
	AM-VS0802M	Monti-Red for Fluoppi (pMonti-Red-MNL/MCL)	10 µg each
Azami-Green (緑色)	AM-8011M	Fluoppi Ver.2 : Ash-hAG (Ash-MNL/MCL + hAG-MNL/MCL)	10 µg each
	AM-8201M	Fluoppi : Ash-hAG [p53-MDM2]	10 µg each
	AM-8202M	Fluoppi : Ash-hAG [mTOR-FKBP12]	10 µg each
	AM-VS0801M	humanized Azami-Green for Fluoppi (phAG-MNL/MCL)	10 µg each

注1) 本製品は、すべてのタンパク質間相互作用の検出を保障するものではありません。

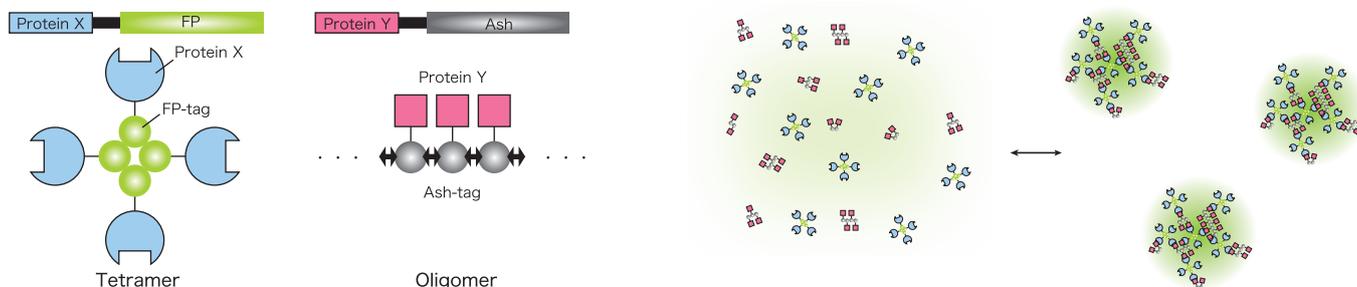
注2) 営利機関でのご使用には、使用目的 (研究開発または商業利用) に関わらず、ライセンス契約が必要です。

注3) 本製品に使われている蛍光タンパク質 hAzami-Green と Monti-Red は、蛍光特性など諸性質に関して違いがあります。

同じ実験系で使用しても IC₅₀ など、Punctaの形成に違いが出る可能性があります。

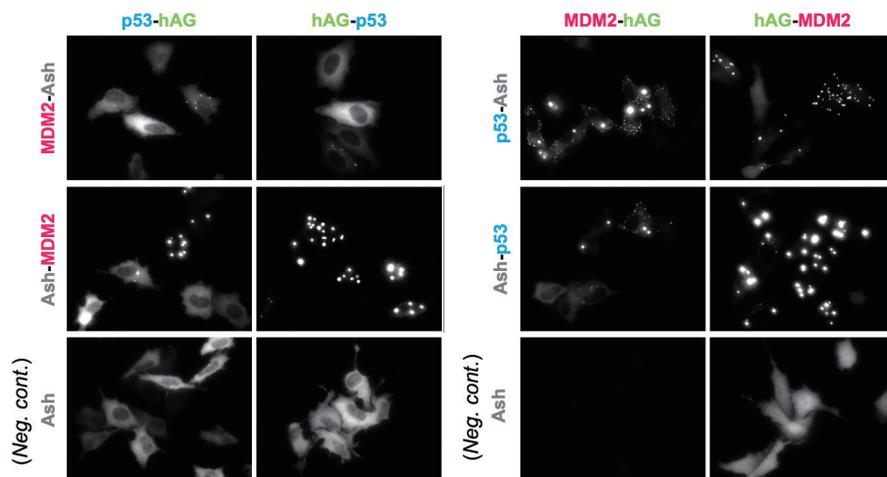
Fluoppiの原理

FluoppiはTag-technologyです。4量体形成能を有する蛍光タンパク質（FP-tag）と、多量体形成能を有する Assembly Helper Tag（Ash-tag）から構成されます。蛍光相関分光法による測定で、Ash-tagは希薄溶液中において平均的に4から8量体を形成することがわかっています。それぞれのtagに相互作用を検出したいタンパク質XとYを遺伝的に融合します。タンパク質XとYの相互作用が無い場合、両者は分散して存在します。XとYが相互作用すると、Fluoppiのtagを融合したタンパク質同士が局所的に集まります。tagの一方は蛍光タンパク質の為、顕微鏡下では蛍光性の輝点（Puncta）として観察されます。

