

エタノール固定細胞の細胞周期における タンパク発現差解析の検討

山本 淳子（福井大学 ライフサイエンス支援センター バイオ実験機器部門）

YAMAMOTO Junko :

Examination of the differential protein expression analysis in ethanol fixed cells during cell cycle

1. 目的

フローサイトメーターによる細胞周期の検出は、蛍光色素 Propidium Iodide (PI) で染色し核 DNA 量の変化を測定する。さらに、5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を用いて S 期細胞のみを検出できる (図 1)。細胞周期各段階の細胞をセルソーターで分取し、タンパクを抽出、蛍光二次元電気泳動法 (図 2) でタンパクの発現差解析を行えば、発現差のあるタンパクの同定ができると考えられる。しかし、PI は生細胞の細胞膜を透過することができないため、エタノール固定が必要である。固定により、タンパクが変性・消失することは知られているが、量的に変化するタンパクを同定すれば、それ以外のタンパクで、細胞周期各段階のタンパク発現差解析が可能になると考え検討した。

2. 材料と方法

(1) 材料

細胞: HL60 株化細胞 (急性前骨髄性白血病細胞)

試薬類

[蛍光二次元電気泳動]

- ・タンパク抽出バッファー¹⁾: 7M Urea、
2M Thiourea、3% CHAPS、1% Triton-X 100
- ・等電点電気泳動用ゲル: Immobiline DryStrip
pH4-7 13cm (GE ヘルスケア)
- ・SDS 電気泳動用ゲル: リアルゲルプレート
CyDye 用 16cm (パイオクラフト)
- ・タンパク標識用蛍光色素: CyDye DIGE Fluor,
Minimal Labeling kit (GE ヘルスケア)

[細胞周期検出]

- ・Hoechst33342 (タカラバイオ)
- ・PI (SIGMA)
- ・RNase (SIGMA)
- ・BrdU (ナカライ)
- ・抗 BrdU 抗体: Purified Mouse Anti-BrdU
(BD Pharmingen)
- ・蛍光色素標識二次抗体: AlexaFluor[®]405 Goat
Anti-Mouse IgG (H+L) (Molecular Probes)

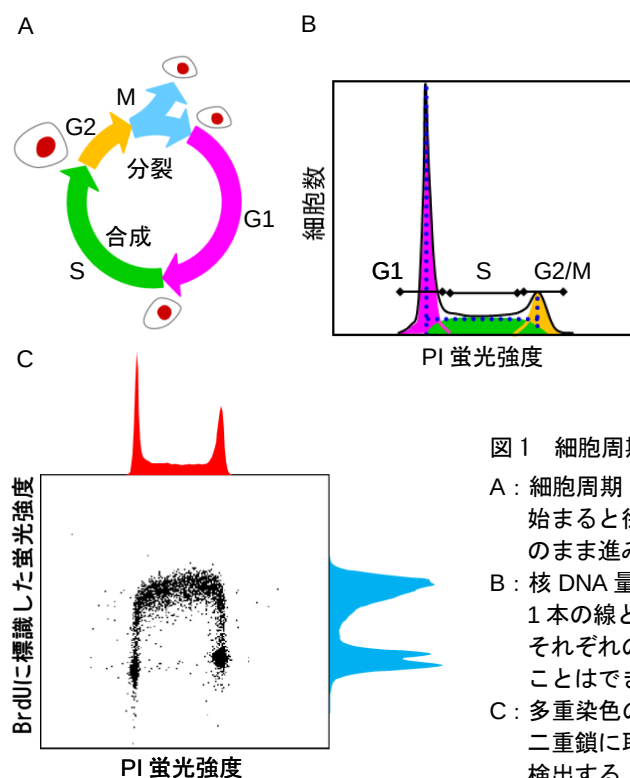


図 1 細胞周期の検出

- A: 細胞周期; 核 DNA 量は、G1 期は同じ量で進み S 期に入り DNA の合成が始まると徐々に増加していく。合成が終了すると倍量となり、G2 期は倍量のまま進み、M 期に入り 2 つの娘細胞に分配され G1 期の DNA 量にもどる。
- B: 核 DNA 量の通常のコストグラム; 理論上は G1 期と G2/M 期の蛍光強度は 1 本の線となるが(青点線)、実際の測定では少し幅を持ったピークとなる。それぞれのピークのすそ野が重なり合うため G1、S、G2/M 期を明確に分けることはできない。
- C: 多重染色のコストグラム; BrdU は DNA 合成時にチミンの代わりに DNA 二重鎖に取り込まれる。取り込まれた BrdU に蛍光標識し、S 期細胞のみを検出する。さらに核 DNA を PI で染色することにより、G1、S、G2/M 期を分けて検出できる。

