

HeLa細胞へのGFPおよびGFP付加ヌクレオソームシャペロンの フェムトインジェクションと細胞内動態

(広大クロマチン動態数理研究拠点¹, 東京農工大生命工²)

○高見 知秀¹, 上脇 隼一¹, 落合 博¹, 小山 真人², 小川 佳英²,

齊藤 美佳子², 松岡 英明², 楯 真一¹

Femtoinjection of GFP and GFP-tagged Nucleosome Chaperone into HeLa Cells and the Intracellular Dynamics

(RcMcD Hiroshima Univ.¹, Dept. Biotechnol. Life Sci. Tokyo Univ. Agricul. Technol.²)

○Tomohide Takami¹, Jun-ichi Uewaki¹, Hiroshi Ochiai¹, Masato Koyama²,

Yoshihide Ogawa², Mikako Saito², Hideaki Matsuoka², and Shin-ichi Tate¹

【序】生細胞中の特定の機能を担うタンパク質の時間分解ライブイメージングは、反応速度や機能発現の時間スケールを定量化できることから、近年注目されている。目的化合物を細胞質内へ導入するために、リポフェクションやエレクトロポレーションをはじめとして多くのトランスフェクション法が開発されている。その中で、定量的に化学物質を細胞内に導入する方法として、従来のマイクロインジェクションを精密定量化したフェムトインジェクション法[1]が挙げられる。この方法により、特定の分子を定量的に細胞内に導入できれば、これまでのトランスフェクション法に欠けていた定量的議論が可能になるだけでなく、生細胞内における特定部位への結合の選択性の定量化などその応用範囲は無限である。

そこで本研究では、緑色蛍光タンパク質(GFP, mNeonGreen)およびGFPでタグ付けされたヌクレオソームシャペロン(HMGB1)をヒト子宮頸癌由来細胞(HeLa細胞)にフェムトインジェクション法を用いて直接インジェクションし、その直後から蛍光分子の拡散を時間変化で追跡することで、インジェクションした分子の細胞内動態についての知見を得たので報告する。

【実験】GFP(~27 kDa, 0.24 mM)とGFP付加HMGB1(~52 kDa, 0.20 mM)そして末端テールのないGFP付加HMGB1[2](~46 kDa, 0.10 mM)の合成および調製は、我々が報告した方法に従って行った。[3,4] これらの試料をそれぞれリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈して50 μ Mにした溶液をインジェクション液とした。ガラスピペットは、ボロンシリケート製の外径1 mm (内径0.78 mm)でフィラメント付きのキャピラリーから、Sutter社のプラー(P-2000)を用いて、先端外径1 μ m (内径約0.7 μ m)のものを作製した。このピペットに上記のインジェクション液を充填してから、農工大で開発されたスグワカルチャーシステム[5]を有するフェムトインジェクション装置に取り付け、プラスチックディッシュ内で培養されたHeLa細胞にナリシゲ社のマイクロインジェクター(IM-300)を用いてインジェクションを行った。インジェクションの圧カパルス幅は10 msで行った。インジェクション直後からの経過観察は浜松ホトニクス社のCCDカメラ(ORCA-ER)を用いて行い、その後スグワカルチャーシステムにより細胞座標位置が登録された情報を用いて特定されたイン

ジェクション後の細胞をZeiss社の共焦点顕微鏡(LSM510)に移して経過観察を行った。

【結果と考察】ほぼ同じ大きさ(体積約4 pL)のHeLa細胞の端からGFP(~27 kDa)およびGFP付加HMGB1(~52 kDa)分子をインジェクションした場合、注入された分子が細胞内の対岸に到達するまでの時定数を求めたところ、それぞれ25 s、64 sとなった。レイノルズ数が低い液体中での拡散におけるストークス・アインシュタインの式において、分子半径が分子の質量にほぼ比例すると仮定すると、時定数すなわち拡散係数の逆数は分子の質量にほぼ比例することになる。上記で求められた各時定数と分子の質量との関係は若干比例関係からずれているが、これは分子構造の歪と細胞形状の個体差に起因すると考えられた。

次に、GFPでタグ付されたHMGB1において、末端テールの有無で核移行速度に変化が生じるかを調べるために、細胞内における核内と核外での平均強度の比を、インジェクション時間に対して片対数プロットしたグラフを右図に示す。グラフにおいて縦軸の値が零になる点では、核内外での平均強度が等しいことになり、縦軸の値が負になるほど核移行が進んでいることを意味する。このグラフから、末端テールがない方がより早く核移行が進行することがわかった。この結果は、末端テールがHMGB本体とクロマチンとの相互作用を阻害しているという報告[2]と一致する。そして、核移行が早く進行するフェーズ(時定数 τ_1)と核移行が遅くなるフェーズ(時定数 τ_2)が存在することがわかった。

以上の結果は試行数が少ないため、十分な統計解析を行うには実験上の困難がある。この問題を解決するために、我々は自動インジェクション装置の開発に着手しており、この点についても併せて報告する。

【謝辞】本研究は文部科学省生命動態システム科学推進事業「核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点」の助成を受けたものです。

【参考文献】

- [1] H. Matsuoka, S. Shimoda, M. Ozaki, H. Mizukami, M. Shibusawa, Y. Yamada, and M. Saito, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 341.
- [2] M. Watson, K. Stott, and J. O. Thomas, *J. Mol. Biol.* **374** (2007) 1286.
- [3] J. Wang, N. Tochio, A. Takeuchi, J. Uewaki, N. Kobayashi, and S. Tate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441** (2013) 701.
- [4] J. Uewaki, H. Kamikubo, J. Kurita, N. Hiroguchi, H. Moriuchi, M. Yoshida, M. Kataoka, N. Utsunomiya-Tate, and S. Tate, *Chem. Phys.* **419** (2013) 212.
- [5] Y. Yamada, N. Yamaguchi, M. Ozaki, Y. Shinozaki, M. Saito, and H. Matsuoka, *Microsc. Microanal.* **14** (2008) 236.

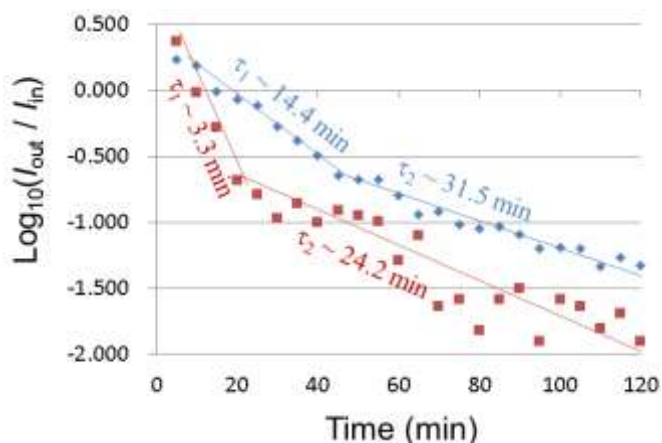


Figure: Time dependence of the logarithmic intensity ratio of the injected GFP-tagged HMGB1 molecules between in and out of the nucleus in the HeLa cell; HMGB1 with tail (blue) and without tail (red). The time constants τ_1 and τ_2 shown in the figure were estimated from the slope of the semi-log plots.