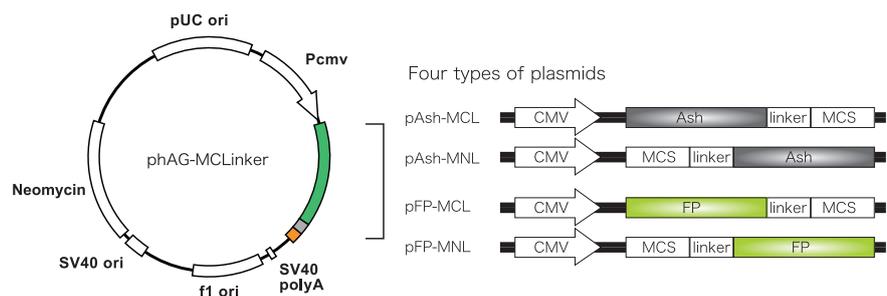


実験系の構築

Fluoppiの系を構築するためにはまず、タンパク質X/Yに各tagを融合したプラスミドを作製します。最適な組み合わせを選択するために、融合位置（N・C末端）と融合するtag（FP-tag or Ash-tag）の違いにより、合計で8通りのプラスミドを作製することをお勧めします。次に、作製したプラスミドをtransfectionし、蛍光顕微鏡下で観察します。タンパク質X/Yが発現と同時に相互作用する場合、蛍光性のPunctaが観察されます。このPunctaはタンパク質間相互作用阻害剤等により、解離させることができます。一方、タンパク質X/Yが相互作用しない場合、蛍光は分散した状態で観察されます。種々の刺激によりタンパク質X/Yが相互作用すると、Punctaが形成されます。



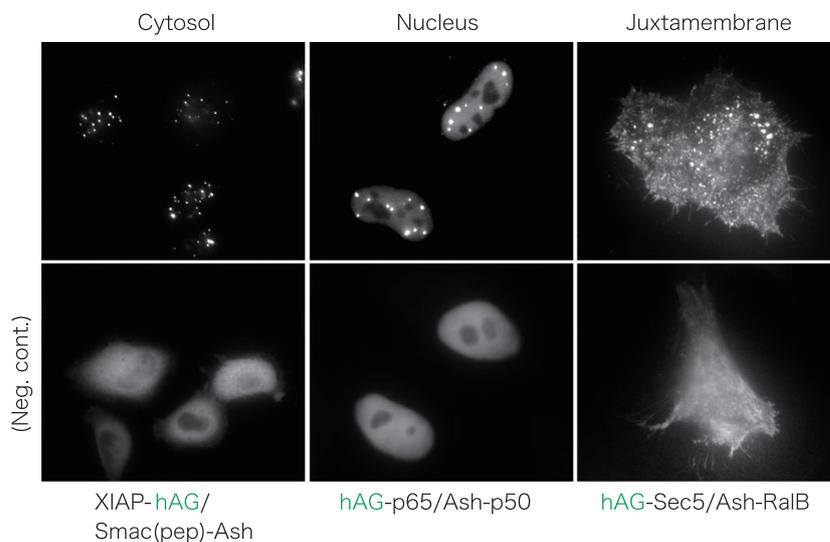
p53-MDM2の相互作用について、全てのバリエーションを検査しました。FP-tagにはhAG (humanized Azami Green)を使用しました。上段と中段の写真は8通りの組み合わせの検討結果、下段は、ネガティブコントロールとしてAsh-tagのみをco-transfectionした結果です。この様に、様々な蛍光パターンが得られることがあるため、全ての組み合わせを試し、最適な組み合わせを選択することをお勧めします。これまで検討したPPIでは8通りを検討するだけで多くの場合でPPIを検出できています。



Code No. AM-8011M (FP-tag=hAG)、AM-8012M (FP-tag=Moti-Red)の製品は、左図のベクター4つがセットとなっています。

細胞内局在

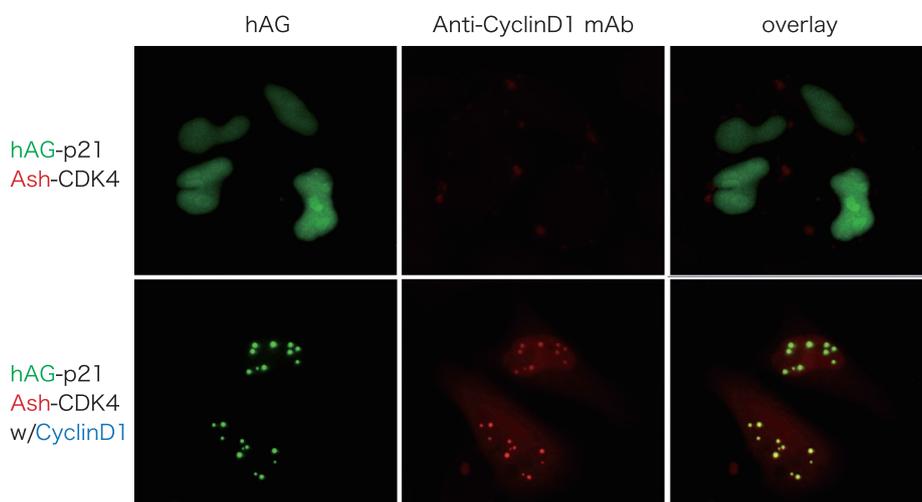
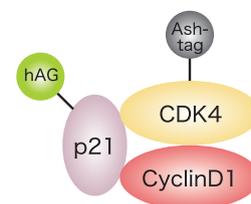
FP-tag、Ash-tag 自身は、細胞内の特定の領域に局在しません。このため、Fluoppi は複数の細胞内領域において、タンパク質間相互作用を検出することができます。写真は、細胞質内・核内・細胞膜近傍それぞれに局在するタンパク質に Fluoppi を適用した例です。(FP-tag=hAG)



