

電気細胞融合に伴う細胞質及び細胞膜の混合の経時観察

Time-lapse Observation of Cytoplasm and Cell Membrane Mixing during Electrofusion

躍場 由記 指導教員 鷲津 正夫 教授

Yuki ODORIBA (Professor Masao WASHIZU)

Keywords : electrofusion, cytoplasm, cell membrane, diffusion, Qdot

1. 序論

1.1. 背景

細胞融合はバイオテクノロジーの柱として重要な科学技術であり、これからの医療や遺伝子工学への応用が期待されている。細胞融合では、融合する細胞の細胞膜を結合させて細胞同士を融合する。細胞膜は、細胞内部と外界を仕切る役割を持ち、細胞融合により、融合した細胞同士の外界との仕切りがなくなることで、細胞質の混合が行われる。また、細胞膜の基本構造は、脂質二重膜上に種々の膜タンパクが浮遊する構造をしていると考えられており(流動モザイクモデル[1])、脂質や膜タンパクは二重層上を自由に動くことができる。そのため、融合細胞のそれぞれの細胞膜が連結されるため、細胞膜の脂質や膜タンパクは融合した細胞同士で自由に移動できると考えられる。

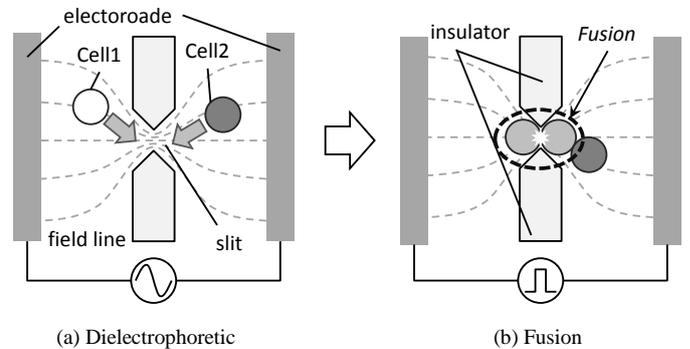
当研究室では、抗原提示細胞である樹状細胞とがん細胞を、電気細胞融合技術を利用して融合させ、がん細胞の細胞質や細胞膜にある物質を樹状細胞に移植する研究が行われている。融合した細胞は、核融合を起こさないために樹状細胞とがん細胞を切り離す。そのため電気細胞融合において、細胞質や細胞膜が混合する時間を知る必要があるが、細胞質や細胞膜の融合がどれくらいの時間で起こるか明らかになってない。

本研究では、電気細胞融合において、細胞質・細胞膜の混合を経時的に観察し、混合の定量的評価を行うことを目的とする。

2. 実験方法

2.1. 細胞融合法

細胞融合は、電界集中型細胞融合技術を用いて行った。電界集中型細胞融合では、電界集中を利用するため、電極間にスリットをもつ絶縁体を配置する。高周波の交流電界中では細胞は誘電体として振る舞うため、誘電泳動によって電界が集中している開口部に細胞が引き寄せ、融合させる細胞の対を作る (Fig 1. (a)). その後、パルスを印加することで、細胞膜を可逆的に破壊する。細胞膜同士が接している状態でパルス電圧を印加すると、可逆的に破壊された部分の細胞膜が修復する際に、2つの細胞膜が混ざり合うことで、膜が接している細胞同士が融合する。電界集中により、膜破壊はスリット部のみで起こり、細胞対になっている細胞同士の1:1の融合が可能である (Fig 1. (b)). 電界集中型細胞融合では、融合する細胞をスリットに保持して



