

蛍光性低酸素誘導因子の相関分析†

田中 悠樹*, 野村 保友**

Fluorescence correlation analysis of GFP-labelled HIF-1 α in stable transformants†

Yuki Tanaka* and Yasutomo Nomura**

HIF-1 α , hypoxia induced factor-1 α is regarded as a target for drug development in several diseases such as cancer. For high throughput screening of HIF-1 α -targeted drug, we need to determine the activity sensitively and quantitatively. In the present study, we proposed a method of fluorescence correlation analysis on HIF-1 α activation in which Co²⁺ treatment against stable transformants of GFP-labelled HIF-1 α mimicked hypoxia. In fluorescence correlation spectroscopy, we observed fluorescence intensity fluctuation within a volume element which fluorescence molecules enter and exit because of the Brownian motion in solution or cytosol. When one-component model was used for the analysis, it was difficult to discriminate diffusion coefficient of active form of HIF-1 α with inactive one. In two-component model, however, a fraction of slow moving component, GFP-labelled HIF-1 α increased significantly when the transformants were exposed to Co²⁺. In the case of high throughput screening for HIF-1 α -targeted drug with fluorescence correlation spectroscopy, we should use the fraction of the slower moving component to judge the activation.

Key words : HIF-1 α , Fluorescence correlation spectroscopy, Brownian motion, Diffusion equation, Diffusion coefficient

1 はじめに

緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein, GFP) は特定のタンパクを遺伝子工学的にラベルできることからさまざまな研究で使われている^{1,2)}. 近年ガンのターゲットとして注目されている低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) をこの方法でラベルし、傷つけずに生きた細胞のままその活性化を簡便に評価できるとドラッグスクリーニングに大変有効である.

Fig.1 に示すように HIF-1 α は好気条件下では分解されるが、低酸素条件下では分解が抑制されて核移行し標的遺伝子を活性化する. しかし一過性発現では、内在性の HIF-1 α の低酸素挙動から推測される明確な核移行が以下の二つの問題から観察されないことがあり、大規模スクリーニングの障害になっている. (I) 同じ条件下で観察しても、核移行の程度が個々の細胞に大きく依存する. (II) 低酸素刺激により主に細胞質で強く蛍光を発する細胞から細胞核に蛍光が集中するという明確な変化がないことがある. これらの問題を解決するために、安定発現株が樹立された³⁾. DNA インターカーレータとの2重染色画像の蛍光画像解析が行われ、わずかな活性化が

確認されたが、さらなる高感度化が求められた.

そこで本研究では低酸素を模擬した Co²⁺ 処理によって細胞内の蛍光性 HIF-1 α の分解が抑制され、蛍光タンパクの分子量が大きくなる可能性がある点に着目した. これを生細胞内で計測するためには蛍光強度揺らぎから蛍光分子の大きさを評価できる蛍光相関分析法 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) が適し

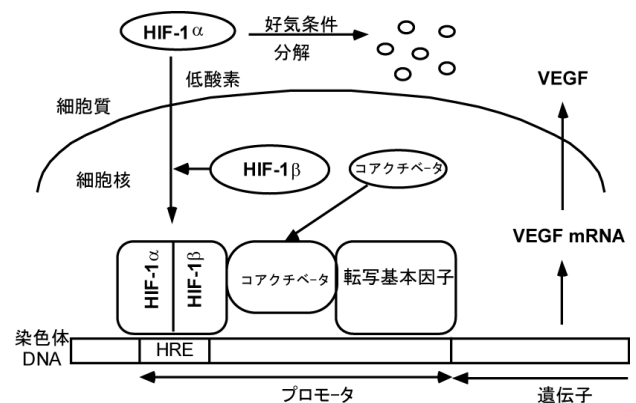


Fig.1 Scheme of HIF-1 α

† 原稿受理 平成27年2月27日 Received February 27, 2015

* システム生体工学専攻大学院生 (Graduate school of Engineering, Department of Systems Life Engineering)