複数のタンパク質複合体でのPPIの検討

p21 (CIP1/WAF1) タンパク質は、CyclinD1-CDK4複合体と相互作用することで、G₁期における細胞周期進行の調節因子として機能することが知られています。

今回の実験では、p21 に hAG、CDK4 に Ash-tag を融合してPunctaの形成を観察しました(写真上段)。その結果、Punctaの形成が確認されませんでした。次に、Cyclin D1 を細胞に co-transfect し同様の実験系を観察しました(写真下段)。その結果、Punctaの形成を確認しAnti-Cyclin D1 mAbの染色像がFociに重なっていることが観察されました。この結果は、p21-CDK4のPPIに、Cyclin D1が必要であることを示しており、Punctaの形成においても、ある程度自然なタンパク質の機能や結合様式が保持される可能性を示唆しています。

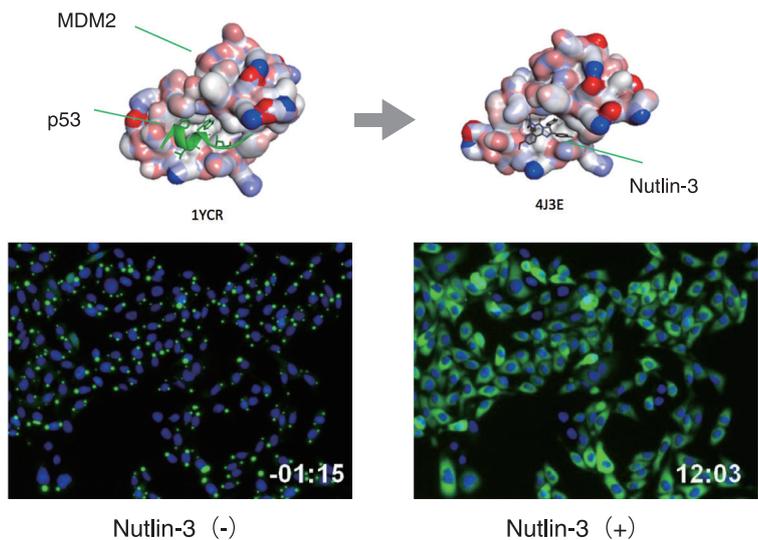


p53-MDM2相互作用に対するPPI inhibitorの検出

p53-MDM2 はタンパク質間相互作用阻害剤 (PPI inhibitor) の分野でよく知られた創薬ターゲットです。種々のがんではMDM2の発現量が高く、p53によるアポトーシスの誘導を阻害していることが知られています。

ここではp53-MDM2をFluoppiに適用し、まず、最適な組み合わせを8通りから選択し、G418とHygromycinを用いてCHO-K1安定発現株を作製しました。写真はNutlin-3 (20 μM) 添加後、継続的にFociが消失する様子を示します。数分でFociが解離する様子が観察されました。

写真右下の時間は、分：秒を示します。



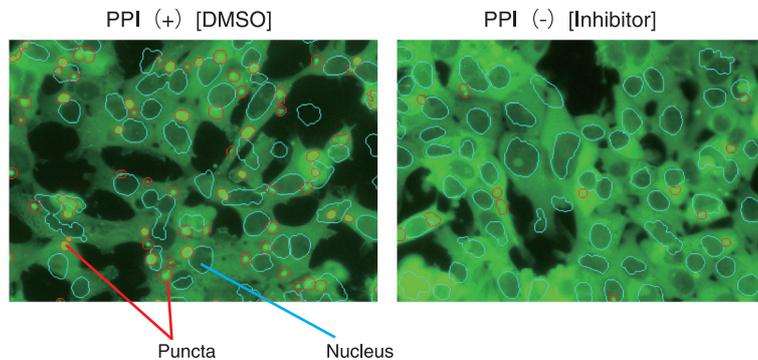
● PPIシグナルの数値化

Punctaの形成や消失を数値的なデータにする方法は複数あります。弊社では、IN Cell Analyzer (GE Healthcare) やオープンソースの画像解析プラットフォーム icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) の Spot Detector プログラムを使用して定量化を行った実績があります。

