

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790531

研究課題名（和文）新しい細胞内分子診断法の開発～蛍光相関分光法の臨床検査への応用～

研究課題名（英文）Development of a novel inspection method to observe intracellular molecular movement: an application of fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

研究代表者

田中 正太郎（TANAKA SHOTARO）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90380667

研究成果の概要（和文）：Fc 領域特異的に蛍光色素を標識した抗 GFP モノクローナル抗体を、HeLa 細胞の PKC β -GFP 安定発現株にマイクロインジェクションした。蛍光相互相関分光法（FCCS）により抗原抗体複合体が確認されたが、PKC β の機能は阻害された。そこで観察対象を protein 4.1R に変更し、ハイブリドーマよりモノクローナル抗体を調製、Fab 断片を得た。現在細胞内での抗体機能を確認中である。

研究成果の概要（英文）：Anti-GFP mouse monoclonal antibody was labeled specifically on Fc region by red fluorescent dye. The antibody was injected into HeLa cells that stably expressed PKC β -GFP. The formation of specific interaction between the antibody and PKC β -GFP in the cells was demonstrated by analyzing with fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS), but the interaction completely inhibited the translocation function of PKC β to plasma membrane. To avoid the formation of antibody cross-linking, a Fab fragment was prepared from anti-protein 4.1R antibody expressed by hybridoma, as a new candidate of the present study. Now the antibody function of the Fab fragment is being verified in the cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査医学

キーワード：蛍光相関分光法（FCS）、マイクロインジェクション、モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

（1）細胞内分子診断について がんや遺伝子疾患などの様々な病的細胞では、細胞内分子の表現系（量・コンフォメーション・分布・動態・修飾状態・機能など）に異常が認められる。このような異常を病変マーカーとして新たに定義し、簡便に観測することができ

ば、形態的・免疫組織化学的に判定しにくい疾患の新たな診断法となる（細胞内分子診断）。しかし現状では、臨床利用に即した方法は存在せず、将来的な課題となっている。

（2）蛍光相関分光法（FCS）の現状 FCS は分子の「ゆらぎ」を指標にすることで、細胞内微小領域（ $1 \times 10^{-16} \text{ l}$ ）にある分子の数と大

大きさを迅速に定量化することができる (Lippincott-Schwartz J (2001) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2, 444-456)。また非常に高感度であり、細胞内分子の天然の濃度を十分カバーする (~1nM)。FCS の応用である FCCS (蛍光相互相関分光法) を用いることで、細胞内分子の解離定数 K_d 算出が現実的なものとなった (Kim SA (2005) Biophysical J., 88, 4319-4336)。これらの方法は、細胞内の分子間相互作用を計測できる唯一の手段であり、細胞内分子診断に最も適している。ところが現状では、FCS の利用は基礎研究レベルに留まっている。

(3) 着想に至った経緯 これまでに申請者の所属する研究グループでは、FCS を用いて溶液中での細胞膜骨格タンパク質 protein 4.1 とリポソームとの結合を報告した (Takakuwa Y (1999) Biophys. Chem., 82, 149-155)。また、PKC β の細胞質から細胞膜への移行を観察した (Saito K (2003) FEBS Letter, 541, 126-131)。最近では、細胞内の ezrin, protein 4.1 の FCS データを取得している (第 82 回日本生化学会大会にて報告)。また膜タンパク質輸送に係わる細胞内分子 (単純拡散マーカー、微小管、輸送小胞) を FCS を用いてキャラクター化 (田中正太郎 (2009) 東京女子医科大学総合研究所紀要 29 巻)。申請者はこのような FCS 研究を進める中で、従来の FCS の研究方法に課題があることに気付いた。

(4) 従来の FCS 研究方法の課題 (蛍光標識化の弊害) FCS に用いられる従来の蛍光標識法には、①蛍光タンパク質との融合遺伝子を導入し発現させる方法②蛍光試薬を化学的に修飾した標的分子を細胞内に導入する方法がある (Weiss M (2008) Ann. N. Y. Acad. Sci., 1130, 21-27) (図 A)。①の方法では、機能を保持した標識化タンパク質を均一に発現させることができるが、細胞内での遺伝子発現が必須であり、遺伝子発現が困難な細胞や病理組織での利用に制限がある。②の化

学的修飾では、標識反応の制御が難しいためサンプルの品質 (標識位置、蛍光試薬の導入効率) が保たれにくく、機能も失われる場合が多い。いずれの場合にも、人為的に調製した標的タンパク質を外部から過剰供給しており、本来の標的タンパク質の細胞内動態を観測しているわけではない。

