

DeltaVision Elite を用いた SCAT3.1 FRET プローブによる アポトーシス誘導評価

DeltaVision Elite は細胞に関わるさまざまな情報を高解像度かつ三次元で撮像できるイメージングシステムです。励起光源にレーザーを使用しないため、光毒性を最小限に抑えた生細胞の解析が可能です。細胞内微細構造、局在情報や神経シグナル伝達情報などの微細画像情報を必要とするさまざまな細胞解析のニーズに応えます。

はじめに

GFP 遺伝子の変異により作製された CFP (Cyan Fluorescent Protein) や YFP (Yellow Fluorescent Protein) を適切な距離・角度で配置させることで、FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer: 供与体の CFP を励起すると、その励起エネルギーが受容体の YFP へ移動する現象) が起こることが知られています。

本報では、励起光源にレーザーを使用せず光毒性を最小限に抑えた高解像度顕微鏡 DeltaVision Elite と、アポトーシス検出用 FRET プローブである、SCAT3.1 を用い、生体組織が形成、成長するうえで重要な役割を果たしているプログラミング細胞死 (アポトーシス) の蛍光 Time-Lapse Imaging と定量解析を行いました。

実験内容

使用した製品

DeltaVision Elite

COOLSNAP ES2 Camera

7 Color Combined InsightSSI*

40x Oil PSF Objective 1.30 NA, 0.2 mm WD

Environmental Chamber

Ultimate Focus Laser Module

SoftWoRx 6.1.1

* CFP、YFP 光源を含む。

サンプルおよび試薬

SCAT3.1 FRET probe 導入 HeLa 細胞

Anti-Fas (CD95) mAb (MBL : SY-001)

シクロヘキシミド

DMEM w/o Phenol Red (GE Healthcare)

Nunc Lab-Tek II カバーガラスチェンバー (Thermo Fisher Scientific : 155409)

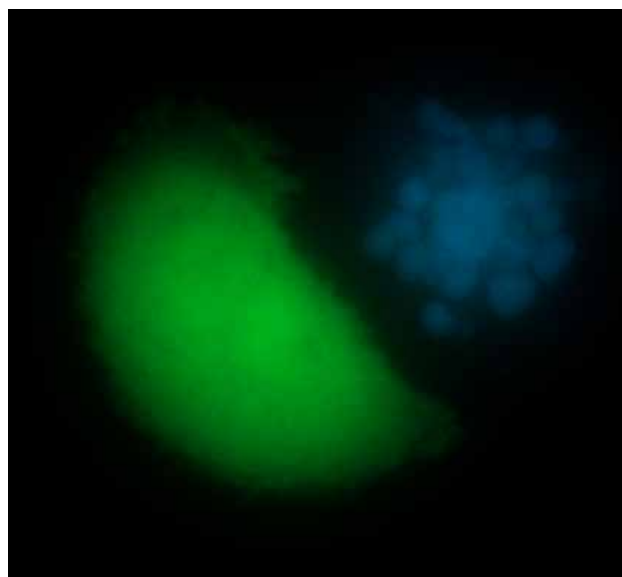


図 1. SCAT3.1 FRET プローブ

活性型 Caspase-3 用 FRET プローブである SCAT3.1 は、蛍光ドナー (ECFP) と蛍光アクセプター (Venus) とを Caspase-3 の基質となるプロテアーゼ認識配列を含むリンカーでつないだアポトーシスセンサーです。通常、SCAT3.1 を ECFP の励起波長付近である 435nm で励起した場合、ECFP から Venus への FRET が起こり、Venus の蛍光である 530nm の蛍光が検出されます。しかし、活性型 Caspase-3 によりリンカーペプチドが切断されると、ECFP と Venus が切り離され FRET が解消されることにより、ECFP の蛍光である 475nm 付近の蛍光が観察されます。この原理を利用して、アポトーシス誘導に伴う Caspase-3 の活性化を 530nm と 475nm の蛍光強度の比より算出することができます。