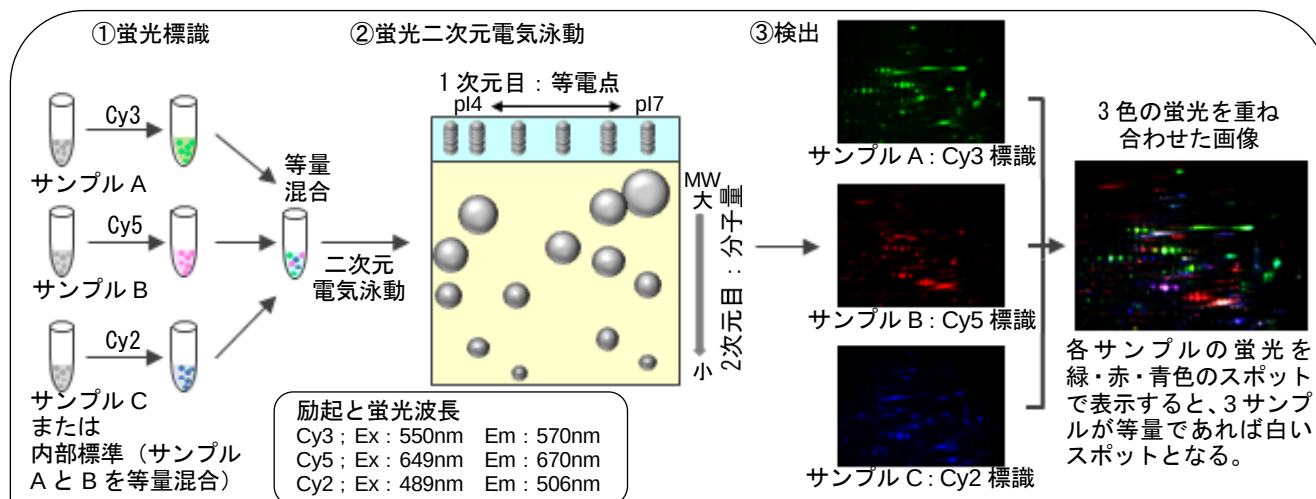


図 2 蛍光二次元電気泳動法模式図

- ① 比較したい 3 種類のサンプルまたは 2 種類のサンプルと内部標準サンプルに、Cy3, Cy5, Cy2 の各蛍光色素を標識する。
- ② 蛍光標識した 3 サンプルを等量混合して二次元電気泳動を行う。1 次元目は等電点、2 次元目は分子量で分離する。
- ③ 泳動後のゲルを蛍光イメージアナライザーで蛍光検出すると、タンパクはスポットとして検出される。各蛍光色素は起・蛍光波長が異なっているため、サンプル毎の画像が検出でき、検出した画像を重ね合わせると、3 サンプルのスポットを蛍光強度の差で比較することができる。蛍光強度の差はタンパク量の差と見る。

装置等

- ・ 等電点電気泳動装置 :
MultiPhor II (GE ヘルスケア)
- ・ SDS 電気泳動装置 :
クールスラブ (バイオクラフト)
- ・ 蛍光イメージアナライザー :
Typhoon TRIO+ (GE ヘルスケア)
- ・ ゲルイメージング解析ソフト :
Progenesis PG240 (Perkin Elmer)
- ・ セルソーター :
BD FACSAria II (Becton, Dickinson)

(2) 方法

① 生細胞とエタノール固定細胞の蛍光二次元電気泳動とタンパク量の差解析

細胞の状態が同じになる様に、一つの培養フラスコから生細胞とエタノール固定細胞に分ける。

PBS で洗浄後、生細胞はタンパクを抽出する。エタノール固定細胞は 70 % エタノールで -20℃ overnight 固定後タンパクを抽出する。抽出後定量し、内部標準サンプルとして両方のタンパクを等量混合する。20μg の生細胞、エタノール固定細胞、内部標準の各タンパクに蛍光色素 Cy3、Cy5、Cy2 を標識、蛍光二次元電気泳動を行う。泳動後、蛍光イメージアナライザーで各蛍光を検出する。検出した蛍光画像を、ゲルイメージング解析ソフトを用いてスポット解析を行い、タンパク量の差の解析を行う。