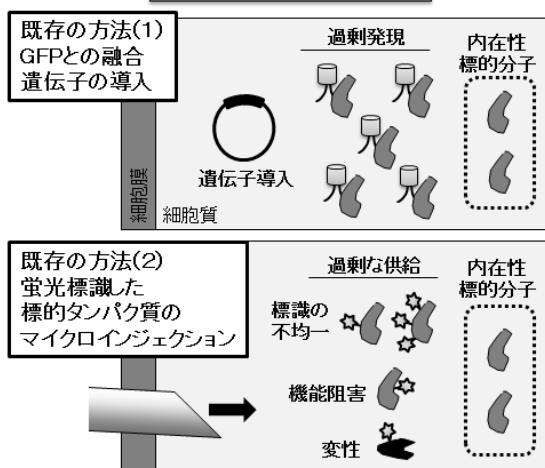
2. 研究の目的

申請者は FCS 研究を進める中で、従来の方法では①観測したいタンパク質を蛍光標識し細胞内に過剰供給しなければならない②そのためタンパク質のあるがままの状態を観測できていない、という問題があることに気付いた (図 A)。そこで、蛍光標識した抗体を直接細胞内の標的分子に結合させ観測することで、この問題を解決する (図 B)。具体的には、本研究では次の 2 点を目標に掲げた。

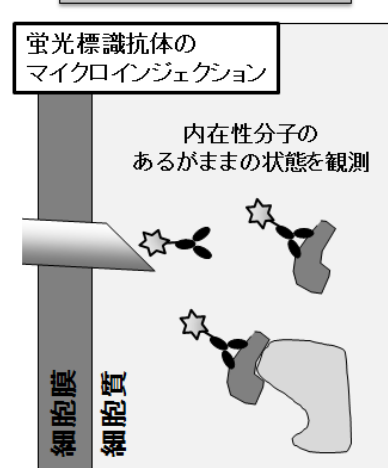
(1) FCS を用いて細胞内分子のあるがままの挙動を観測する方法を確立する。具体的には、先に挙げた FCS の課題を次のように解決する。①標的分子の機能を阻害しない蛍光標識抗体を調製し、②マイクロインジェクションで細胞内に導入、③FCS で標識分子の動態を観測する (図 B)。研究モデルには、申請者の所属する研究グループで研究実績のある PKC β を用いる。FCS データの信頼性を確保するため、生化学的手法による検証も並行して実施する。従来の標識方法を用いた実験系と比較し、本研究の優位性を評価する。

(2) 以上を達成した上で、がんや遺伝子疾患など病的細胞の細胞内診断に応用する。細胞内分子の異常とは①発現の異常 (例: がん遺伝子産物) ②修飾の異常や変性 (例: 老化産物) ③構造の異常 (例: 遺伝子疾患) である。これらのあるがままの細胞内動態をとらえ、正常細胞との違いを明らかにし、新たな病変マーカーとして定義する。汎用性の高い観察法を確立し、「細胞内分子診断」の基礎技術として提案したい。

図A 既存のFCS研究



図B 本研究での提案



3. 研究の方法

本研究では、現在の FCS が直面している問題を、蛍光標識抗体を直接細胞内の標的分子に結合させることで解決する (図 B)。具体的な方法を以下に挙げた。

(1) 蛍光標識抗体の調製 :

観察モデルとして PKC β -GFP を選んだ。抗体の候補として、抗 PKC β マウスモノクローナル抗体 5 種、および抗 GFP マウスモノクローナル抗体 4 種を購入した。溶液中での高い抗原抗体反応を期待し、免疫沈降に利用可能な抗体を選んだ。また、抗 PKC β 抗体については、抗体の結合による PKC β の機能阻害を回避するために、機能ドメインより離れた C 末端周辺を抗原とした抗体を選んだ。抗体の蛍光標識には Zenon IgG labeling kit AF594 (Invitrogen 社) を用いた。これによって抗体の Fc 領域特異的に 1 : 1 の割合で赤色蛍光色素を導入することができた。標識効率は FCS により溶液中の拡散時間の変化を観察することで評価した。溶液中での抗原抗体複合体形成能の評価は、蛍光標識抗体および組換え GFP あるいは精製 PKC β (Cyclex 社) を用い FCS によって行った。

(2) PKC β -GFP 発現細胞の調製 :

HeLa 細胞に発現プラスミド pPKC β -EGFP (Clontech 社) をリポフェクション法を用いて導入、ネオマイシン選択により安定発現株を取得した。顕微鏡観察により、細胞形質に異常が無く、かつ FCS 観察に適した発現量の細胞株を選択した (購入備品: オリンパス社顕微鏡 CKX41 を使用)。

