

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659106

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴による生細胞の受容体シグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of receptor signaling in living cells by surface plasmon resonance

研究代表者

和泉 孝志 (IZUMI, Takashi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70232361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜受容体からの細胞内シグナルの解析には様々な方法が用いられてきたが、操作性や再現性に課題があった。我々は以前、SPR(表面プラズモン共鳴)を用いて、生細胞におけるGPCR(Gタンパク質共役受容体)からのSPRを測定することに成功した。本研究では、阻害剤を用いてその細胞内シグナル伝達経路の一部を解明した。さらに、もう一つの細胞膜受容体であるRTK(チロシンキナーゼ型受容体)からのSPRを測定することに成功した。また、小型の携帯型のSPR測定装置を用いて、GPCRのシグナルを観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Various methods have been used for the analysis of intracellular signaling from cell membrane receptors. However, there are problems in the reproducibility and operability. Previously, we have succeeded in measuring the SPR (surface plasmon resonance) through GPCR (G-protein coupled receptor) in living cells. In this study, we elucidated the part of the intracellular signaling pathways of GPCR signal using various inhibitors. Furthermore, we succeeded in measuring the SPR through RTKs (tyrosine kinase receptors), another group of membrane receptors. We also observed SPR signal through GPCR using a small portable SPR device.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：シグナル伝達 表面プラズモン反応 細胞膜受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、細胞膜受容体からの細胞内シグナルの解析には様々な方法が用いられてきたが、複雑な操作を要するものが多く、特に細胞骨格系のシグナル解析の手法には操作性や再現性において課題があった。

(2) 以前の研究において、研究代表者らは、SPR(表面プラズモン共鳴)センサを用いて、生細胞における GPCR (G タンパク質共役受容体) からの SPR シグナルを、感度よくリアルタイムに測定することに成功し報告した。しかしながら、SPR 反応に至る細胞内情報伝達機構の解明は不十分であった。

(3) GPCR 以外のもう1つの細胞膜受容体である RTK (チロシンキナーゼ型受容体) からのシグナルを捉えることができるかどうかは未だ十分には解析されていなかった。

(4) 従来の SPR 測定装置は大型で高価であり、流路の設計を自由に行うことができないなどの欠点があり、測定法の普及には限界があった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、先ず生細胞において GPCR の活性化から SPR 現象にいたる細胞内情報伝達機構を解明する目的で、各種の阻害剤を用いて、GPCR、低分子量 G タンパク質、細胞骨格系間のシグナル解析を行った。

(2) 次に、培養細胞が有する固有の RTK を刺激することにより、SRP 反応を捉えることができるかどうかを、従来の据え置き型の SPR 測定装置を用いて検討することとした。さらに、RTK からの SPR 反応を捉えることができる場合は、GPCR と同様に、各種の阻害剤により細胞内情報伝達機構を解明することを目指した。

(3) さらに、従来の据え置き型の SPR 装置ではなく、より安価で小さく、持ち運びの可能な SPR 測定装置を用いて、細胞膜受容体からの SPR 反応を検出し、加えて流路を設計することなどにより、研究者の目的に合わせて薬剤スクリーニング、受容体のリガンドスクリーニングなどへの応用が可能な SPR アッセイシステムの開発を目指して、基礎的な研究を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 従来の据え置き型の SPR 装置を用いて、GPCR から SPR 反応に至る経路を各種の阻害剤を用いて、受容体、低分子量 G タンパク質、細胞骨格系に至る細胞内情報伝達機構を解析した。

(2) 次に、GPCR の場合と同様に、生細胞において RTK 刺激により SPR 反応をリアルタイム

に捉えることができるかどうかを検討した。また、各種の阻害剤を用いて細胞内情報伝達機構を解析した。

(3) さらに、持ち運びの可能な小型の SPR 測定装置を用いて、ロイコトリエン B4 受容体 (BLT) を強制発現した CHO 細胞を用いて、据え置き型の SPR 装置と同様に GPCR からの SPR 反応が測定できるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) GPCR から SPR シグナルにいたる細胞内情報伝達経路に関して次の知見を得た。