** システム生体工学科 (Department of Systems Life Engineering)

ていると考えた。Co²⁺処理によって蛍光タンパクが大きくなるのか、あるいは大きな蛍光タンパクが増加するのかを検討した。

2 実験

2・1 試料と器具

AcGFP 安定発現細胞と AcGFP-HIF-1 α 安定発現細胞を一般的な条件で培養した。低酸素条件を模擬するために 100 μ M CoCl₂ で 24 時間処理した。細胞質と核からの蛍光強度ゆらぎを生物工学科の共焦点走査型レーザー顕微鏡 (Olympus, FV1000) を用いて計測した。細胞分画キット (Thermo Scientific, NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit) を用いて、Co²⁺処理後に細胞分画を行って、細胞質画分と核画分それぞれの蛍光強度ゆらぎを計測した。

2・2 蛍光相関分光解析

細胞内でも水溶液内と同様にタンパク分子はブラウン運動することが知られている。蛍光相関分光法では細胞内に共焦点光学系が作り出すフェムトリットル程度の非常に小さな観察領域をわずかな数の蛍光分子が入り出すときの蛍光強度揺らぎ解析して、蛍光分子の濃度や分子量を評価する方法である⁴⁾。100 MHz 程度でサンプリングした蛍光強度揺らぎの時系列データには、一般的な大きさの蛍光分子や蛍光タンパクのブラウン運動や分子数が反映される。その時系列データの自己相関関数 $G(\tau)$ は蛍光強度 I から Eq.1 にしたがって計算する。

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (1)$$

単一成分の蛍光分子が単純拡散する一成分モデルでは Eq.2 を用いて解析する。

$$G(\tau) = \frac{1}{N \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right) \sqrt{1 + \frac{s^2 \tau}{\tau_D}}} \quad (2)$$

ここで N は観察領域内の蛍光分子数、 s は観察領域の光軸方向とそれと垂直な方向の長さ (ω) の比 (装置定数として別に決定)、 τ_D は観察領域を横切る時間 (拡散時間) である。さらに τ_D から ω を用いて Eq.3 により装置に依存しない拡散係数 D を得る。

$$D = \frac{\omega_0^2}{4\tau_D} \quad (3)$$

さらに細胞内に分子量が異なる 2 種類の蛍光タンパクが共存する二成分モデルでは Eq.4 を用いて解析する。

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[\frac{1-y}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{small}} \right) \sqrt{1 + \frac{s^2 \tau}{\tau_{small}}}} + \frac{y}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{large}} \right) \sqrt{1 + \frac{s^2 \tau}{\tau_{large}}}} \right] \quad (4)$$

ここで τ_{small} は小さな蛍光タンパクの拡散時間、 τ_{large} は大きな蛍光タンパクのもので、 y は観察領域内にある

蛍光分子数に占める大きな蛍光タンパクの割合である。

GFP は細胞内で分解されにくく HIF-1 α だけが分解される。したがって二成分解析ではこの 2 種類の蛍光タンパクが共存すると考える。先行研究を参考にして、大きな蛍光タンパク GFP-HIF-1 α (MW147 kD) およびその分解産物 GFP (小さな蛍光タンパク, MW27 kD) の拡散時間はそれぞれ 10.4 μ m²/s と 21.0 μ m²/s とした⁵⁾。FV-1000 にインストールした蛍光相関分析ソフトを用いて解析した。

3 結果と考察

3・1 一成分解析

Co²⁺処理していない AcGFP-HIF-1 α 安定発現細胞の蛍光画像の 1 例を Fig.2 (右) に示す。位相差像 (左) と比較して二つの細胞それぞれの細胞質と核で 2 箇所ずつ計測点を決定した (右図中の 1~4)。各測定点からの蛍