② 生細胞とエタノール固定細胞の細胞周期各段階のタンパク発現差解析

生細胞は、Hoechst33342 を添加 [最終濃度 10μg/ml] し、37℃、30 分間培養して核 DNA を染色する。

エタノール固定細胞は、BrdU を用いて PI との多重染色を次の手順で行う。

- 1) BrdU ラベル [最終濃度 5μg/ml] 37℃ 30 分
- 2) 固定 : 70% エタノール -20℃ overnight
- 3) DNA の単鎖化 : 2N HCl 室温 20 分
- 4) 中和 : 0.1M ホウ酸バッファー
- 5) 抗 BrdU 抗体反応 : 室温 1 時間
- 6) 蛍光標識二次抗体反応 : 室温 30 分
- 7) PI [最終濃度 20μg/ml] と RNase [最終濃度 20μg/ml] を添加する。

それぞれの細胞を、細胞周期各段階ごとにセルソーターでソーティングする。

ソーティングした細胞からタンパクを抽出、定量後、等量の G1 期、S 期、G2/M 期の 3 サンプルに蛍光色素を標識する。内部標準は使用しない。蛍光二次元電気泳動を行い、タンパク発現差解析を行う。

3. 結果

(1) 生細胞とエタノール固定細胞の蛍光二次元電気泳動とタンパク量の差解析

エタノール固定細胞の蛍光二次元電気泳動の結果は、生細胞の泳動結果と比較して、タンパクの分離に問題

はなく、蛍光二次元電気泳動は可能であることが確認できた（図 3）。

スポット解析の結果、エタノール固定により半分以下に減量するスポットが 72 個検出された。このうち 28kDa 以下のスポットが 46 個あった（図 4）。このことから、エタノール固定では、低分子量のタンパクの減量が多いことが分かった。

(2) 生細胞とエタノール固定細胞の細胞周期各段階のタンパク発現差解析

生細胞は Hoechst33342 の単染色、エタノール固定細胞は BrdU に蛍光色素を標識し、核 DNA を PI で染色する多重染色を行い、細胞周期各段階のソーティングを行った。（図 5、表 1）

それぞれの細胞はソーティング後タンパクを抽出し、蛍光二次元電気泳動後、スポット解析でタンパクの発現差解析を行った（図 6）。

2 倍以上蛍光量に差のあったスポット数を比較すると（図 7）、細胞周期各段階の比較では、生細胞はどの段階を比較しても差のあるスポットは少なかった。エタノール固定細胞は、G1 期と S 期、S 期と G2/M 期の比較では多くの差のあるスポットが検出されたが、G1 期と G2/M 期の比較では少なかった。生細胞とエタノール固定細胞を比較すると、S 期を比較対象とした場合、エタノール固定細胞では検出されたスポット数はかなり多かった。

