

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630424

研究課題名(和文)細胞内情報伝達の可視化を基盤とする電気的細胞機能制御法の開拓

研究課題名(英文)Development of Electrical Control Method for Cellular Functions on the Basis of the Visualization of Intracellular Signal Transduction

研究代表者

篠原 寛明 (SHINOHARA, Hiroaki)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：60178887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず第1に、細胞内情報伝達反応の新規な可視化法を開発することを目的とした。表面プラズモン共鳴イメージング法を用いることにより、細胞膜受容体へのアゴニスト刺激によって細胞内のPKCが細胞膜へトランスロケーションする情報伝達過程をモニタリングできることを明らかにできた。

次いで、既知及び新規の可視化法を用いて、電気刺激による細胞内情報伝達反応の変化を観察し、その制御を実現することを第2の目的とした。印加電圧と時間幅を変えられるナノ秒パルス発生装置を自作し、Ca²⁺感受性蛍光タンパク質を発現した神経モデル細胞を用い、細胞内のCa²⁺濃度変化を誘起できるパルス条件を検討することができた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, the 1st purpose was set at development of a novel visualization method for intracellular signal transduction. It was found that surface plasmon resonance imaging technique was applicable to visualize translocation of protein kinase C (PKC) from cytosol region to membrane region upon agonist stimulation for several membrane receptors.

The 2nd purpose of this research was to clarify the condition of electrical control of cellular functions with conventional and new visualization method for intracellular signal transduction. We have prepared the nanosecond electric pulse generator by ourselves to apply the electric stimulation to the Yellow Cameleon gene-expressed neural model cell. We could consider the suitable conditions to induce the intracellular Ca²⁺ concentration change.

研究分野：細胞機能工学

 キーワード：細胞内情報伝達 イメージング 2次元SPR 電気刺激制御 ナノ秒パルス 細胞内Ca²⁺濃度 Yellow Ca
meleon トランスロケーション

1. 研究開始当初の背景

細胞への電気効果の研究とその応用例としては、高電圧パルスの印加による細胞融合と電気穿孔による遺伝子導入が良く知られている。また、動物細胞に対して 1 kV/cm 以下の電圧を印加しても細胞膜は破壊されないが、細胞内における ATP 合成や蛋白質の合成の促進、また骨細胞の分裂促進、神経細胞の突起伸長などが誘起されることが盛んに研究されてきた。本申請の連携研究者である須加は、1 ~ 10kV/cm の高電圧の印加によって生じる細胞膜の部分的、一時的絶縁破壊現象を利用して、微生物細胞への効率的な遺伝子導入や細胞内蛋白質の放出に取り組んできた。申請代表者の篠原は、1988 年ごろより、電極基板上で動物株化細胞を培養して、0.4 ~ 1.0V 程度の直流電場を印加すると、培養動物細胞の形態変化、増殖抑制や死滅誘導、さらには細胞における蛋白質の生産能、外分泌能が変わることなどを明らかにしてきた。またその後、東工大の小島博士らにより 10Hz、振幅 0.3V のサイン波の印加でグリア細胞からの NGF 分泌が促進されることが報じられ、Ca²⁺イオンの細胞内流入によるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化の関わりが示唆された。さらに最近では、南カリフォルニア大の Craviso 教授らが、数十 kV/cm の高電圧を電気穿孔の時よりもずっと短いナノ秒パルスで印加し、ウシ副腎クロマフィン細胞の L-型 Ca²⁺チャネルを開かせ、細胞内 Ca²⁺の上昇に伴うカテコールアミン放出を誘起できる例を報告している。

2. 研究の目的

本研究では、最近の GFP 技術を用いた細胞内情報伝達の可視化や、申請者たちが世界に先駆けて研究している 2 次元表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング装置を用

いた細胞内部におけるタンパク質トランスロケーションの可視化を駆使することにより、細胞内の情報伝達をリアルタイムモニタリングしながら、電気刺激が細胞に与える効果を直接観察し、考察する事にした。そしてこの実験結果より、種々の細胞内で起こる情報伝達過程を効果的に電気制御し得る条件を明らかにすることを目的とした。

Ca²⁺感受性蛍光タンパク質を用いた蛍光観察や高解像度 2 次元 SPR イメージングにより、細胞内の情報伝達を直接、長時間安定に可視化観察しながら、電気刺激がどのような過程に影響しているのかを検討して、効果的な電気制御条件を明らかにしようとする実験戦略は、国内外を通して独創的と言える。

3. 研究の方法

われわれは、細胞内情報伝達系として細胞内 Ca²⁺濃度の変化とプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化に着目し、従来法より安定に細胞内情報伝達過程を可視化できる方法を用いて、電気刺激が及ぼす効果をその場でリアルタイム評価することを思い立った。