画像解析においては、まず細胞内の核と、Fociを別々にセグメンテーションします。Punctaに関しては、まずSpot内の蛍光強度を算出し、積算します(写真左)。

阻害剤などの効果により、Punctaが消失した場合、Punctaは検出されないため、蛍光強度の数値は0に近くなります(写真右)。

最後に、蛍光強度を核の数で割ると、1細胞あたりのFociの蛍光強度を算出することができます。



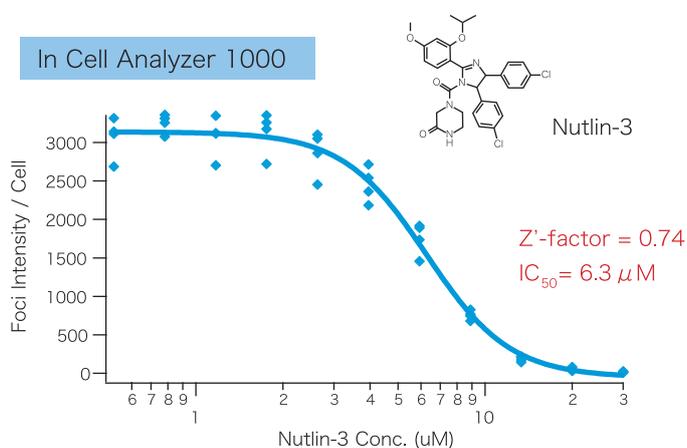
$$\text{PPI signal} = \frac{\text{Fluorescence intensity of Puncta}}{\text{Number of nucleus}}$$

● データ解析

p53-MDM2の系におけるデータ解析の一例です。横軸をNutlin-3の濃度とし、蛍光強度が50%になる濃度IC₅₀を算出しました。

その結果、IC₅₀は文献報告値と同程度の6.3 μM、HTSへの適用可否の指標となるZ'-factorも0.74と良好な値が得られています。

また、ここには示していませんが、Nutlin-3添加後のインキュベーション時間を変動させIC₅₀の値がどのように変化するか調べることで、薬剤の細胞膜浸透時間等を検討することができます。これは、Fluoppiが高分子化合物の細胞膜浸透時間などを評価するための有効なツールになり得る事を示唆しています。



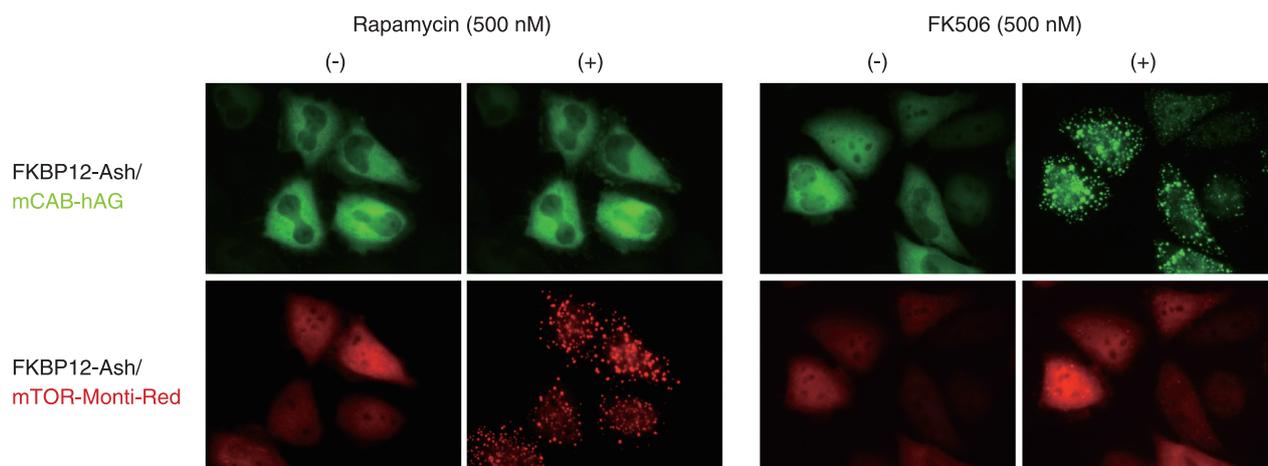
複数の蛍光タンパク質を用いたマルチカラー化の検討

FKBP12は、Rapamycinを介してmTOR (FRB)と結合します。また、FK506を介しCalcineurinと結合することが知られています。

本検討は、FKBP12-Ash-tag、mTOR (FRB)-Monti-Red、mCAB (the BBH region of Calcineurin A (residues 340–394) fused to Calcineurin B^{*})-hAGベクターを同時に細胞にトランスフェクションし、Rapamycin、FK506を培地中に添加してPunctaが形成されるか実験した結果です。その結果、Rapamycinを培地中に添加するとFKBP12とmTORの結合が赤色のPunctaで観察され、FK506の添加でFKBP12とmCABの結合が緑色のPunctaで観察されました。

本検討は、厳密に薬剤で結合を制御できる系での実験であり、すぐに他の系に応用できるものではありませんが、複数のタンパク質complexに関して、どのタンパク質が結合しているのかマルチカラー化によって同時に可視化できる可能性を示唆しています。