すなわち、各種 GPCR を発現した CHO 細胞の各々のリガンドによる SPR 反応を検討し細胞画像情報と併せて解析した結果、G タンパク質のうち Gi に共役している M1 (アセチルコリン受容体) および D2 受容体 (ドーパミン受容体) の刺激によって SPR 反応を観察した。これらは、いずれもアクチンの重合を伴っており特に細胞付着面での細胞骨格の変化が観察された。

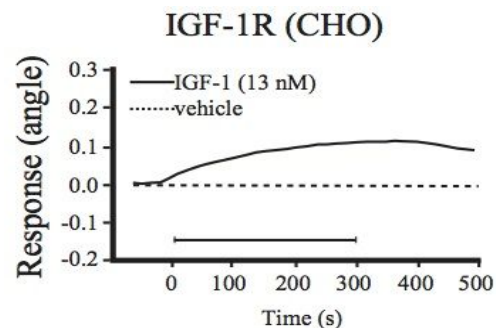
上記の SPR 反応及びアクチン重合のいずれも PI3K 阻害剤である wortmannin 処理により著明に減弱した。

さらに CHO 細胞の内在性の GPCR であり G12/13 に共役している LPA や S1P 受容体の刺激によっても SPR シグナルを観察しアクチン重合を認めたが、種々の Rho 阻害によりこれらは減弱した。

これらの結果により、GPCR 刺激から SPR 反応に至る経路には低分子 G タンパク質を介した細胞骨格系の変化が関与しているという仮説がより確かなものとなった。

(2) GPCR だけでなく RTK からの SPR シグナルについても測定を行った。

培養細胞である CHO 細胞を IGF-1 (インスリン様成長因子) で刺激したところ、GPCR の場合と同様にリアルタイムに SPR 反応を測定することができた (下図)。最大反応の約 2 分の 1 を生じる IGF-1 の濃度は、細胞の状態によっても異なるが、約 10 nM と非常に高感度であった。



これは、CHO 細胞がもつ内在性の IGF-1 受容体 (IGF-1R) にリガンドである IGF-1 が作用した結果であると考えられた。

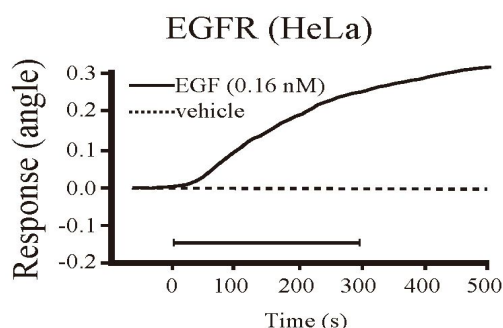
なおこの反応は wortmannin 処理により著明に減弱した。

さらに、CHO 細胞をインスリンで刺激すると IGF-1 よりは弱い SPR 反応を認めた。最大反応の約 2 分の 1 を生じるインスリンの濃度は、やはり細胞の状態によっても異なるが、約 500 nM であり、IGF-1 よりも感度は悪かった。これは細胞のインスリン受容体数や培養条件によっても異なるものと想定された。

これらの結果により、CHO 細胞における RTK からの SPR シグナルを観察できることが明らかになった。

(3) 次に、CHO 細胞以外の培養細胞でも RTK からの SPR 反応を観察できるかどうかを検討する目的で、HeLa 細胞を EGF (上皮細胞成長因子) で刺激して SPR 反応を観察した。

HeLa 細胞においては、CHO 細胞の場合よりも強い SPR 反応を認め (下図) 最大反応の約 2 分の 1 を生じる EGF の濃度は、約 0.1 nM と非常に高感度であった。