(3) マイクロインジェクションでの細胞内導入法の確立 :

マイクロインジェクション用サンプルは、試験直前にゲル濾過にてリン酸バッファーに交換した上、フィルター濾過 (ポアサイズ 0.2 μ m) を行った。サンプルの粘調性にに応じて、サンプル濃度を調製した。またインジェクション用キャピラリーには、先端径を変える目的で市販品 (Femtotip, Eppendorf 社) および自作品 (購入備品: ナリシゲ社プーラー PC-10 により作成) を使い分けた。マイクロインジェクション装置には Eppendorf 社製 FemtoJet を利用した (FCS が併設された共焦点顕微鏡に設置)。インジェクションは明視野観察下 (対物レンズ 40x) で行い、バックグラウンド (~1kHz) に対する細胞の蛍光強度の上昇 (数 kHz 以上)、および FCS によって可否を判断した (図 C-1、細胞の蛍光顕微鏡画像: PKC β -GFP 発現細胞に蛍光標識抗体 (着色) をマイクロインジェクションした)。

(4) 蛍光標識抗体と標的分子による特異的結合の確認 :

溶液中での蛍光標識抗体と PKC β -GFP の特異的結合は、蛍光相互相関分光法 (FCCS) によって両者の間の相関性を調べることで確認

した。また FCS によって拡散時間の変化を計測することで、溶液中を自由拡散しているか、標的分子と結合しているか、あるいは凝集が生じているかを評価した。

細胞内での観察においても、同様に FCCS によって評価した。観測精度を保証するために、観測成分 (PKC β -GFP、GFP 単体、蛍光標識抗体、標識用色素) それぞれの拡散時間を計測し、観察結果の指標とした。細胞は 35mm 径ガラスボトムディッシュ (ナリシゲ) にて培養し、観察直前にフェノールレッドフリー培地 (OPTI-MEM, Invitrogen) に変えた。細胞運動による観測結果のばらつきを抑えるため、25°C に維持し観察した。

(5) PKC β の機能保持の確認 :

細胞内における PKC β の機能保持の指標として、ホルボールエステル刺激による PKC β -GFP の細胞膜への移行を利用した (Saito K, 2003)。細胞内にインジェクションした蛍光標識抗体が、GFP- PKC β と同様に細胞膜移行を行うかどうかを観察した。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識抗体の調製 :

市販モノクローナル抗体の多くは数 10% のグリセロールや 10mg/ml 程度の BSA、ゼラチンなどの安定剤が含まれており、非常に粘調である。また NaN_3 など抗菌成分が含まれており、マイクロインジェクションを行った場合細胞活動に影響を生じる可能性がある。これらを除去するために微量限外濾過を行い、等張液 (PBS) に置き換えた。次に抗体それぞれのアイソタイプ (IgG₁, G_{2a}, G_{2b}) に合わせて Fc 領域特異的な蛍光標識を行った (Zenon labeling kit, Invitrogen)。標識反応は迅速かつ非常に特異的であり、FCS によるリアルタイム計測の結果、アイソタイプ特異的に、数分以内に蛍光標識が完了することが明らかになった。

標識条件の検討と並行し、抗体機能の評価を行った。PKC β -GFP 安定発現株および野生株の細胞破砕液を用い、それぞれの抗体についてウェスタンブロッティングを行ったところ、PKC β -GFP を検出でき、かつ非特異的シグナルが検出されないものは 2 種類であった。

抗 GFP 抗体についても同様の操作を行い、2 候補を得た。これらについて Fc 領域特異的に蛍光標識を行った上で溶液中 (*in vitro*) での GFP との結合能を観察したところ、効率よく抗原抗体複合体を形成できるものは 1 種類であった。

(2) 細胞内での機能の検証 :

先ずコントロールとして、蛍光標識したマウス IgG を細胞内にマイクロインジェクションしたところ、拡散時間は $10^3 \mu$ s 程度であった。また、標識用色素は $10^2 \mu$ s 程度であり、

細胞内に発現させた GFP および PKC β -GFP はそれぞれ $10^3 \mu s$ 程度および $10^3 \sim 10^4 \mu s$ 程度であった。これらの結果より、細胞内にインジェクションされた蛍光標識抗体が機能した場合、拡散時間が $10^3 \mu s$ 程度の遊離成分、およびそれよりも遅く拡散する抗原抗体複合体の両者が検出されるものと予想された。