※ 引用文献：P. A. Clemons *et al.* Chem. Biol. (2002)



使用文献

- 1) Koyano, F. *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162-6 (2014) [PMID: 24784582]
- 2) Yamano, K. *et al.* Site-specific interaction mapping of phosphorylated ubiquitin to uncover parkin activation. *J Biol Chem.* 290, 25199-211 (2015) [PMID: 26260794]
- 3) Asamitsu, K. *et al.* Quantification of the HIV transcriptional activator complex in live cells by image-based protein-protein interaction analysis. *Genes Cells.* 21, 706-16 (2016) [PMID: 27193293]
- 4) Watanabe, T. *et al.* Genetic visualization of protein interactions harnessing liquid phase transitions. *Sci Rep.* 7, Article number: 46380 (2017) [PMID: 28406179]

● 参考文献

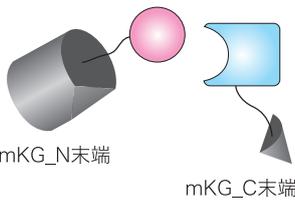
- 1) Saio, T. *et al.* PCS-based structure determination of protein-protein complexes. *J Biomol NMR* 46, 271-80 (2010) [PMID: 20300805]
- 2) Banaszynski, L.A. *et al.* Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *J Am Chem Soc.* 127, 4715-21 (2005) [PMID: 15796538]
- 3) Vassilev, L.T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-8 (2004) [PMID: 14704432]

CoralHue™ Fluo-chase Kit

CoralHue™ Fluo-chase Kitは、monomeric Kusabira-Green (mKG) をレポーター分子として利用した、タンパク質間相互作用検出キットです。本Kitを用いると、哺乳動物細胞内で24時間以内に、多くのタンパク質間相互作用を、蛍光シグナルとして検出することが出来ます。近年、タンパク質間相互作用解析は、創薬ターゲットの探索をはじめ、さまざまな視点で注目されています。本Kitでは、予め2つに分割したmKGの遺伝子に、評価したいタンパク質の遺伝子をそれぞれ融合することにより、容易に評価系を作成することができます。目的タンパク質同士が相互作用すると、分割したmKGの断片が近接により再構成され蛍光能を回復し、相互作用を蛍光シグナルとして検出することが出来ます。

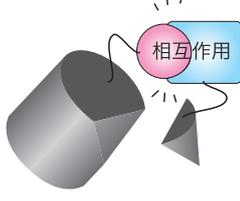
原理

目的のタンパク質が相互作用していない



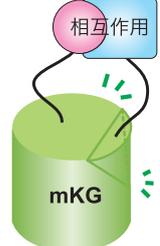
mKG_N末端
mKG_C末端

タンパク質相互作用により、mKG断片が近接する

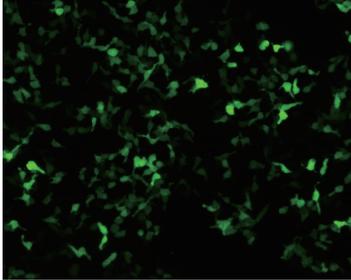


相互作用

近接したmKG断片が再構成され、蛍光を発する



相互作用
mKG

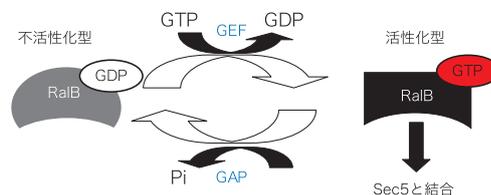


NF- κ B 構成分子 p50 の部分配列と p65 の部分配列の相互作用を Fluo-chase Kit を用いて可視化しました(HEK293T 細胞)

Fluo-Chase Kitを用いたRalB-Sec5との相互作用の検出

RalBとは、低分子量Gタンパク質のRas familyに属するタンパク質で、Ral sub familyにはRalA、RalBが属しています。活性型であるGTP結合型のRalBは、exocyst複合体の構成因子であるSec5と直接結合し、エクソサイトーシスや膜のモデリング、極性輸送に関与することが明らかになっている分子です。

RalBの活性調節機構

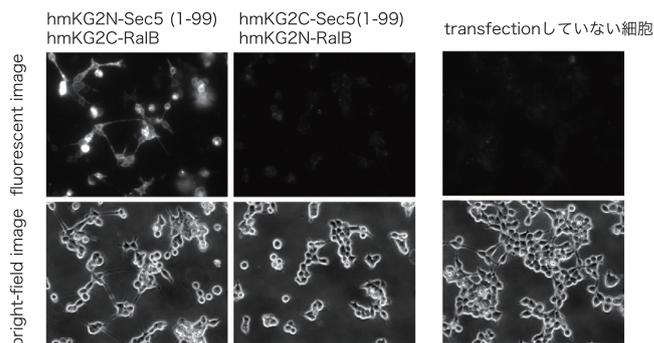


● RalBとSec5が相互作用する位置の検討

Fluo-Chase Kitの原理であるProtein Complementation法では、分割したタンパク質、つまりmKG-N末端、mKG-C末端同士が、目的タンパク質の相互作用依存的に再構成できる“位置”にあることが重要です。

