

論文の内容の要旨

論文題目 一細胞アレイ化技術を用いたGPCR動態の
ハイスループット解析技術の開発

氏 名 談 莫東

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR : G-protein Coupled Receptor) は、既知のタンパク質の中では最大のスーパーファミリーを形成しており、生体内で増殖、分化、アポトーシスなどの様々な細胞運命の決定に関わっていることが知られている。一部のGPCRはその細胞内局在変化によって活性を調節しており、その局在変化を一細胞レベルで精度よく定量解析する方法は確立されていない。特に、非接着性の血球系細胞内のタンパク質局在をマイクロウェルなどで解析しようとした場合、細胞の回転によって正確な局在変化を解析することが困難である。そして、GPCRの蛍光標識についても、嵩高いGFPを融合した場合にそのリガンド/環境依存的なシグナル活性が低下することがあり、小分子により蛍光標識することが望ましい。

本論文では、血球系の細胞で多く発現していることが知られている3種のGPCRを、血球系細胞由来の非接着性細胞であるBa/F3細胞 (マウスプロB細胞) に発現させ、GPCRのリガンド刺激/環境変化依存的な細胞内局在変化を一細胞レベルで解析する技術の開発を行った。

対象としたGPCRは、pH感受性をもつことが知られているG2AとOGR1と (Leukotriene) LTB4受容体であることが知られているBLT1の計3種である。それぞれのGPCRのN末端にSrtAによる蛍光標識のためのSrtAタグ (LPETG5) を融合し、レトロウイルスベクターを用いてBa/F3細胞に導入した。一細胞アレイの作製には光分解性リンカーをもつPEG脂質、PBAM (Photocleavable Biocompatible Anchor for Membrane) を利用した。定量的なGPCR局在変化を画像解析し、細胞膜領域と細胞内領域の2コンパートメントを考慮したGPCR動態シミュレーションによりGPCRの細胞内移行速度定数と細胞膜への還流速度定数を

推定した。

プロトン感知性GPCRであるG2AあるいはOGR1を発現したBa/F3、1細胞アレイパターンを転写したPBAM/コラーゲンコートガラス基板上に固定化後、SrtAにより蛍光標識したG2A、OGR1の細胞外pH依存的な局在変化を一細胞レベルで解析した。その結果、G2AとOGR1は、弱塩基性環境下で細胞内部に行こうし、弱酸性環境下で細胞膜へ還流することが明らかになった。これらのGPCRは生理的条件から酸性側に偏った環境ではプロトン化して膜に局在し、弱塩基性の生理的条件下で細胞内の初期エンドソームに内部移行させることでそのGPCRシグナルを抑制しているのではないかと考えられた。さらに、2コンパートメントモデルに基づいたGPCR動態シミュレーションの結果、G2Aの局在変化に関わる速度定数はpH非依存的であったが、OGR1の細胞内移行速度定数と細胞膜への還流速度定数は弱酸性環境下と比較して弱塩基性環境下で約2倍と大きくなることが示された。pH感受性に関わるヒスチジンのペアがG2Aでは1つ、OGR1では2つ存在することがその特性の差を生じた可能性がある。

次に、BLT1のLTB4依存的な内部移行とその細胞内C末端ドメインのセリン/スレオニン側鎖のリン酸化によるシグナル活性の関連を調べるため、BLT1のC末端ドメインのセリン、スレオニンを計7残基アラニン置換したリン酸化部位欠損変異体BLT1(Δ phos)を作製した。野生型BLT1とBLT1(Δ phos)変異体を同時にLTB4刺激した結果、ともに内部移行量は少ないことが分かった。また、LTB4刺激後の内部移行量・速度ともに差異はなく、C末端ドメインのリン酸化とBLT1の細胞内移行には関連がないことが明らかになった。細胞膜への還流速度定数はG2AやOGR1の5倍以上と大きかった。BLT1は細胞のLTB4に対する走化性を維持するため、常にリガンドを結合していないBLT1を提示する必要があり、BLT1を速く膜に輸送し続けているからだと考える。

また、BLT1発現Ba/F3を、LTB4濃度勾配中で観察した結果、ごく一部の細胞で濃度勾配依存的な指向性をもった形状変化とBLT1の仮足への局在が観察できた。しかし、基板との接着が細胞の形状変化を抑制したのか、ほとんどの細胞では形状変化が観察されなかった。今後、小面積の細胞接着領域をパターンニングした一細胞アレイ上での観察を行う必要があることが予想された。

以上本研究において、光分解性PEG脂質であるPBAMと光リソグラフィー技術を用いて作製した一細胞アレイ上に固定した細胞上で発現したGPCRの刺激依存的局在変化を解析する手法を確立した。そこで確立した一細胞アレイ作製技術と画像解析手法を基に、プロトン応答性GPCRであるG2AとOGR1のpH依存的な局在変化の特性とLTB4依存的なBLT1の局在変化を解析し、一細胞レベルでの特性を明らかにした。本系は、ハイスループットな新規の化合物評価系や創薬プラットフォームを開発する新たな基盤となるのではないかと期待している。