蛍光タンパク質を用いたオルガネラの可視化

【 Author 】 柏木 彩花、大場 雄介
(北海道大学大学院 医学院・医学研究院 細胞生理学教室)
【 Homepage 】 cp.med.hokudai.ac.jp
【 Published 】 2022-03-31
【 Last Update 】 2022-03-31
【 Keywords 】 organelle、fluorescence imaging

概要・原理

オルガネラ局在タンパク質と蛍光タンパク質を融合させたコンストラクト（オルガネラマーカー）は、生細胞でもオルガネラの局在や構造を可視化できるため、オルガネラの経時的な変化を観察することが可能となる。
当研究室では細胞骨格やエンドソーム、ミトコンドリアなどの12種類のオルガネラ局在タンパク質および局在配列と、群青色（Sirius）から近赤外色（iRFP713）までの6種類の蛍光タンパク質について、すべての組み合わせで発現プラスミドを作製し、その発現を確認した。自由記入欄にあるプラスミドはAddgeneから入手可能である（https://www.addgene.org/Yusuke_Ohba/）。

装置・器具・試薬

［使用機器］
35 mm glass base dish
CO2インキュベーター
蛍光顕微鏡
［試薬］
DMEM, high glucose (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)
PEI MAX
OPTIMEM
DMEM/F12, no phenol red

Addgene ID	Plasmid	Addgene ID	Plasmid	Addgene ID	Plasmid
159096	pFX-mito-EGFP	174464	pFX-Sirius-Sec61β	175834	pFX-Venus-KRasCT
174177	pFX-mito-MiCy	174465	pFX-SECFP-Sec61β	175835	pFX-mCherry-KRasCT
174178	pFX-mito-mKate2	174466	pFX-EGFP-Sec61β	175836	pFX-iRFP-KRasCT
174179	pFX-mito-eqFP650	174467	pFX-Venus-Sec61β	175837	pFX-H2B-Sirius
174180	pAcGFP1-mito	174468	pFX-mCherry-Sec61β	175838	pFX-H2B-SECFP
174181	pFX-mito-roGFP	174469	pFX-GalT-Sirius	175839	pFX-H2B-EGFP
174182	pFX-mito-EYFP	174470	pFX-GalT-SECFP	175840	pFX-H2B-Venus
174183	pFX-mito-atpHluorin	174471	pFX-GalT-EGFP	175841	pFX-H2B-mCherry
174184	pFX-Tom20-Sirius	174472	pFX-GalT-Venus	175842	pFX-H2B-iRFP
174185	pFX-Tom20-SECFP	174473	pFX-GalT-mCherry		

174186	pFX-Tom20-EGFP	174474	pFX-GalT-iRFP		
174187	pFX-Tom20-Venus	174475	pFX-Lifeact-Sirius		
174188	pFX-Tom20-mCherry	174476	pFX-Lifeact-SECFP		
174451	pFX-EGFP-EEA1	174477	pFX-Lifeact-EGFP		
174452	pFX-mCherry-EEA1	174478	pFX-Lifeact-Venus		
174453	pFX-iRFP-EEA1	175822	pFX-Lifeact-mCherry		
174454	pFX-EGFP-Rab5	175823	pFX-Lifeact-iRFP		
174455	pFX-mCherry-Rab5	175825	pFX-β-tubulin-Sirius		
174456	pFX-iRFP-Rab5	175826	pFX-β-tubulin-SECFP		
174457	pFX-EGFP-Rab7	175827	pFX-β-tubulin-EGFP		
174458	pFX-mCherry-Rab7	175828	pFX-β-tubulin-Venus		
174459	pFX-iRFP-Rab7	175829	pFX-β-tubulin-mCherry		
174460	pFX-EGFP-Rab11	175830	pFX-β-tubulin-iRFP		
174461	pFX-mCherry-Rab11	175831	pFX-Sirius-KRasCT		
174462	pFX-iRFP-Rab11	175832	pFX-SECFP-KRasCT		
174463	pFX-mKate2-Rab11	175833	pFX-EGFP-KRasCT		

詳細

1．35 mm ガラスベースディッシュをtype I-C コラーゲンでコートする。

2．Cos-1細胞をまき、37℃ 5% CO2環境下に置く。
※培養条件や細胞密度は細胞種に応じて変更する。

3．翌日、オルガネラマーカー 1 μgをPEI MAXを用いてトランスフェクションし、37℃ 5% CO2環境下に置く。
※トランスフェクション試薬は細胞種に応じて変更する。

4．トランスフェクションから約6時間後、培地を交換する。
※培地交換の要不要は各試薬のプロトコルに従う。

5．翌日から翌々日、培地をphenol red freeの培地に交換し、蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察する【図1：観察例】。