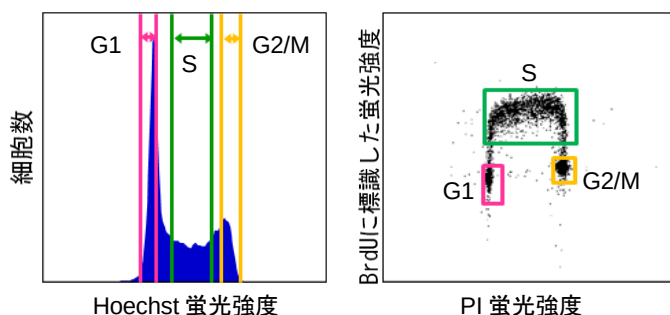


図 5 ソーティング範囲

左：Hoechst33342 の単染色
右：BrdU を用いた PI との多重染色

	Hoechst 染色	BrdU と PI の 多重染色
G1 期	38%	22%
S 期	19%	50%
G2/M 期	21%	18%

表 1 ソーティングした細胞の各比率

Hoechst 染色の S 期は、G1 期、G2/M 期と重ならないようにソーティング範囲を狭くしたため比率が低くなった。

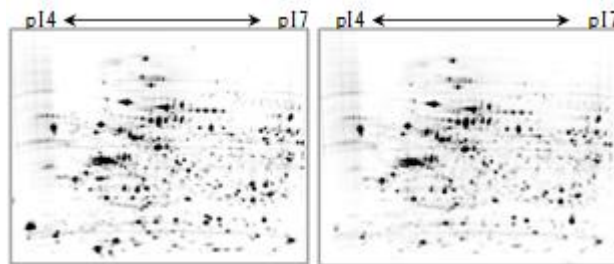


図 3 生細胞とエタノール固定細胞の二次元電気泳動結果

左：生細胞，右：エタノール固定細胞

IEF ゲル：pI4-7，SDS ゲル濃度：5-20%

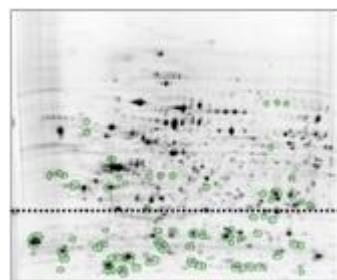


図 4 生細胞とエタノール固定細胞のスポット解析結果

線に囲まれているスポットが、エタノール固定によりタンパク量が半分以下に減量している。点線は 28kDa

4. 考察

エタノール固定細胞は生細胞と同じように蛍光二次元電気泳動ができる事は確認できたが、低分子量のタンパクの減量が多い結果となった。これはエタノール固定では細胞膜の脂質が溶けて、低分子量のタンパクが溶出してしまうためと考えられる。減量するスポット数は、分子量が大きくなるほど少ないことが分かった。したがって、低分子量のタンパクの解析は難しいが、ある程度の大きさのタンパクの発現差解析は可能と考えられる。

細胞周期各段階の蛍光二次元電気泳動結果では、生細胞であまりタンパクの発現差が見られなかった。これは、単染色のため一次元のヒストグラムからソーティング範囲を決めるしかなく、G1 期や G2/M 期に S 期の細胞が含まれてしまい、S 期のタンパクが含まれた G1 期、G2/M 期と S 期を比較したからと考えられる（図 8）。これに対し、エタノール固定細胞は S 期を明確に分ける多重染色を行っているため、G1 期や G2/M 期に S 期細胞が含まれることがない。その結果、各段階のタンパクのみの比較となり、発現差のあるタンパクが多く検出できたと考えられる。これらの結果から、エタノール固定細胞でタンパク発現差解析を行うことは可能であり、多重染色でのソーティングが有効であることが分かった。しかし、低分子量タンパクの溶出を考えると、エタノール固定以外の、タンパクの減量

