

大腸菌で発現誘導された GFP 強度の画像解析による測定

本実験は、inducer による遺伝子発現制御を理解するために、その遺伝子発現制御を受ける翻訳産物である Green Fluorescent Protein: GFP の蛍光強度を測定するとともに、蛍光観察における励起光(excitation light)と蛍光の関係および波長フィルターの必要性(共焦点レーザー顕微鏡や落射蛍光顕微鏡では波長フィルター (光学フィルター)を用いているが、この実験では簡易的に R, G, B 強度を画像解析ソフト ImageJ によって解析する。)と ImageJ の基礎的な使用法を学ぶことを目的としている。また、catabolite repression に付いても理解を深める事を目的としている。

pGLO plasmid

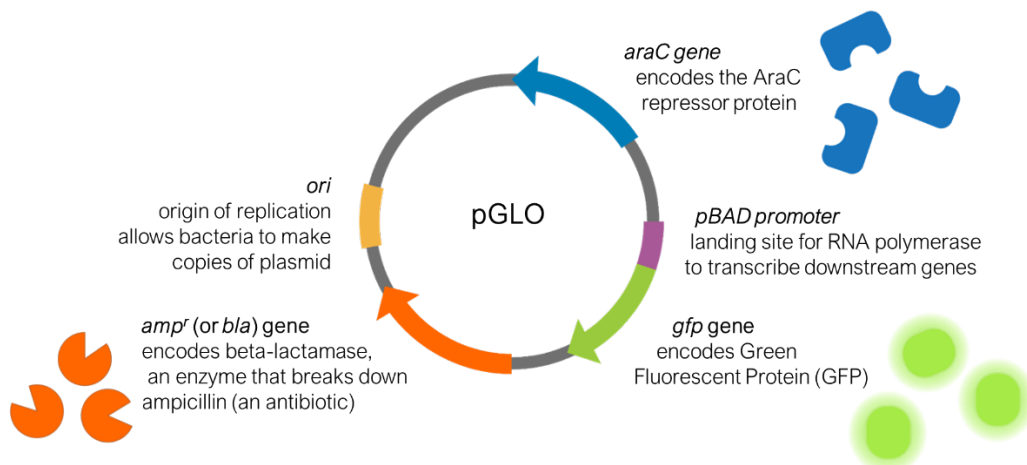


Figure 1. pGLO の構造。Bio-Rad の HP(https://www.bio-rad.com/ja-jp/education/overlay/powerpoint-presentation-for-classroom-use?ID=pGLO-Bacte_1610053107)の pGLO_Bacterial_Transformation_Kit_Presentation.pptx より引用。

プラスミド pGLO (Figure 1)には α GFP がコードされている。 α GFP は avGFP (二つの励起ピーク波長($Ex \lambda$): 395 nm / 475 nm [395 nm の方が励起効率高い], 最大蛍光波長($Em \lambda$): 509 nm (<https://www.fpbases.org/protein/avgfp/>))の変異体(Q80R/F99S/M153T/V163A)であり、avGFP より蛍光が強化されている。最大励起波長が紫領域であり使用する紫 LED の波長が 395-410 nm であることと最大蛍光波長が緑であるため、画像解析ソフト ImageJ を用いて RGB で分ければ励起光と蛍光を簡単に分離できる。(α GFP: $Ex \lambda$: 397 nm, $Em \lambda$: 506 nm) (<https://www.fpbases.org/protein/alphagfp/> 参照。なお、研究においてよ