次に、実際に抗 PKC β 抗体 2 種、及び抗 GFP 抗体 1 種について、細胞内での PKC β -GFP 結合機能を観察した。抗 PKC β 抗体 2 種についてマイクロインジェクションの後 30 分まで FCS・FCCS により観察したが、遊離成分のみが検出され、PKC β -GFP との特異的結合も検出できなかった。これは、①抗体の結合部位である C 末端に GFP が連結しているため立体障害が生じた、あるいは②細胞内環境では迅速な結合を行うことができない抗体である、という理由であると考えた。

抗 GFP 抗体についても同様に試験した。その結果、インジェクション 10 分後に、遊離成分 (70%) の他に、遅い成分 ($10^5 \mu s$ 程度、30%) が観察された。抗体と PKC β -GFP の間に、やはり $10^5 \mu s$ 程度の拡散時間の範囲で強い相関性も観察されたことから、抗原抗体複合体が形成されていると判断した (図 C-2、相互相関関数: 黒い曲線の y 切片が 1.0 より有意に高いことが両者の間の特異的結合を示している)。

この状態の細胞にホルボールエステル刺激を与え、PKC β -GFP・蛍光標識抗体の細胞膜移行が起きるか観察した。マイクロインジェクションを行っていない周囲の細胞では、PKC β -GFP は迅速に細胞膜に移行した。しかしインジェクションされた細胞では PKC β -GFP の移行は認められなかった。この結果か

ら、①抗体は GFP に結合しているにもかかわらず PKC β の細胞膜移行機能を阻害した、あるいは②抗体は 2 価であるため分子間が架橋され、結果として機能の阻害をもたらした、と考えられた。

(3) Fab 断片の調製:

1 価の抗体断片である Fab を本研究に用いることで、(2) で明らかになった問題を回避できると考えた。そこで、新たに protein 4.1R

(4.1R) を観察対象とし、所属部署で保有する抗 protein 4.1R 抗体産生ハイブリドーマよりモノクローナル抗体を大量調製、Fab 調製を試みることにした。4.1R は様々な細胞において発現しており、赤血球においては膜骨格のアンカータンパク質として赤血球膜の安定化と柔軟性に貢献している (Takakuwa Y (2000) *Int J Hematol* 72, 298-309)。また非赤血球細胞では染色体分裂や細胞膜受容体調節、細胞接着にも関与する。HeLa 細胞に結合膜タンパク質である glycoprotein C を発現させることで GFP-4.1R が細胞膜に移行することから、抗体結合後の 4.1R の機能評価に利用することとした。

3 株のハイブリドーマの培養液より Protein A カラムを用いて得られた抗 4.1R モノクローナル抗体は、それぞれウェスタンブロットティングにおいて GFP-4.1R を特異的に認識し、かつ溶液中において抗原抗体複合体を形成した (FCS により計測)。数 mg の完全抗体をパパイニン消化し、0.5mg 程度の Fab 断片を得た。現在、GST-4.1R を用いたプルダウンアッセイによる機能の検証、および蛍光色素の標識条件を検討しており、準備が整い次第細胞へのマイクロインジェクションを行う計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

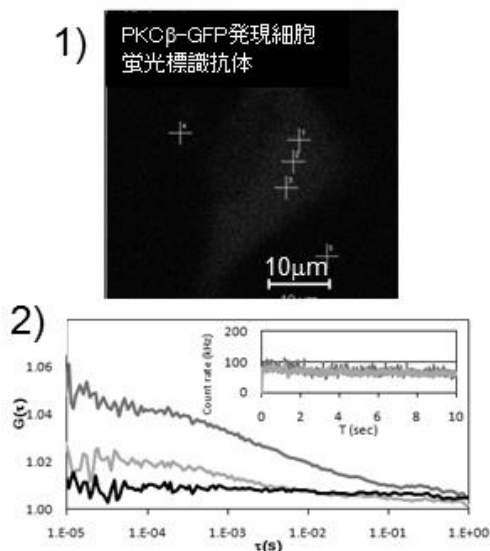
[雑誌論文] (計 1 件)

Tanaka S, Takakuwa Y. (計 2 名、1 番目) Intracellular interactions between protein 4.1 and glycoprotein C on transport vesicles, as determined by fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS letters*, 586, 668-674, 2012、査読あり

[学会発表] (計 1 件)

田中正太郎、高桑雄一 (表題) 新しい細胞内分子診断法の開発～蛍光相関分光法 (FCS) の臨床検査への応用～、第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 23、京都

図C 細胞内での抗原抗体複合体形成



6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正太郎 (TANAKA SHOTARO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：90380667