今回、RalB、Sec5のmKG断片融合ベクターを構築するにあたり、すでに結晶構造が明らかとなっているRalA-Sec5を参考にしました。結晶構造から、RalAのN末端とSec5のN末端が近接していることから、RalBのN末端にmKG-N末端あるいはC末端を、同様にsec5(1-99)のN末端にmKG-N末端あるいはC末端を融合し、以下の二通りの組み合わせを検討しました。

- ① RalB-mKG-C末端/Sec5-mKG-N末端
- ② RalB-mKG-N末端/Sec5-mKG-C末端



<結果>

① RalB-mKG-C末端/Sec5-mKG-N末端では、mKG由来のシグナルが観察されました。一方、② RalB-mKG-N末端/Sec5-mKG-C末端では、ほとんどシグナルがなく、③のHEK293T細胞の自家蛍光と同じレベルでした。

Code No.	製品名	包装
AM-1100M	CoralHue™ Fluo-chase Kit	1 system

pMitophagy Keima-Red mPark2

本製品は蛍光タンパク質 Keima-Red（単量体、蛍光ピークは616 nm）のミトコンドリア標識用プラスミドです。ミトコンドリア局在シグナルペプチド配列を付加した Keima-Red と、マイトファジーの実行において重要な役割を果たす Parkin（ユビキチンリガーゼ）を目的の細胞に強制発現させ、薬剤処理等の前後での励起波長の変化により、マイトファジーを検出・可視化しました。

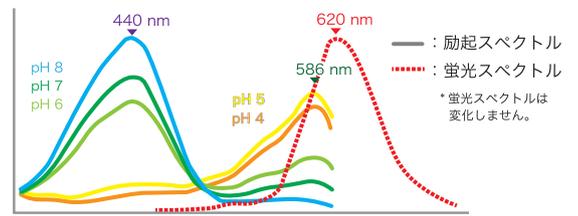
マイトファジー活性モニタリング原理

周辺pHで変化する両励起の蛍光強度比でモニタリング

Mitophagy（ミトコンドリア選択的オートファジー）は神経変性疾患、がん、心疾患などとの関係が指摘され、基礎から創薬までの幅広い分野において研究対象となっています。当社が理化学研究所と共同開発した蛍光タンパク質：Keima-Red を用い、この mitophagy 活性をモニタリング出来ることが報告されています。

Keima-Red とは

コモンサンゴ (*Montipora. sp*) よりクローニングされ、変異導入により作製された蛍光タンパク質です。大きなストークスシフト (励起ピークと蛍光ピークの差) が最大の特長です。周辺 pH により励起スペクトルが変化し、この性質がマイトファジーのモニタリングに利用されます。

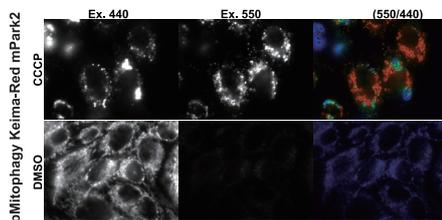
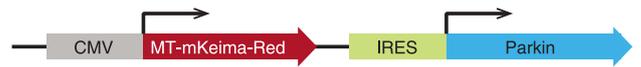


- 1) Katayama, H. *et al.* Chemistry & Biology 18, 1042-1052 (2011) [PMID: 21867919]
- 2) Choubey, V. *et al.* BECN1 is involved in the initiation of mitophagy: It facilitates PARK2 translocation to mitochondria. Autophagy 10, 1105-19 (2014) [PMID: 24879156]
- 3) Safiulina, D. & Kaasik, A. Energetic and Dynamic: How Mitochondria Meet Neuronal Energy Demands. PLoS Biol 11, e1001755 (2013) [PMID: 24391475]
- 4) Togashi, K. *et al.* Na⁺/H⁺ Exchangers Induce Autophagy in Neurons and Inhibit Polyglutamine-Induced Aggregate Formation. PLoS ONE 8, e81313 (2013) [PMID: 24278418]
- 5) Narendra, DP. *et al.* PINK1 rendered temperature sensitive by disease-associated and engineered mutations. Hum Mol Genet. 22, 2572-89. (2013) [PMID: 23459931]
- 6) Bingol, B. *et al.* The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. Nature 510, 370-5 (2014) [PMID: 24896179]

従来品との違い

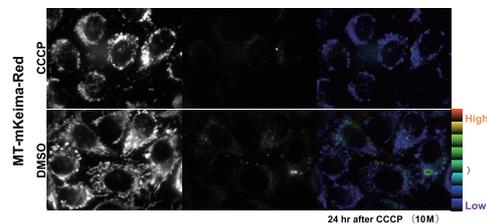
単一コンストラクトで Keima と Parkin を発現

これまで Keima-Red と別の発現コンストラクトとして共導入されてきた Parkin (Park2) を、IRES 制御下において単一のコンストラクトからバイシストロニックに発現するようにしました。これにより手法が簡便化され、イメージング解析及び定量解析の利便性が向上しました。また、IN Cell Analyzer を用いた HCA (High content analysis) においても本系が使用可能であることを確認しています。