これは、HeLa 細胞がもつ内在性の EGF 受容体 (EGFR) にリガンドである EGF が作用した結果であると考えられた。

但し、GPCR の場合と異なり細胞の培養条件によって反応は異なる傾向がみられるため、今後最適の条件を見出す必要があると考えられた。

(4) 上記の結果より、鋭敏に検出することができる HeLa 細胞を EGF で刺激する系を用いて、各種の阻害剤による阻害効果を調べることにし、細胞内情報伝達機構の解明を試みた。

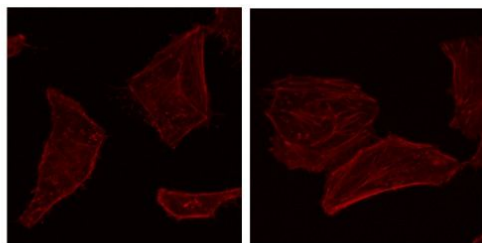
GPCR の場合と同様に、EGF の刺激による SPR 反応は PI3K 阻害剤である 100 nM の wortmannin 処理により著明に減弱した。

低分子 G タンパク質の 1 つである Rho キナーゼの阻害剤の Y-27632 や、プロテインチロシンキナーゼ阻害剤である BPIQ などによって SPR 反応はほぼ完全に阻害された。

一方、AKT 阻害剤である AKTi の阻害作用は部分的であった。

(5) 次に、細胞骨格の変化を観察するために F-アクチンをファロイジンで染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

SPR の経過時間に合わせてストレスファイバーの形成が観察された (次図)。



EGF: - +

このストレスファイバーの形成は、SPR 反応を消失させた wortmannin 処理や BPIQ 処理によって、ほぼ消失した。

これらの結果より、RTK からの SPR 反応に至る細胞内情報伝達経路の一部を解明することができた。また、この SPR 反応は、GPCR の場合と同様にセンサーチップ直上のアクチンの重合などによる細胞骨格の変化を反映している可能性が想定された。

(6) より安価で小さく、持ち運びの可能な SPR 測定装置 (Smart SPR 装置) を用いて、生細胞の SPR 現象を捉えることができるかどうかを検討した。使用したのは、ロイコトリエン B4 受容体 (BLT) を強制発現した CHO 細胞の系である。

センサーチップの上に CHO 細胞を一晩培養して付着させ、次の日にリガンドであるロイコトリエン B4 (1 nM) を流路に流して SPR 反応を測定した。

まず、標準の 2 つの流路 (1 つは対照液、他の 1 つが測定液) をもつセンサーチップで測定したところ、SPR 現象を観察することができた。

次に、複数の流路 (1 つは対照液、他の流路が測定液) をもつセンサーチップで測定したところ、従来の据え置き型と比べるとやや感度が落ちるものの、測定液の流路のみで SPR 反応を測定することができた。しかしながら、SPR 反応を測定できない流路も存在した。そのような流路では、顕微鏡下でセンサーチップ上の細胞の流失が観察された。

以上の結果は、携帯型の SPR 測定装置でも細胞膜受容体からの SPR 反応を測定できることを示している。携帯型の装置の場合、流路を比較的自由にオーダーメイドで設計することができるので、いくつかの条件を変えたアッセイを同時に行えるという利点がある。

しかしながら、流路によっては細胞の流失のために測定が行えなかったものもあり、センサーチップのハンドリングや流路設計に工夫が必要だと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1件)

大嶋 紀安、荒木 麻理、岸本 幸治、岸 美
紀子、立井 一明、和泉 孝志、表面プラズ
モン共鳴現象を利用した効率的な GPCR リ
ガンドスクリーニング方法、平成 24 年度
日本生化学会関東支部会、2012 年 6 月 23
日、群馬県前橋市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 孝志 (IZUMI, Takashi)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70232361

(2) 研究分担者

大嶋 紀安 (OHSIMA, Noriyasu)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30360514

岸本 幸治 (KISHIMOTO, Koji)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50280699

立井 一明 (TATEI, Kazuaki)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00192633

(3) 連携研究者

()

研究者番号：