

# タイムラプスによる GFP タンパク質の発現調査

大塚 花梨\*<sup>1</sup>, 谷澤 和哉\*<sup>1</sup>, 久富 寿\*<sup>2</sup>

## Time-lapse observation of GFP protein distribution to daughter cells

Karin OTSUKA \*<sup>1</sup>, Kazuya YAZAWA \*<sup>1</sup>, Hisashi HISATOMI \*<sup>2</sup>

(Received Jan 10, 2023)

### 1. 背景

培養細胞株におけるタンパク質の局在調査やカスケードの探索において、plasmidによるタンパク質の強制発現法が用いられる。その場合、一般的には強制発現したタンパク質の活性時間を推測し、それに即した時期(経過時間)でウエスタンブロット解析や蛍光顕微鏡による観察などが実施される。例えば抗がん剤投与後、24 時間後および 48 時間後における強制発現タンパク質における挙動観察に有効である。しかし、24 時間後あるいは 48 時間後の一瞬を切り抜いた状態での強制発現タンパク質の細胞への影響は再現性や信憑性において疑問が生じる。

この一瞬を切り抜いた画像に信憑性を与えるのが培養細胞の動画撮影である。最近では一般的となった技術で、正確にはコマ送り動画(タイムラプス)である<sup>1)</sup>。全ての顕微鏡観察にタイムラプスが必要とは思わないが、少なくともplasmidによる強制発現実験にはSupplement Dataとして非常に有用である。当研究室でも可能な限りタイムラプスを撮影し、実験データの裏付けに用いている。しかし、強制発現されたタンパク質の発現や分解についての教科書的な解釈はない。本研究ではplasmidの強制発現細胞におけるタイムラプスによる観察において、タンパク質の細胞内動態を観察した。

### 2. 材料と手順

#### 2. 1 細胞培養

ヒト胎児腎細胞株HEK293Tを東北大学加齢医学研究所より入手した。10% Fetal Bovine Serum(FBS)を含むD-MEN培地(Thermo Fisher Scientific)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>

条件下で培養した。また、組織培養用 24 well plate(Thermo Fisher Scientific)に 2×10<sup>2</sup> cells/mLの密度でHEK293T細胞を播種した。

#### 2. 2 plasmid導入

pFN21A plasmid (Promega)へGFP<sup>2)</sup>遺伝子を挿入した。HilyMax<sup>3)</sup>(同仁化学研究所)によるリポフェクション法によってplasmidを細胞へ導入した。

#### 2. 3 タイムラプスの撮影

Lumascope 560 (Etalun)によってGFPの蛍光を 72 時間タイムラプス撮影した。任意の時間には明視野による撮影も実施し、plasmid導入効率を算出した。

### 3. 結果

用いたplasmidの導入効率は 24 時間で 24%、48 時間で 34%、72 時間で 37%であった。導入細胞は時間の経過とともに増加した。導入から 7.5 時間でGFP由来の蛍光が観察された。最初は弱い蛍光を発していた細胞でもやがて強い蛍光を呈した(Fig.1a)。一方、弱い蛍光を発した後に消光した細胞も確認された(Fig.1b)。また、蛍光を発したまま分裂する細胞も観察された(Fig.1c)。さらに、アポトーシス小体由来の蛍光も確認された(Fig.1d)。

### 4. 考察

本研究におけるplasmid導入率の決定はGFP由来の蛍光細胞数による。しかし、導入されていてもGFPタンパク質量が少ないあるいは分解が速ければ発光しない。また、GFP由来の蛍光の検出法が高感度であれば細胞導入効率の上昇が推測される。GFP由来の蛍光が確認されなくても、「陰性」ではなく「検出せず」である。本研究でも検

\*<sup>1</sup>: 理工学部/大学院理工学研究科

\*<sup>2</sup>: 物質生命コース 教授 (hisatomi@st.seikei.ac.jp)