そこで、平成 26 年度はまず、われわれが世界に先導して研究を進めている 2 次元表面プラズモン共鳴イメージングにより、いくつかの培養動物細胞の細胞膜受容体をアゴニスト刺激した際に生じる細胞質から細胞膜近傍への PKC のトランスロケーション反応を細胞底部の屈折率変化として観察できることをより多く実証する実験を行った。用いた装置の外観を図 1 に示す。

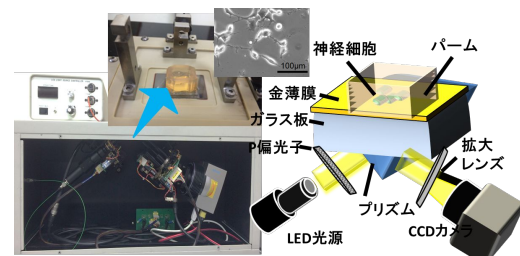


図 1 細胞内反応観察用 SPR イメージング装置

また、近年、Ca²⁺流入を引き起こし、PKCの活性化を誘導する電気刺激としてナノ秒パルスが注目されていることから、印加電圧、時間幅を調整できるナノ秒パルス発生装置を自作し、Ca²⁺感受性蛍光タンパク質である Yellow Cameleon の遺伝子を導入、発現させた神経モデル細胞へのナノ秒電気パルス刺激を行い、細胞内 Ca²⁺濃度変化を FRET 顕微鏡観察した。

平成 27 年度には、遺伝子導入により強制発現した細胞膜受容体や細胞の分化に伴い発現する受容体に対しても薬物刺激が信号伝達経路の下流にある PKC のトランスポケーションが観察できるかどうかの検討を行った。

さらにいくつかの印加電圧、時間幅でナノ秒パルスを発生できるよう装置を改良し、細胞内 Ca²⁺濃度を効果的に変化させ得るパルス条件を検討した。用いた実験システムを模式的に図 2 に示す。

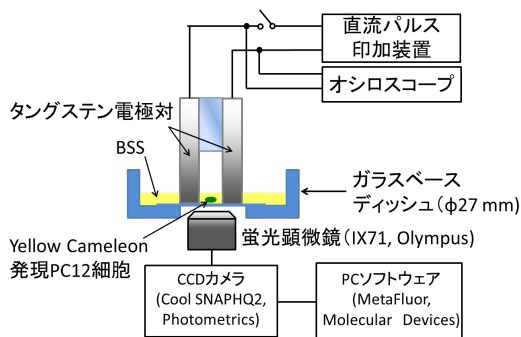


図 2 ナノ秒パルス印加下での細胞内 Ca²⁺モニタリングシステム

4. 研究成果

平成 26 年度には、細胞内情報伝達反応の新規な可視化法として、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング法の応用を進めた。神経系、免疫系、内分泌系始め、種々の動物組織由来株化細胞を金薄膜でできたセンサチップ上で培養し、細胞膜に発現している受容体に対してアゴニストとなる薬物で刺激した際の細胞内情報伝達反応として、細胞質から細胞膜近傍への PKC のトランスポケーシ

ンが起こる系を屈折率変化として観察できることを明らかにできた。また、Yellow Cameleon を発現した神経モデル細胞へのナノ秒電気パルスの印加によって、細胞内 Ca²⁺濃度変化を誘起できることを明らかにした。

平成 27 年度には、SPR イメージングシステムをもちいて、幹細胞の神経細胞への分化に伴う薬物刺激応答の変化を観察する事により、分化判定を行えることを明らかにした。その一例として、マウスの幹細胞モデルである P19 細胞をレチノイン酸処理と培養基板への接着制御により未成熟ニューロンへと分化した際の GABA 刺激時の SPR 応答を図 3 に示す。未分化細胞では、GABA 刺激しても SPR 応答としての反射光強度はまったく変わらないが、未成熟ニューロンに分化した後では、GABA 刺激により、個々の細胞領域で反射光強度の上昇を示し、GABA 受容体が発現していることを示した。