■ Ratio イメージング

Ratio (550/440) は、Ex. 550/ Ex. 440 比の高 (オレンジ) 低 (紫) を示します。Ratio が高いほど、マイトファジーが亢進しています。



CCCP: Mitophagy 誘導剤 (脱分極剤)、DMSO: コントロール
Ex. 440: 440 nm の励起光で得られた蛍光画像
Ex. 550: 550 nm の励起光で得られた蛍光画像

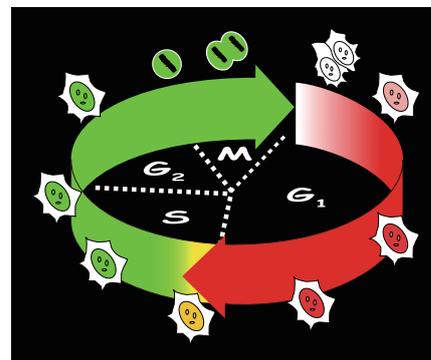
製品リスト

Code No.	製品名	包装
AM-V0259M	pMitophagy Keima-Red mPark2 (Kan)	20 μ g
AM-V0259HM	pMitophagy Keima-Red mPark2 (Hyg)	20 μ g
AM-V0251M	CoralHue™ Mitochondria-targeted monomeric Keima-Red (Kan)	20 μ g
AM-V0251HM	CoralHue™ Mitochondria-targeted monomeric Keima-Red (Hyg)	20 μ g

Fucci

(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)

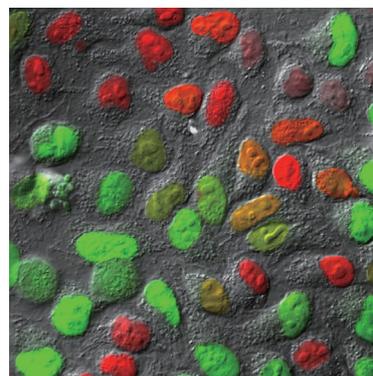
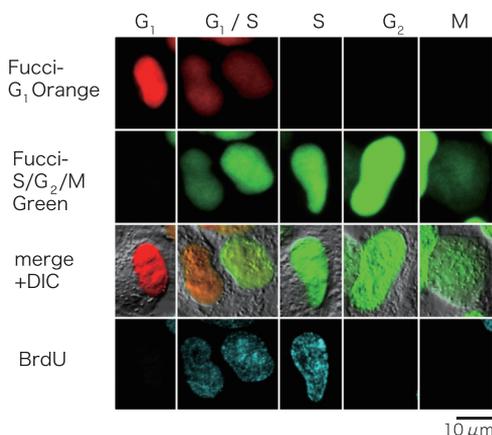
- ◎ 細胞周期の進行を "リアルタイム" に観察できる蛍光プローブです。
- ◎ 純国産蛍光タンパク質である緑色 mAG1 とオレンジ色 mKO2 を用いています。
- ◎ S/G₂/M 期特異的に細胞のシルエットを描出する pFucci-S/G₂/M Green(N+C) も取り揃えております。



Fucciとは

Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator: フーチ) は、生細胞の細胞周期の進行を“リアルタイム”に観察することが出来る蛍光プローブです。Fucciは、細胞周期の特定の時期にのみ存在する Geminin と Cdt1 という2つのタンパク質に、それぞれ緑色 (monomeric Azami-Green1: mAG1) とオレンジ色 (monomeric Kusabira-Orange2: mKO2) の蛍光タンパク質を融合して細胞周期を可視化できるようにしたプローブです。これらを細胞に導入すると、S/G₂/M 期に緑色、G₁ 期にオレンジ色の蛍光が核に観察されます。Geminin はS/G₂/M 期に増加し、G₁ 期には存在しません。一方 Cdt1 はG₁ 期に増加し、S/G₂/M 期には存在しません。このような細胞周期依存的なタンパク質の調節は、ユビキチンプロテアソーム系と呼ばれる選択的なタンパク質分解反応により厳密に制御されています。このシステムを利用したのがFucciです。Fucciは、細胞周期を可視化するためのツールであり、個体の発生、分化、再生、がん化など、細胞周期と関連する生命現象を解明するのに有効です。

■ Fucci 安定発現細胞株が示す細胞周期と蛍光発色パターン ■ Fucci 安定発現細胞株 (HeLa細胞)



資料提供： 独立行政法人 科学技術振興機構 ERATO 宮脇生命時空間情報プロジェクト
独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム
阪上-沢野 朝子 先生、宮脇 敦史 先生