(a) Dielectrophoretic

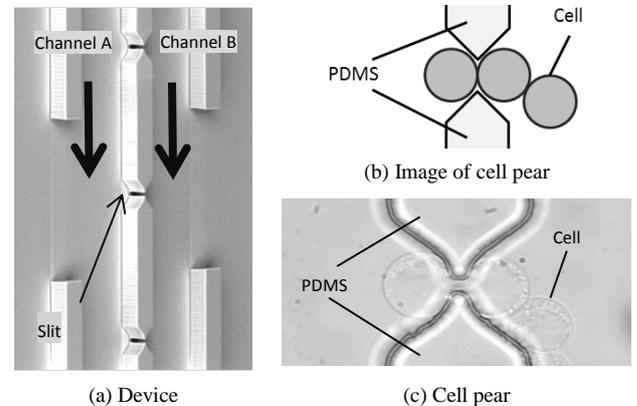
(b) Fusion

Fig. 1 Field-constriction-based electrofusion mechanism

おけるため、融合する細胞の観察を容易に行うことができる。

2.2. 融合デバイス

電界集中型細胞融合を行うために、絶縁体としてPDMSを使用した流路を作製した (Fig. 2). Fig. 2(a)の流路 A, B にそれぞれ融合したい細胞を流し、誘電泳動によりオリフィス部に細胞対をつくる (Fig. 2(b),(c)). 細胞対がある状態でパルスをかけて、細胞融合を行う。



(a) Device

(c) Cell pear

Fig. 2 Fusion device

2.3. 融合に使用する細胞と融合条件

融合細胞には、ヒト白血病 T リンパ腫細胞である Jurkat を使用した。バッファはソルビトール 100mM を使用した。バッファは融合がしやすい低張液に調整している。交流電界を発生させるために印加する交流電圧は 6V, 融合のためのパルスは 6V, 100 μ s を印加した。

2.4. 細胞質の染色及び細胞膜の標識

細胞質の染色には Calcein-AM を使用した。Calcein-AM 自体は蛍光を示さないが、細胞膜を透過して細胞に入ると、細胞質内で蛍光色素である Calcein へと加水分解される。Calcein は膜不透過性であり、細胞膜が破壊されない限り細胞内に存在し続けることができる。Calcein の蛍光を観察することで、融合の確認と

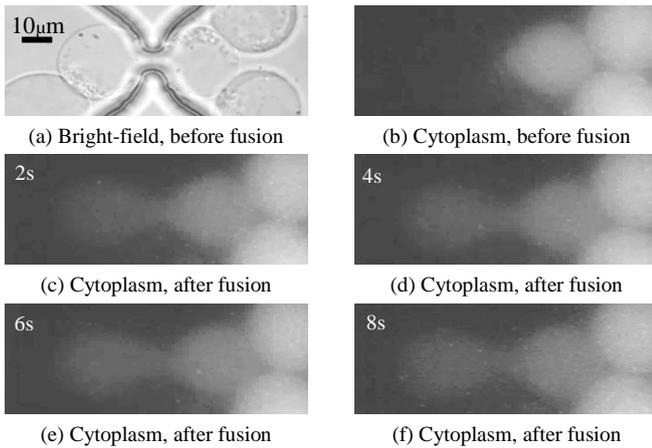
細胞質の混合を観察した。

膜タンパクの標識のために、片端に NHS 基を持ち、もう片端にビオチンが配置されている NHS ビオチン (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。膜タンパク表面にあるアミノ基と NHS ビオチンの NHS 基を結合させ、NHS ビオチンのビオチンとストレプトアビジン付き Qdot のストレプトアビジンを結合させ、膜タンパクに Qdot を標識した。

3. 実験結果及び考察

3.1. 細胞質の混合

融合による細胞質の混合を確かめるため、細胞質を染色した細胞と染色していない細胞の融合を行った。融合すると、細胞質を染色した右側細胞の輝度は減少し、染色していない左側細胞の輝度は増加しており、細胞質が混合している様子を観察した (Fig. 3 (b) - Fig. 3 (f))。また、Fig. 4(a)に示す細胞の Calcein の輝度を計測した。Fig. 4(b)に輝度変化のグラフを示す。パルスを印加したあとの Cell1 と Cell2 の蛍光色素の輝度変化は指数関数的に変化している。これより輝度変化の時定数を算出した。時定数は、輝度が変化した範囲の 63% になる時間を算出した。算出した結果、Calcein の蛍光の輝度変化の時定数 1.2 秒であった。