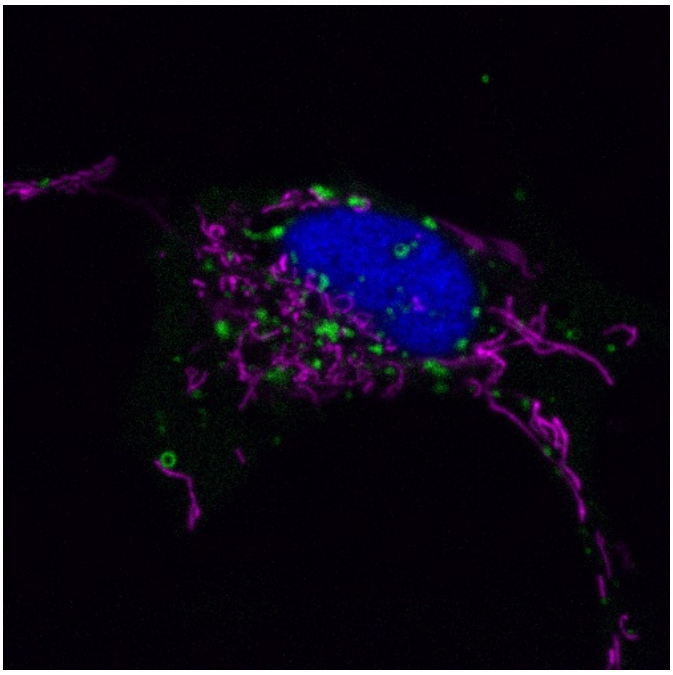

Fig.1

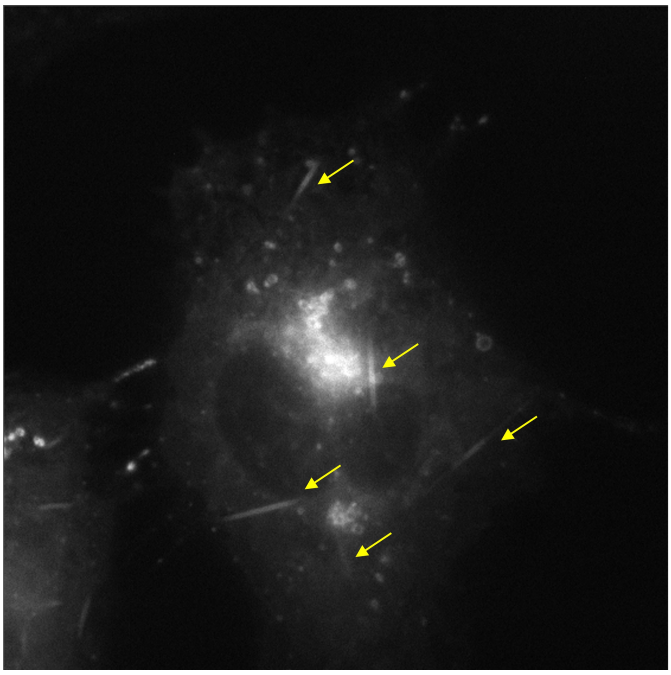

Fig.2

工夫とコツ

オルガネラマーカーは、オルガネラ局在タンパク質と蛍光タンパク質の組み合わせによって、目的のオルガネラ以外にも局在したり、オルガネラの構造を変えてしまうことがある。当研究室から提供しているプラスミドに関しては、Cos-1細胞およびHeLa細胞で局在を観察し、いくつかの組み合わせではmislocalizationが起こりやすいことを確かめている。こういった場合には組み合わせを変える他にも、原因となる塩基を特定して変異を入れるアプローチも有用である。例えばミトコンドリアマーカーについては、蛍光タンパク質のフォールディング効率を下げることでmislocalizationを抑えられる【参考文献】。
オルガネラマーカーの中には発現量が高くなるほどmislocalizationが起こりやすくなるものもあるため、初めて用いるマーカーについてはトランスフェクション量の検討を推奨する。
参考文献において近赤外色蛍光タンパク質として用いたiRFP713は、オルガネラ局在タンパク質との組み合わせによって、細胞内に針状の構造を形成することがある【図2: iRFP-Rab5】。

参考文献

S. Kashiwagi, Y. Fujioka, A.O. Satoh, A. Yoshida, M. Fujioka, P. Nepal, A. Tsuzuki, O. Aoki, S. Paudel, H. Sasajima and Y. Ohba. 2019. Folding Latency of Fluorescent Proteins Affects the Mitochondrial Localization of Fusion Proteins. Cell. Struct. Funct., 44: 183-194.