く用いられている eGFP (M1_S2insV/F64L/S65T/H231L)は、その $Ex \lambda$: 488 nm, $Em \lambda$: 507 nm と励起光と蛍光の波長が近いこと、波長フィルター〔光学フィルター〕を用いる必要がある。ただし、eGFP の至適励起光である青光は α GFP の至適励起光である紫光に比べ波長が長いこと、細胞に与えるダメージは少ない。) 大腸菌中の pGLO にある α GFP の遺伝子は AraC タンパク質と *pBAD promoter* によって発現制御されていて、L-arabinose (Figure 2)によって発現が誘導され、cyclic AMP によって catabolite regulation を受けている。この実験では、様々な濃度の L-arabinose 溶液を培地上の生育した大腸菌に添加することによって、誘導の閾値と強さや catabolite repression を画像解析によって観察する。なお、AraC タンパク質と *pBAD promoter* による遺伝子発現システムについてもレポートで説明すること。生物に物質生産させる場合に inducible promoter の利用は極めて重要である。構成的な発現をもたらす constitutive promoter の使用と比較してどのような利点があるのかを考察せよ。

宿主である *Escherichia coli* の異なる 2 種類の株 HB101 と DH5 α の遺伝子型は、

HB101: F⁻ *thi-1 hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44 recA13 ara14 leuB6 proA2 lacY1 galK2*

rpsL20(str^R) xylA5 mtl-1

と

DH5 α : *deoR supE44 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 Δ (lacZYA-argF)U169 Φ 80 Δ lacZ Δ M15 F⁺*

である。この二つの宿主の遺伝子型において注目すべきものは *ara14* の有無である。*ara14* は L-arabinose 資化に関わるどの遺伝子に変異が入っているのかについては不明であるが、L-arabinose 資化不能であることを表している。つまり、HB101 と DH5 α は L-arabinose 資化能を持たないものと持つものである。それによって、glucose 枯渇時における L-arabinose の添加によって細胞内 cyclic AMP と L-arabinose の濃度に変化が生じる。それが AraC タンパク質と *pBAD promoter* による遺伝子発現システムに及ぼす影響を観察する。

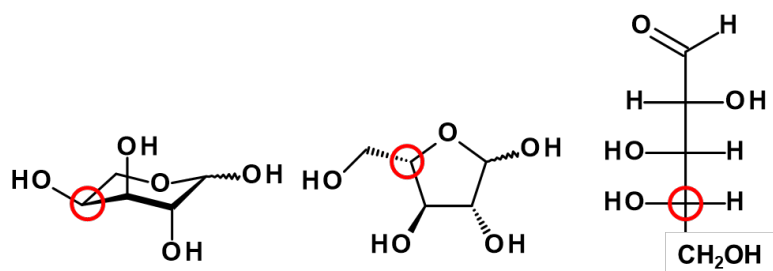


Figure 2. L-arabinose の構造。

左：arabinopyranose と中：arabinofuranose と右：開環型の Fischer projection。Pentose の一種。自然界の多くの糖とは異なり，L 体が多い(糖においては carbonyl group から最も遠くにあるキラル中心の炭素原子(赤丸)における立体配置において D, L を判定する)。分子量：150.13。

iPhone に対する注意事項

iPhone で撮影した写真を ImageJ や Windows PC で開けないことが多々ある。iOS や MacOS で HEIF (High Efficiency Image File Format) という画像ファイル形式が採用され，その拡張子は「.HEIC」である。この画像ファイル形式に ImageJ が対応していないからである。

- ・対処法 1 ImageJ 以外の画像表示ソフトで画像ファイルを開いて「JPEG」や「PNG」や「GIF」に変換して保存してから ImageJ で開くか，画像を開いた後に画像をコピーして ImageJ を立ち上げておいてメニューから Edit > Paste をする。

- ・対処法 2 iPhone に対して (1) 設定 App を起動する，(2) 「カメラ」→「フォーマット」の順にタップする，(3) 「互換性優先」を選択すると，「.JPG」で保存されるようになる。それを PC に送る。

- ・対処法 3 iPhone に対して (1) 設定 App を起動する，(2) 「写真」→「Mac または PC で転送」欄の「自動」を選択してから，iPhone と PC を USB ケーブルで繋いで，写真ファイルを PC に転送する。

- ・対処法 4 PC で (1) web browser 上で Google フォトを起動する，(2) iPhone から送られてきた「.HEIC」の画像ファイルを，Google フォトの画面にドラッグアンドドロップしてアップロードする，(3) Google フォトの画面上で，その画像ファイルに対して右クリックし「名前をつけて画像を保存」を選択する，(4) 拡張子を「.JPG」形式に書き換えて PC に保存する。