取扱店

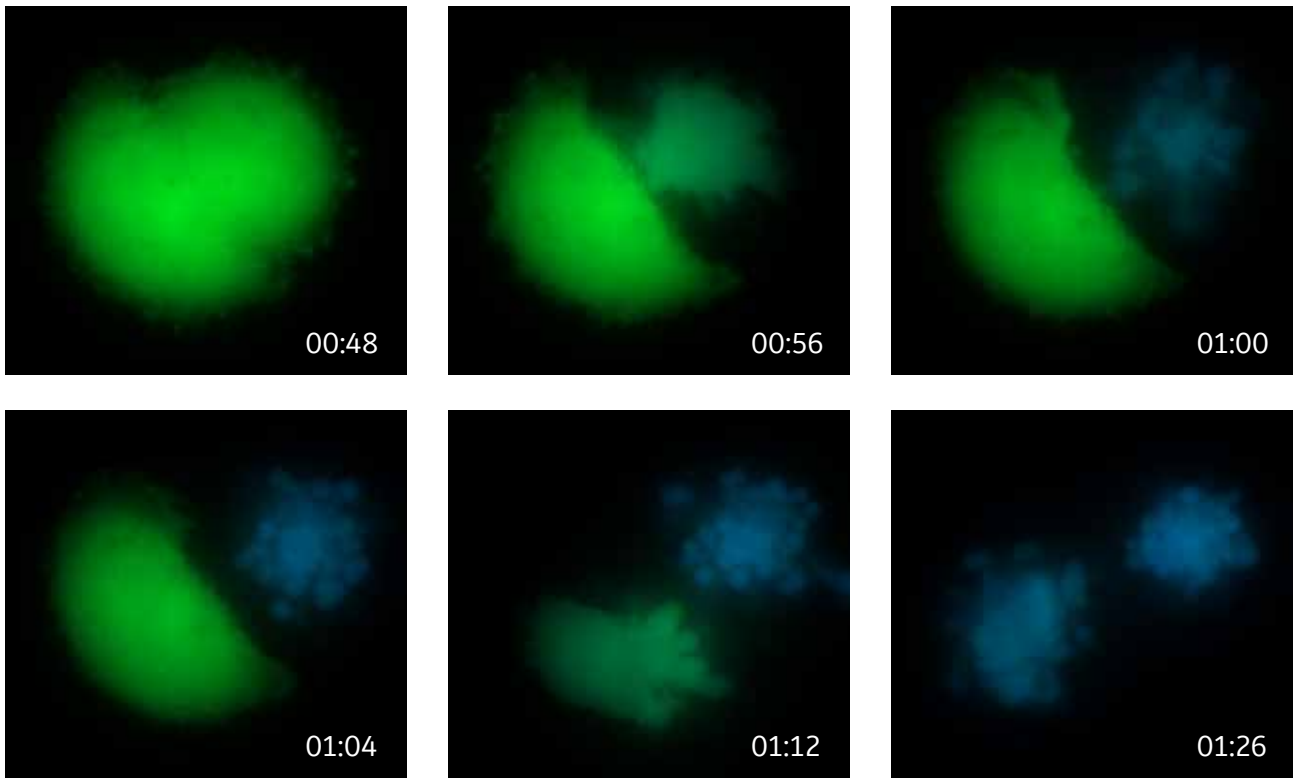


図 2. DeltaVision Elite による撮影画像

(青) ECFP、(緑) Venus。各時間は、時間：分を示します。

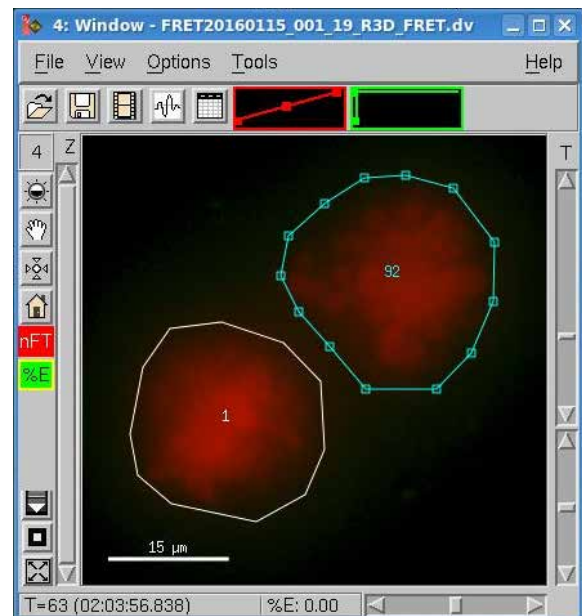
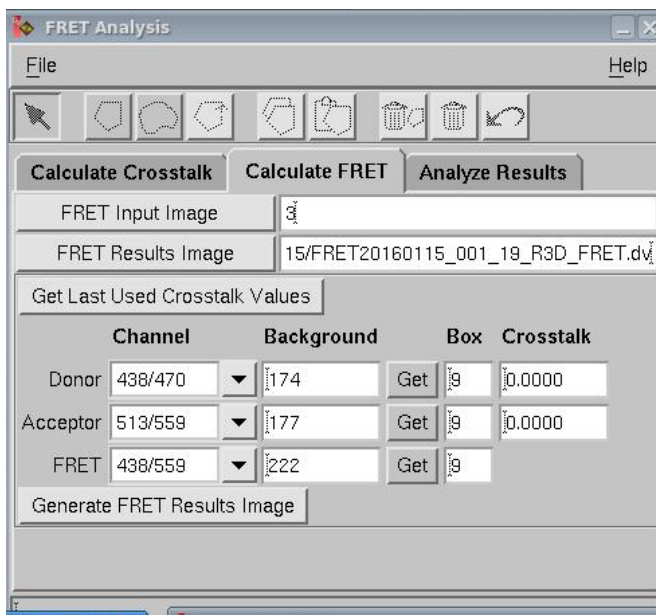