製品リスト

Code No.	製品名	包装
AM-V9001M	pFucci-G ₁ Orange (Cloning vector)	20 μg
AM-V9003M	pFucci-G ₁ Orange (Expression vector)	20 μg
AM-V9010M	pFucci-S/G ₂ /M Green-Hyg (Expression vector)	20 μg
AM-V9014M	pFucci-S/G ₂ /M Green (Cloning vector)	20 μg
AM-V9016M	pFucci-S/G ₂ /M Green (Expression vector)	20 μg
AM-V9030M	pFucci-S/G ₂ /M Green(N+C)-Hyg (Expression vector)	20 μg
AM-V9034M	pFucci-S/G ₂ /M Green(N+C) (Cloning vector)	20 μg

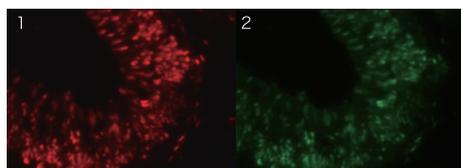
蛍光タンパク質抗体

CoralHue™ 蛍光タンパク質抗体

Code No.	製品名	クローン	包装	使用法	WB での交差反応
M102-3M	Anti-monomeric Azami-Green1 mAb	2F11	100 µg	WB	mAG1
PM052M	Anti-monomeric Azami-Green1 pAb	Polyclonal	100 µL	WB, IP, IC, IH	mAG1
PM011M	Anti-Azami-Green pAb	Polyclonal	100 µL	WB	AG, mAG1
M106-3M	Anti-Kaede mAb	2F4	100 µg	IP	
M125-3M	Anti-Kaede mAb	3B1	100 µg	WB	
PM012M	Anti-Kaede pAb	Polyclonal	100 µL	WB	
M126-3M	Anti-monomeric Keima-Red mAb	2F7	100 µg	WB	mKeima-Red
M128-3M	Anti-Kikume Green-Red mAb	5B3	100 µg	WB	KikGR, mKikGR
M104-3M	Anti-monomeric Kusabira-Orange1 mAb	1H7	100 µg	WB	mKO1, mKO2, mKG, mKG-O, mKOkappa
M168-3M	Anti-monomeric Kusabira-Orange2 mAb	3B3	100 µg	WB, IP, IC, IH	mKO2, mKG, mKG-O, mKOkappa
PM051M	Anti-monomeric Kusabira-Orange2 pAb	Polyclonal	100 µL	WB, IP, IC, IH	KO1,mKO1,mKO2,mKG,mKG-O,mKOkappa
M116-3M	Anti-Midoriishi-Cyan mAb	2C1	100 µg	IP	
M130-3M	Anti-Midoriishi-Cyan mAb	5B7	100 µg	WB	MiCy, mMiCy
M148-3M	Anti-monomeric Kusabira-Green N-terminal Fragment mAb	1E6	100 µg	WB	mKO1, mKO2, mKG
M149-3M	Anti-monomeric Kusabira-Green C-terminal Fragment mAb	21B10	100 µg	WB	mKO2, mKG
M223-3	Anti-Ash-tag mAb	FLP1C15-2	100 µg	WB	Ash-MCL, Ash-MNL Ver.2

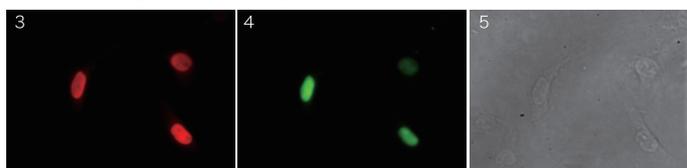
●Anti-monomeric Azami-Green1 pAb (Code No. PM052M)

■ Immunohistochemistry



Immunohistochemical detection of mAG1 on frozen section of B6.Cg-Tg (Fucci) 504Bsi mouse embryonic brain (E13) with PM052M (1) and Fucci-S/G₂/M Green own fluorescence (2).

■ Immunocytochemistry



Immunocytochemical detection of mAG1 in Fucci-S/G₂/M Green transfected HeLa cells with 3: Anti-mAG1, 4: Fucci-S/G₂/M Green, 5: Transmission light

Amalgaam は、蛍光タンパク質および蛍光タンパク質を利用したバイオセンサーに特化した、当社ブランドです。細胞生物学研究から創薬研究まで、世界中の幅広い分野のお客様にリソースを提供しています

本紙記載の製品は研究用です。診断および治療目的には使用いただけません。
記載内容は2024年3月時点の情報です。最新の情報は当社までお問い合わせください。ご使用の際には、データシートをよくお読みください。

Copyright © 2024 MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. All Rights Reserved.

2024.03 155226-24031001N

MBL 株式会社 医学生物学研究所

A JSR Life Sciences Company <https://ruo.mbl.co.jp/>

© 創薬支援部

〒105-0012

東京都港区芝大門2丁目11番8号 住友不動産芝大門二丁目ビル

E-mail : support@mbl.co.jp