・対処法 5 Mac がある場合、「.HEIC」ファイルを Mac に転送した後、その画像ファイルに対して、(1) プレビュー画面の「ファイルメニュー」→「書き出す」をクリックする、(2) 書き出し名などを入力する画面が表示されたら、変換したいフォーマット「JPG」、「PNG」などを選択する、(3) 名前・タグを入力し、場所を選択して保存する、(4) それを Windows PC へ転送する。

語句説明

1・ImageJ の Results の window に表示される用語説明

Area: 測定したスポットの面積

Mean: 平均値(*Area* 内のドットの *Density* の和 *Integrated Density* を *Area* で除したもの)

Min: 最小値(バックグラウンドの強度とほぼ同じ値の場合はバックグラウンド部分も含んでいると考えられるが、*CTF* を算出する際にバックグラウンドを差し引くので問題ない。)

Max: 最大値(255 の場合には飽和しているので、実際の値はそれ以上と考えられる。)

2・CTF: Corrected total fluorescence

Integrated Density (IntDen): $Area \times Mean$

$CTF = Integrated\ Density - (Area\ of\ spot \times Mean\ fluorescence\ of\ background\ readings)$

$= Area\ of\ spot \times (Mean\ fluorescence\ of\ spot - Mean\ fluorescence\ of\ background\ readings)$

(**CTF を算出する場合の *Area* は測定した蛍光スポットの面積**であって、バックグラウンドを測定した部分の面積ではないことに注意すること。)

実験操作

1. pGLO を保持している大腸菌が一面に生えているアンピシリン含有 LB プレート(午前中早めに培養液をプレートに塗布して培養 3-4 時間)に L-arabinose の異なる濃度の溶液を別々の場所に 10 μ L ずつスポットし(Figure 3 参照), シャーレの蓋をせずに紫光を照射して写真を撮る。その際、実験室のブラインドを下ろして閉め、照明も消す。場所による照射むらや影ができないように 4 本のスタンドにそれぞれ 1 本ずつ固定した 4 本の紫光のライトで四方から照射した状態で、できるだけ真上からデジタル写真を撮影後、シャーレに蓋をして 2 時間 30 分間 37°C で培地を下にして静置培養する。(通常の培養とは培地の上下を逆にする。スポットした液が流れないように。)

2. 培養後にシャーレの蓋を外し、1.と同様に紫光を照射してデジタル写真を3枚撮る。この際、シャッタースピードや絞りやISOを変えて写真を撮ることが望ましい。撮影条件を記録するか、写真ファイルのプロパティで確認する。(蛍光強度が255と飽和状態になるのを避けるため)PCに写真のファイルを転送する。
3. ImageJを立ち上げ、写真ファイルをFileメニューの“Open...”から開く。
4. 緑色蛍光を解析するために、写真のRGB情報からGreenの情報だけを分離して解析する必要がある。そのために、Imageメニューから、“Color”>“Split Channels”を選択する。すると、写真のred, green, blueの情報がそれぞれGray modeの画像として三つのwindowで表示されるので、greenのものを以降の操作に用いる。この時、RGBの各windowの画像について特徴を考察すること。
5. Analyzeメニューから“Set Measurements”を選択し、Area, Min & max gray value, Integrated density, Mean grey valueにチェックを付けて選択してOKを押す。
6. Greenの画像window上のスポットの形状に合わせて○, □, フリーハンドをselection toolの中から選択する。