図 3. SoftWoRx の FRET Analysis Tool

蛍光シグナル領域およびバックグラウンド領域指定して、FRET チャンネルの蛍光強度および FRET 効率の算出を行いました。

方法

8 ウェルのカバーガラスチェンバーを用いて、DMEM/10% FCS 培地 (pH 指示薬なし) でウェルあたり 10,000 細胞を播種し、一晚培養後、200 ng/mL Anti-Fas (CD95) mAb および 5 μg/mL シクロヘキシミドを添加した培地に置換しました。アポトーシス誘導 3 時間

後から DeltaVision Elite による撮影を開始しました。DeltaVision Elite は撮影開始 3 時間前から 37°C にプレインキュベートしました。撮影中にはサンプルカバー内に 5% 加湿 CO₂ を流し、Ultimate Focus Laser Module によるフォーカスの維持を行いました。

撮影された画像については、SoftWoRx の標準機能である FRET Analysis Tool を用いて解析を行いました。

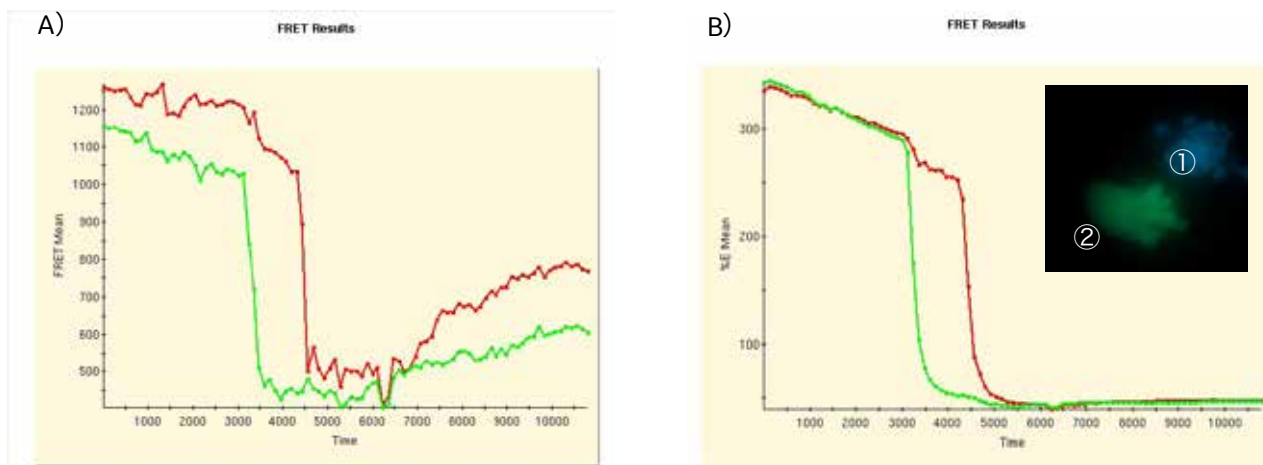


図 4. SCAT3.1 FRET プロブによる、アポトーシス誘導の評価

SoftWoRx の FRET Analysis Tool を用いて、ROI を囲った 2 つの細胞について、バックグラウンド削除、および FRET 効率の算出を行いました。(A) FRET mean : FRET Channel の蛍光強度からバックグラウンドを差し引いた値を示します。(B) FRET Efficiency (% E) : FRET Channel (ECFP 励起 -Venus 蛍光の蛍光強度) / Donor Channel (ECFP 励起 -ECFP 蛍光の蛍光強度)。緑線は①の細胞、赤線は②の細胞の変化を示します。