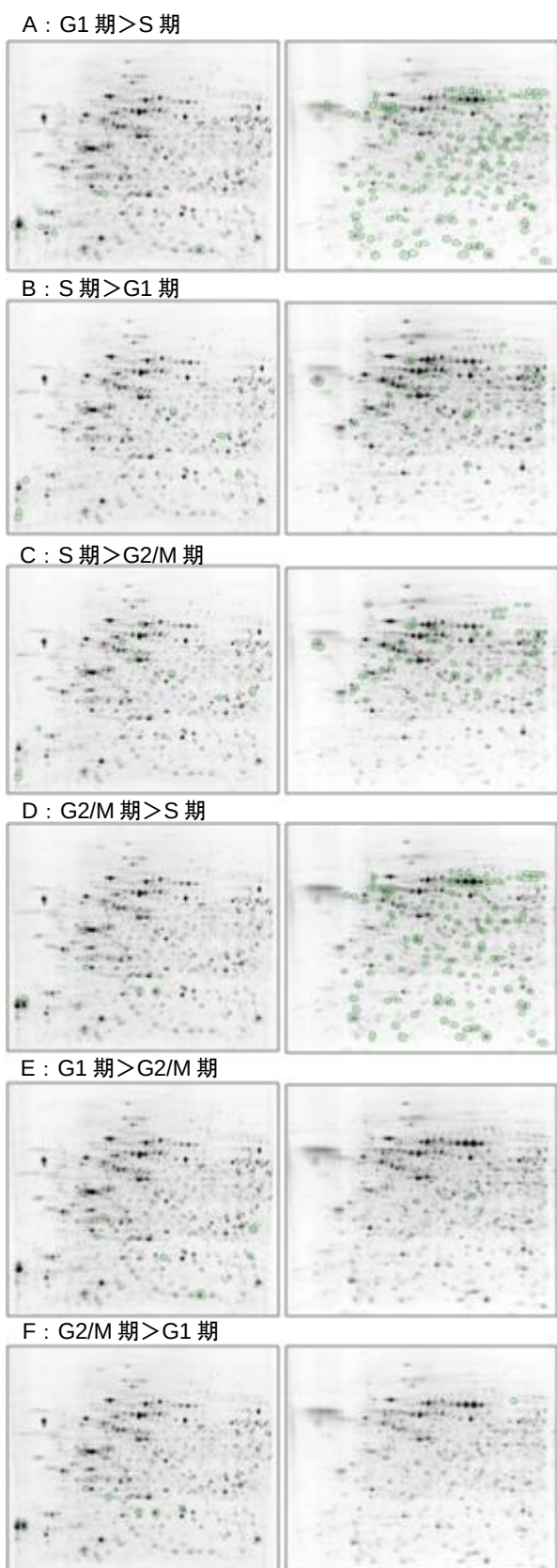


図 6 細胞周期各段階のスポット解析結果

左 : 生細胞 右 : エタノール固定細胞
 線に囲まれているのは比較した細胞周期段階より 2 倍以上蛍光量が多かったスポット
 IEF ゲル : pI4-7, SDS ゲル濃度 : 10-20%

が少ない固定方法や、生細胞での多重染色などの検討が今後の課題であると考えられる。

5. 謝辞

本研究は平成 25 年度科学研究費補助金（奨励研究、課題番号 25930024）の助成を受け実施した。

参考文献

1) GE ヘルスケアホームページ DIGE 道場

http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/ettan_dige/

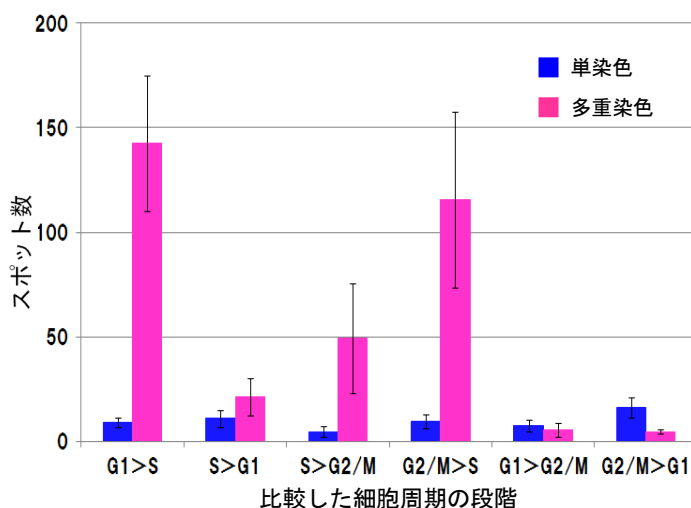


図 7 2 倍以上蛍光量に差のあったスポット数の比較
 S 期を比較対象とした場合、多重染色では多くのスポットが検出された。単染色では比較対象にかかわらず少なかった。

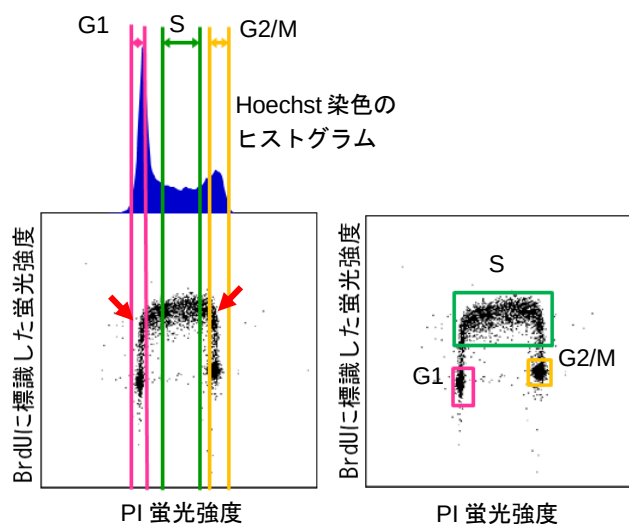


図 8 ソーティング範囲の比較

左 : Hoechst 染色のソーティング範囲を多重染色のヒストグラムに重ねた図 右 : 多重染色のソーティング範囲
 Hoechst 染色で G1 期、G2/M 期としてソーティングした範囲に S 期細胞が含まれている (赤矢印)。