

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 (Red), G (Green), B (Blue)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

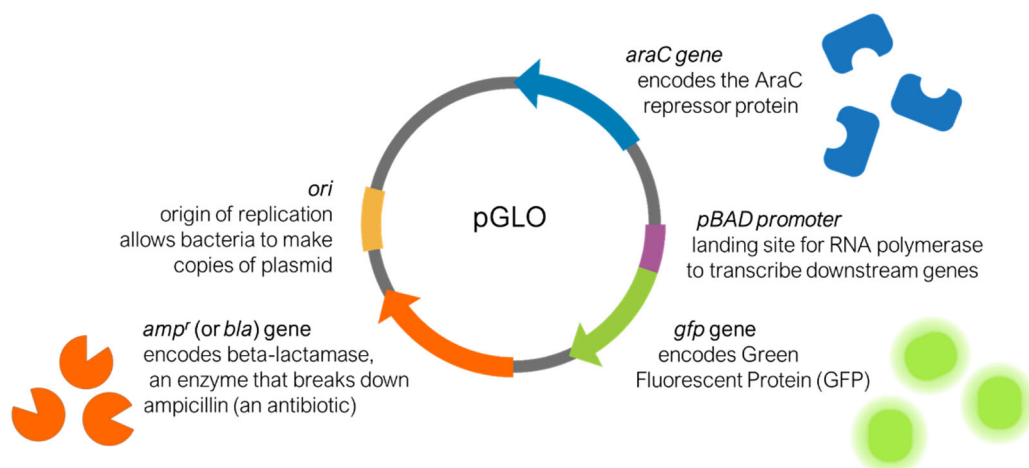


Figure 1. pGLO の構造。Bio-Rad の HP (https://www.bio-rad.com/ja-edu/education/overlay/powerpoint-presentation-for-classroom-use?ID=pGLO-Bacte_1610053107) の pGLO_Bacterial_Transformation_Kit_Presentation.pptx より引用。

プラスミド pGLO (Figure 1) には GFPuv がコードされている。GFPuv は野生型の avGFP に変異(M1_S2insA/Q80R/F99S/M153T/V163A)が入っている (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC53663.1>)。GFPuv の波長特性についての情報が見つからなかったため αGFP(Q80R/F99S/M153T/V163A)の情報を用いる。GFPuv は αGFP との違いは M1_S2insA だけである(Figure 2)。avGFP (二つの励起ピーク波長[Ex λ]: 395 nm / 475 nm [395 nm の方が励起効率高い], 最大蛍光波長[Em λ]: 509 nm [<https://www.fpbases.org/protein/avgfp/>]) の変異体 (Q80R/F99S/M153T/V163A) である

α GFP は、野生型である 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ため、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ため、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 3) 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、L-arabinose 資化能の有無により catabolite regulation がどのように変わり、宿主の遺伝子型によって catabolite regulation を受ける遺伝子発現の変化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 資化不能である事を表している。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。

GFPuv MASKGEELFT GVVPIVELD GDVNGHKFSV SGEGEDATY GKLTCLKICT TGKLPVPWPT LVTTFSYGVQ CFSRYPDHMK RHDFFKSAMP
αGFP M-SKGEELFT GVVPIVELD GDVNGHKFSV SGEGEDATY GKLTCLKICT TGKLPVPWPT LVTTFSYGVQ CFSRYPDHMK RHDFFKSAMP
avGFP M-SKGEELFT GVVPIVELD GDVNGHKFSV SGEGEDATY GKLTCLKICT TGKLPVPWPT LVTTFSYGVQ CFSRYPDHMK QHDDFFKSAMP

GFPuv EGYVQERTIS FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL VNRIELKGID FKEDGNILGH KLEYNYNSHN VYTADKQKN GIKANFKIRH NIEDGSVQLA
αGFP EGYVQERTIS FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL VNRIELKGID FKEDGNILGH KLEYNYNSHN VYTADKQKN GIKANFKIRH NIEDGSVQLA
avGFP EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL VNRIELKGID FKEDGNILGH KLEYNYNSHN VYIMADKQKN GIKVNFKIRH NIEDGSVQLA

GFPuv DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSTQSALSK DPNEKRDHNV LLEFVTAAGI THGMDELYK
αGFP DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSTQSALSK DPNEKRDHNV LLEFVTAAGI THGMDELYK
avGFP DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSTQSALSK DPNEKRDHNV LLEFVTAAGI THGMDELYK

Figure 2. GFPuv と αGFP と avGFP のアミノ酸配列比較

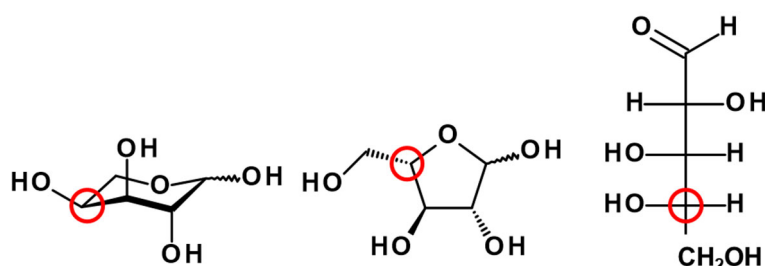


Figure 3. L-arabinose の構造。

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 2 種類の大腸菌の培養液を 1 種類につき 0.3% L-arabinose 含有、0.3% L-arabinose と 0.3% D-glucose 含有と糖無添加のアンピシリン含有 LB ブ

レート之三枚に 40 μ L ずつ塗布する。写真を撮る際には、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 37°C で培地を上にして一晩静置培養する。

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。翌日も同様に写真撮影する。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である。飽和状態になっていたら、露光時間を短くするか、絞りを絞るか、感度を下げる必要がある。)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 上の蛍光を発している部分に合わせて○, □, フリーハンドを selection tool の中から選択する。なお、全ての領域を計測する必要はない。

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. 解析する一つの領域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(各資料につき 3 ヶ所以上)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、記録されたプロパティより 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. 蛍光を発していない部分(糖を加えていない培地)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 ヶ所測定し、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 をスポット毎に算出する。
12. 3.~12.の操作を全ての写真に対して行う。
13. CTF のデータをグラフ化して、L-arabinose の有無と D-glucose の添加と菌株によって蛍光強度がどのように変化したかについて考察する。宿主の L-arabinose 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。