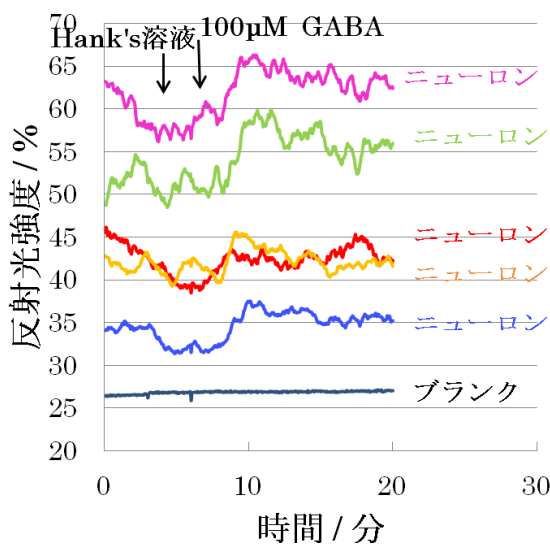


図 3 個々の幹細胞の GABA 刺激応答の SPR 観測によるニューロンへの分化判定

こうした成果は、今後の幹細胞の分化誘導利用時に、非破壊で個々の細胞を分化判定できる極めて有用な技術と期待できる。

また、強制的に細胞膜受容体を発現した細胞での薬物刺激応答観察により、細胞膜受容体間の相互作用解析にも成功した。

さらに、ナノ秒パルスの電圧値と時間幅の制御により、図4に示すような細胞内への一過性のCa²⁺流入を誘起できる可能性を示すことができた。

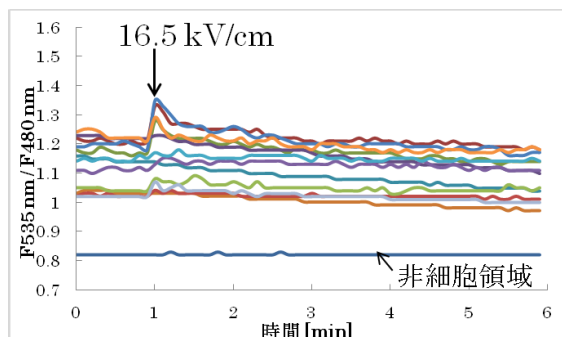


図4 35nsパルス印加によるCa²⁺流入誘起

しかし最終的に期待していたナノ秒パルス印加下でのSPRイメージング法による細胞内情報伝達タンパク質の移動観察にまでは時間が足りなかった点が残念だが、今後予想した通りの成果が得られるものと考え、実験を進めている。

本研究で示されたように可視化される細胞内情報伝達反応を指標として、その制御を可能とする電気刺激条件を明らかにする戦略は今後の新しい細胞機能制御法、治療法として発展が期待できよう。

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)

Nonobe Y, Yokoyama T, Kamikubo Y, Yoshida S, Hisajima N, Shinohara H, Shiraishi Y, Sakurai T, Tabata T (2016). Application of surface plasmon resonance imaging to monitoring G protein-coupled receptor signaling and its modulation in a heterologous expression system. **BMC Biotechnol.** 2016 Apr 12; 16:36. doi: 10.1186/s12896-016-0266-9. 査読有

[学会発表](計 7件)

篠原寛明、藤井正貴、須加実、薬物応答の2次元SPR観察によるモデル幹細胞の成熟ニューロンへの段階的分化評価、第83回電気化学大会、2016年3月29-31日、大

阪大学(吹田市)

H.Shinohara, M.Suga, R.Hasegawa, Application of PC12 cells expressing Yellow Cameleon for monitoring the intracellular Ca²⁺ concentration change by nanosecond electric field stimulation, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.

H.Shinohara, X.Cao, M.Suga, Peptide hormone sensing with cell-based SPR imaging sensor, 11th Asian Conference on Chemical Sensors, Nov. 16-18, 2015, Penang, Malaysia.

M.Fujii, H.Shinohara, M.Suga, Evaluation for neuronal differentiation of model stem cell by observation of the cell response upon kainic acid stimulation using a surface plasmon resonance imager, 2015年電気化学会北陸支部秋季大会、2015年10月20-21日、長岡グランドホテル(長岡市)

白石有希、篠原寛明、須加実、SPRイメージャーを用いて観察できる細胞内反応の検討、2015年電気化学会秋季大会、2015年9月10-11日、埼玉工業大学(深谷市)

藤井正貴、篠原寛明、須加実、2次元SPR観察法を用いたマウス胚性腫瘍細胞の細胞内反応の観察とニューロンへの分化評価への応用、電気化学会第82回大会、2015年3月15-17日、横浜国立大学(横浜)

藤井正貴、須加実、篠原寛明、薬物刺激応答の2次元SPR観察によるマウス胚性腫瘍細胞のニューロンへの分化評価の試み、2014年電気化学秋季大会、2014年9月27-28日、北海道大学(札幌)

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠原 寛明 (SHINOHARA Hiroaki)
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授
研究者番号: 60178887

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

須加 実 (SUGA Minoru)
富山大学大学院理工学研究部(工学)・助教
研究者番号: 10262502