selection toolでの共通事項

画像window上に矢印を持って行く：＋マークになる。

＋マーク：範囲指定の作成。また、既存の選択範囲がある場合には新たにクリックすると既存の範囲の解除と新規作成モードになる。

＋マークの時にShiftを押す：既存の選択範囲に加えて新たな範囲を加える、つまり複数の範囲を選択可能になる。

選択された範囲の周縁部に＋マークを近づけると指マークに変わる：範囲の形状を変形可能。

選択されたものの中心部に＋マークを持って行くと矢印マークに変わる：選択範囲をドラッグによる移動可能。

7. 解析する一つのスポットを選択して外縁に沿って範囲を指定する。
8. Analyzeメニューから“Measure”を選択する。Resultsが新しいwindowとして出てくる。測定後、画像のwindowに＋マークを持って行きクリックして選択を消す。もしくは、同じ形状であれば選択された部分を矢印マークでドラッグして目的の位置まで移動させる。
9. 6. ～ 9.を測定したいスポットの数だけ繰り返す。結果は、Resultsのwindowに新たな行として付け加えられていくので、どの行がどのスポットと対応するのか

を記録しておく。Max が 255 の場合には光量が飽和しているので、写真ファイルのプロパティを調べて、カメラをマニュアルモードにして、プロパティより ISO を下げたり、絞りを絞ったり、シャッタースピードを速くしたりして写真を撮り直して、解析をやり直す。

10. スポットしていなくて蛍光を発していない部分をバックグラウンドとして選択し、同様に測定する(別々の場所を最低3ヵ所測定し、それらの *Mean* の値の平均をバックグラウンドの値(*Mean fluorescence of background readings*)とする。厳密に言えば、バックグラウンドとして選択した箇所の領域の *IntDen* の合計をそれらの *Area* の合計で除したものがバックグラウンドの平均となる。)。バックグラウンドを測定する場合には蛍光を発していない場所であれば、場所の広さや形に拘る必要はない。
11. Results の window のデータを Results の window にある“File”>“Save As ...”で名付けて保存すると csv 形式のファイルになるので、それを Excel などの表計算ソフトで開く。CTF を①～⑧のスポット毎に算出する。
12. 3.~12.の操作を3枚の全ての写真に対して行う。
13. プレートに蓋をして実験台上に放置して、翌日にも写真を撮って同様の解析を行う。
14. CTF のデータをグラフ化して、L-arabinose の濃度によって蛍光強度がどのように変化したか、閾値や濃度依存性について考察する。宿主 HB101 と DH5α のアラビノース資化能欠損をもたらす *ara14* の有無によって GFP の発現がどう変わったのかについても考察すること。

Table 1 L-arabinose の希釈液調製法

スポット番号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
arabinose濃度 (mg/mL)	200	100	50	40	30	20	10	0
200 mg/mL of L-arabinose (μL)		100 of ①	0	0	0	0	0	0
Diluted sol. (μL) of L-arabinose	0	0	100 of ②	40 of ③	30 of ③	20 of ③	10 of ③	0
滅菌水 (μL)	0	100	100	10	20	30	40	
total (μL)		200	200	50	50	50	50	
最終調製後 (μL)		100	100	50	50	50	50	

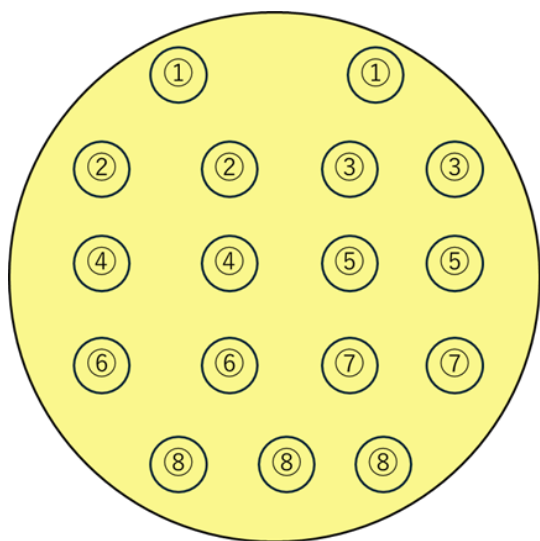


Figure 3. 丸数字は Table 1 のスポット番号に対応する。L-arabinose 溶液 10 μ L ずつを滴下する場所を○が示している。同じものを 2 カ所ずつ滴下する。(⑧は 3 カ所)⑧は滅菌水の滴下場所を示す。