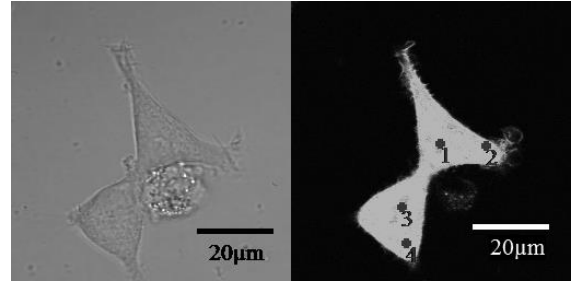


Fig.2 AcGFP-HIF1 α transformant

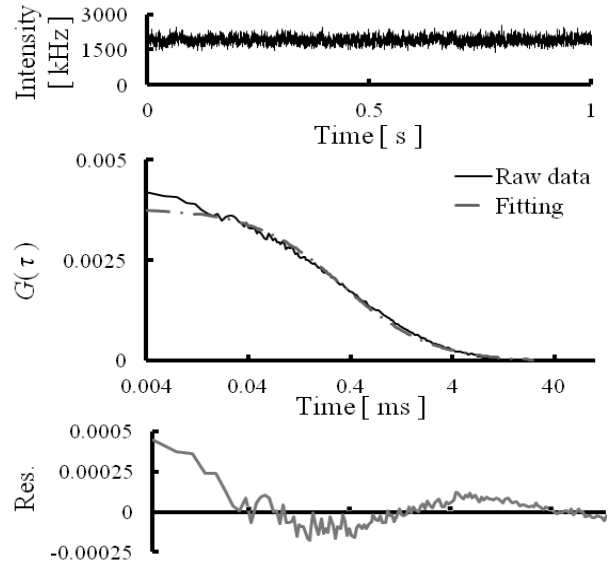


Fig.3 FCS analysis of cytosol in a living cell

光強度揺らぎの時系列データを記録し Eq.1 にしたがって解析した。解析例として細胞質 2 のデータを Fig.3 に示す。上図は揺らぎの時系列データである。微弱光を高感度検出するために光電子増倍管を光子計数モードで使用した。揺らぎの蛍光強度は 1 秒間に検出された光子数

である。この細胞では 1700 kHz 程度の強度で揺らいでいた。Eq.1 に従って自己相関分析すると中図（実線）が得られた。この実験的に得られた自己相関関数に Eq.2 を最小二乗法でフィッティングすると速い時間を除いてほぼよく合っていた（中図の一点鎖線および下図の残差）。 Co^{2+} 処理していない 8 細胞と Co^{2+} 処理した 16 細胞の細胞質および核からの蛍光強度揺らぎを同様に解析した。Eq.3 にしたがって拡散定数を計算すると、それぞれの場所における蛍光タンパクの拡散定数は 27 kD の GFP の値にほぼ一致し、 Co^{2+} 処理によって拡散定数が有意に小さくなることはなかった。分解抑制によって生じたはずの大きな蛍光タンパク（GFP-HIF-1 α , 147 kD）は細胞内蛍光タンパク全体の中の一部にすぎず一成分解析ではマスクされた可能性がある。

3・2 二成分解析

前のセクションで得られた時系列データに対して Eq.4 にしたがって二成分解析を行った。細胞質では Co^{2+} 処理により GFP-HIF-1 α の割合 y が有意に増加した。これは Co^{2+} 処理によって HIF-1 α の分解が抑制され、GFP-HIF-1 α が細胞質で増加したものと考えられる。これは先行研究のウェスタンブロットおよび画像解析の結果を支持した。また、Fig.1 に示すように分解を免れた HIF-1 α は核へ移行することが指摘されている。核移行の機序には多数のタンパクが寄与することが知られており、全てが揃わなければ機能しない。分解を免れた多数の GFP-HIF-1 α の輸送が十分には行われることは難しいかもしれない。このことは核移行による大きな蛍光タンパクの有意な増加を核では検出できなかったことと矛盾しない。