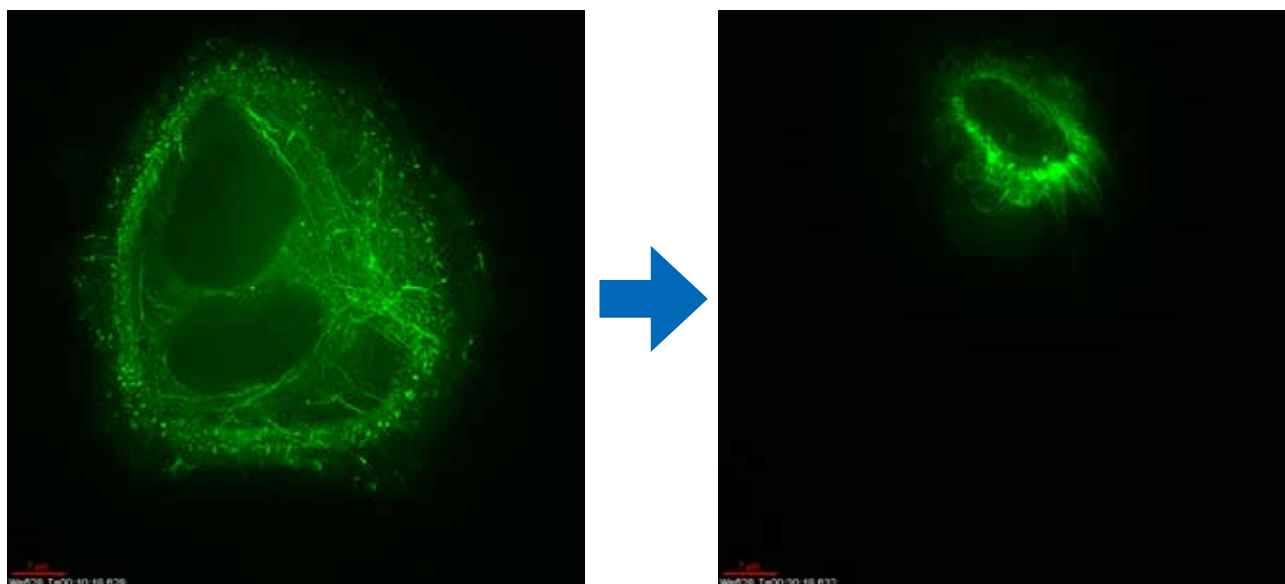


図 5. 細胞膜に GFP を発現させた HeLa 細胞によるアポトーシス誘導の観察

結果

ウェル中の複数ポイントを、40 倍の対物レンズを用いて、2 分毎 180 分のタイムラプス測定を行いました。そのうちの 1 視野に関して 48 分から 1 時間 26 分までの蛍光イメージを図 2 に示します。48 分の時点で、細胞膜上にプレビングの様子が確認され、56 分には 1 つ目の細胞において FRET による蛍光の変化および細胞の収縮が確認されました (図 2)。

DeltaVision Elite 標準ソフトウェア SoftWoRx では、FRET Analysis ツールにより、バックグラウンド削除から

FRET 効率の解析までを行うことができます (図 3)。その結果、Anti-Fas (CD95) 抗体によるアポトーシス誘導を数値化することができました (図 4)。

本報では、SCAT3 FRET プロブ導入 HeLa 細胞を用いて、SCAT3 のシグナル活性を評価しましたが、細胞膜や細胞骨格に GFP を発現させた細胞株を用いることで、シグナル活性だけでなく、細胞膜のプレビングの様子といった詳細な形態変化をタイムラプス撮影することが可能です (図 5)。

まとめ

- ・DeltaVision Elite を用いることで、SCAT3.1 FRET プロローブによるアポトーシス誘導の経時的な評価ができました。
- ・DeltaVision Elite では、レーザー光源を用いずに高解像度画像の取得が可能であるため、細胞への光毒性を最小限に抑えて、アポトーシス評価を行うことができます。
- ・Ultimate Focus Laser Module により、長時間の撮影であっても安定したフォーカスの維持が可能です。
- ・細胞膜や細胞骨格に GFP を発現させた細胞株を用いることで、シグナル活性だけでなく、細胞膜のプレビングの様子といった形態変化を詳細に観察できます。

引用文献

Takeharu Nagai and Atsushi Miyawaki, A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:72-77 (2004).

サンプルご提供

京都大学

生命科学研究所高次遺伝情報学

酒巻 和弘先生

www.gelifesciences.co.jp

e-mail で最新情報をお届けしています。お申込みは上記 Web サイト左下の「メールマガジン購読」から

GE ヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336 FAX：03-5331-9370

e-mail：Tech-JP@ge.com



Intertek

ISO 9001:2008
認証取得

掲載されている価格は2017年9月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。