Left cell: Not stained cell, Right cell: Stained cell

Fig. 3 Fusion of cytoplasm

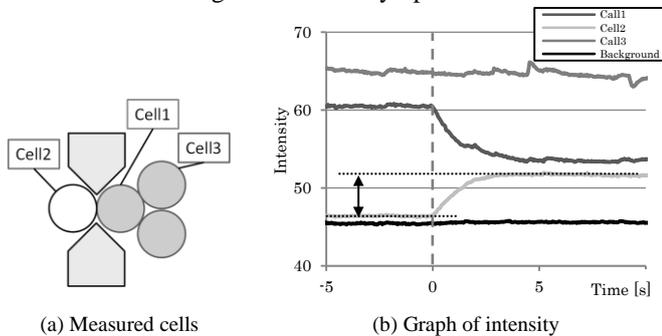
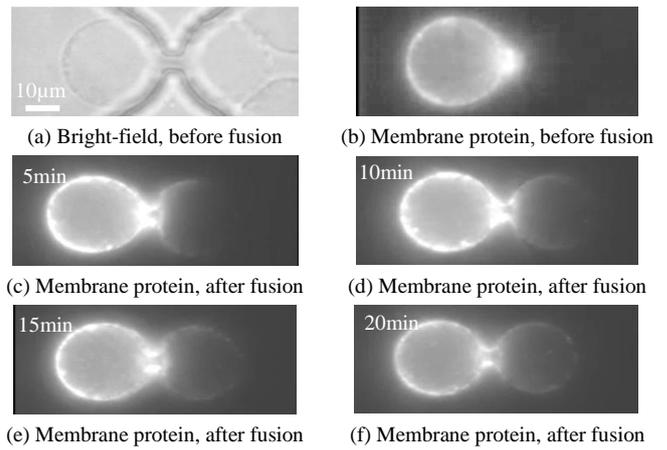


Fig. 4 Time-dependent changes in the intensity of calcein

3.2. 細胞膜の混合

融合後 5 分経過すると、膜タンパクを標識していない右側の細胞から膜タンパクが観察された (Fig. 5(b))。時間が経つに連れて膜タンパクが混合していった (Fig. 5(b) - Fig. 5 (f))。



Left cell: Stained cell, Right cell: Not stained cell

Fig. 5 Fusion of membrane protein

細胞膜の拡散の拡散係数を求めるため、一定時間間隔における Qdot の位置 R の平均二乗変位 $\langle R^2 \rangle$ を測定した。Qdot の位置が t 秒から Δt 秒後に動いた距離は、式(1)で表される。

$$\langle R^2 \rangle = \left\langle \left(\bar{R}(t + \Delta t) - \bar{R}(t) \right)^2 \right\rangle = 4D\Delta t + A\Delta t^2 \quad (1)$$

ここで、 A は定数であり、 D は拡散係数である。Qdot の位置は、Qdot で標識していない細胞から見える Qdot の蛍光の先端とした。各 Δt における平均二乗変位とその近似式を求め、式(1)の Δt の項の係数より拡散係数を求めると、 $D \sim 0.025 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と算出された。

生体膜の拡散係数は、標識した膜分子の動態を追跡することによって実験的に決定される。生体膜の拡散係数は $0.19 \sim 2.93 \mu\text{m}^2/\text{s}$ という報告がある[3]。今回の実験結果では、報告の値と比べ、オーダーが 1 つ小さい。報告にある膜分子を標識した蛍光物質に比べて、本研究で使用した Qdot の方が重たいため、膜タンパクが動きづらく、拡散係数が小さくなったのだと考えられる。

4. 結論

電界集中型細胞融合法を使用して、細胞質・膜タンパクを染色・標識し、それらの混合を観察した。細胞質を染色した細胞の融合では、細胞質の混合により蛍光色素の蛍光が移っていく様子を観察した。色素の輝度より混合の時定数を算出した結果、時定数は 1.2 秒であった。膜タンパクを標識した細胞の融合では、蛍光物質の蛍光が膜タンパクを標識していない細胞の細胞膜上に広がっていく様子を観察し、拡散係数は $0.025 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と算出された。

参考文献

- [1] Singer SJ, Nicolson GL, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes", Science, 18, (1972), pp.720-731.
- [2] Techaumat B, Wasizu M, "Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells", J.Phys. D:Appl. Phys. 40, (2007), pp.1831-1837.
- [3] Murase K, et al., "Ultrafine Membrane Compartments for Molecular Diffusion as Revealed by Single Molecule Techniques", Biophys J, (2004), 86(6), pp.4075-4093.