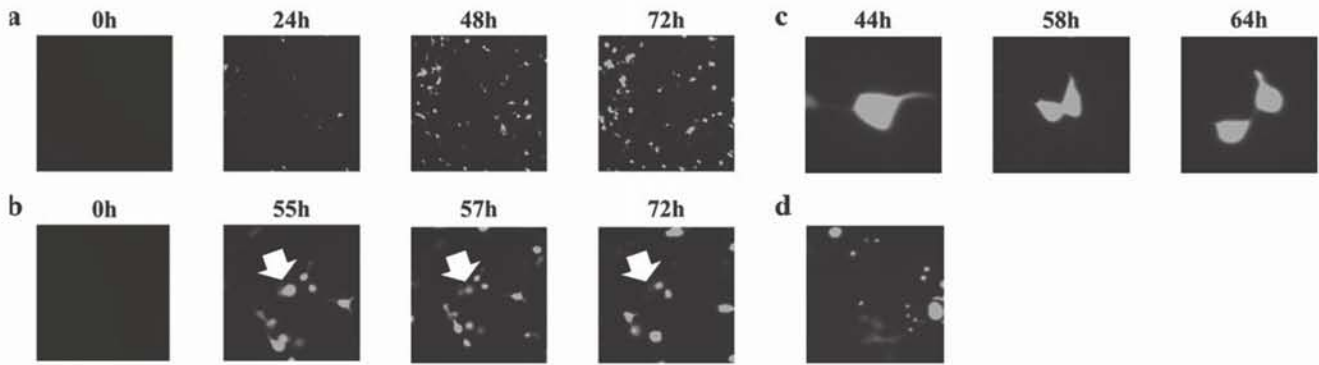


Fig.1 GFPタンパク質のタイムラプス

a,b; 時間経過によるGFPタンパク質の増減, c; 娘細胞へのGFPタンパク質の分配, d; アポトーシス小体の発光

出感度以下のGFP由来の蛍光が増加し、不定期に光り始めた(Fig.1a)。Plasmidの細胞への導入時期の差異あるいはmRNAの転写、タンパク質発現、GFP由来の蛍光までの時間差が考えられる。また、観察中にGFP由来の蛍光が減衰した細胞(Fig.1b)も観察され、GFPタンパク質の分解も示唆された。観察期間内でのGFP由来の蛍光の変化は、GFP遺伝子からの転写・翻訳とGFPタンパク質の分解とが複雑に絡み合った結果であり、細胞ごとに異なる結果となった。なお、本研究で観察したGFP陽性細胞についてmRNA量を測定したところ、24時間におけるGFP mRNA量に比べて72時間におけるGFP mRNA量は8倍に増加していた(未発表データ)。タンパク質としての蛍光量は2倍にも満たないため、72時間における細胞は蛍光する余力は十分にあるのかもしれない。細胞培養では長時間の培養により細胞が多くなりすぎて細胞死を誘発するため、これ以上の経過時間での観察は現実的ではないが、GFPの蛍光観察では留意すべき点となった。

発現したGFPタンパク質が娘細胞にも分配され、細胞分裂後にもGFP由来の蛍光が確認された(Fig.1c)。時間の経過とともにGFP発現細胞数が増加したのも、細胞分裂によるGFPタンパク質の分配が寄与している。また、本研究ではアポトーシス小体と考えられる小胞からもGFP由来の蛍光を確認した(Fig.1d)。明視野では明らかに細胞が崩壊していても、GFP由来の蛍光が確認されている。タイムラプスで観察すると、強制発現によるタンパク質の挙動も静止画では得られない情報が隠れている。

## 5. 参考文献

- 1) Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, *et al.* : Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 28, 1115-1121, 2010
- 2) Shimomura O, Johnson FH, Saiga, Y : Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239, 1962
- 3) Mima S, Ushijima H, Hwang HJ, *et al.* : Identification of the *TPO1* gene in yeast, and its human orthologue TETRAN, which cause resistance to NSAIDs. *FEBS Lett*, 581, 1457-1463, 2007