3・3 細胞質画分および核画分の解析

蛍光相関分光計測では微小な観察領域内におけるわずかな蛍光分子の出入りを計測する。通常では最大数百 kHz の蛍光強度で計測すべきところを数千 kHz で計測した。細胞内での蛍光タンパクの発現量を減らす必要があるかもしれない。そこで細胞質画分と核画分を調製して蛍光タンパクの濃度を減少させ、蛍光相関分析した。Fig.4 は細胞質画分解析の典型例である。Fig.4 上図に示すように、蛍光強度は平均数十 kHz へ弱くなり、実験的に得られた自己相関関数に解析式をうまくフィッティングできた（中図および下図）。 Co^{2+} 処理していない細胞と Co^{2+} 処理した細胞をそれぞれ 31 ディッシュから細胞質画分および核画分を調製して蛍光強度揺らぎを同様に解析した。一成分解析では Co^{2+} 処理による拡散時間の有意な増加は検出できなかったが、二成分解析すると、細胞質画分と核画分の両方で Co^{2+} 処理により分解を免れた GFP-HIF-1 α の割合 y が有意に増加した。生細胞を傷つけることなく検出できた細胞質での GFP-HIF-1 α の増加ばかりでなく、細胞からタンパクを抽出し蛍光タンパクの濃度を減少させることによって核移行も確認できた。

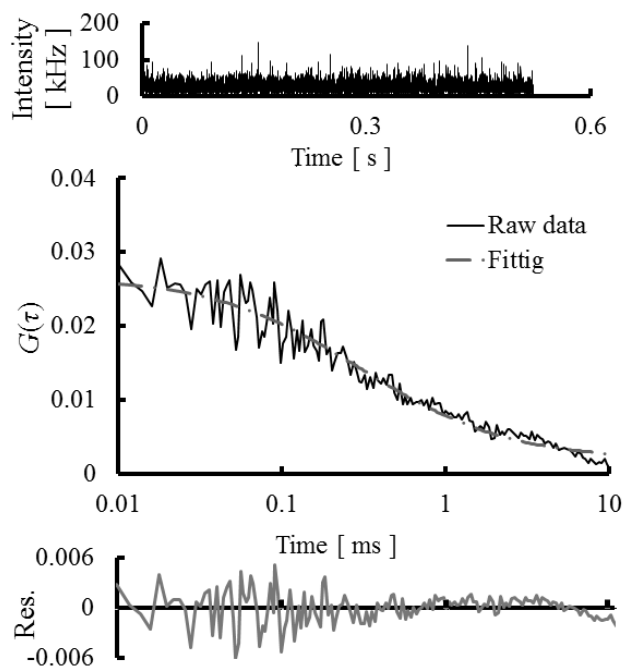


Fig.4 FCS analysis of cytosol fraction

4 まとめ

生細胞を傷つけることなく、HIF-1 α の活性化を蛍光相関分光法で検出できた。この結果は蛍光相関分析が抗がん剤の大規模スクリーニングに有効であることに加えて、本研究と同様に興味あるタンパクを蛍光ラベルして相関分析すれば幅広くドラッグスクリーニングに生かせる可能性を示唆している。

5 謝辞

本研究は JSPS 科研費 23500523 「次世代型細胞診断をめざした画像相関分析によるオルガネラ動態スペクトロスコピー」の助成を受けた。

参考文献

- 1) Y. Nomura, H. Tanaka, L. Poellinger, F. Higashino, and M. Kinjo, *Cytometry*. 44(1), 1-6 (2001).
- 2) E. Takahashi, T. Takano, Y. Nomura, S. Okano, O. Nakajima, and M. Sato, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291, 781-787 (2006).
- 3) T. Goto, M. Sato, E. Takahashi, and Y. Nomura, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 13(14), 2547-50 (2012).
- 4) Y. Nomura, H. Fuchigami, H. Kii, Z. Feng, T. Nakamura, and M. Kinjo, *Anal. Biochem.* 350(2),196-201 (2006).
- 5) C. Pack, K. Saito, M. Tamura, and M. Kinjo, *Biophys. J.*, 91(10), 3921-36 (2006).