

## pH感受性蛍光色素を用いたレセプター解析

Keyword : GPCR、CypHer5、IN Cell Analyzer 1000、インターナリゼーション

はじめに

現在、バイオサイエンスの分野ではさまざまな蛍光色素が用いられています。それらの蛍光色素の中にはユニークな特性をもった物質も多く、その特性を利用した研究も数多く報告されています。今回はそのような蛍光色素の利用例として、pHの変化により蛍光強度が変化する蛍光試薬CypHer5を用いたGPCRアッセイをご紹介します。

### GPCR

遺伝子配列情報の解析やタンパク質の構造解析が進むのに伴い、タンパク質の細胞内での機能を研究する必要性が高まっています。近年、特に注目を浴びているのが、Gタンパク質共役型受容体（G protein coupled receptors ; GPCR）へのリガンドの結合の解析です。GPCRは、細胞の機能を決定する生体内の情報伝達系において中心的役割を担っています。またGPCRをターゲットとして開発された薬剤も多く、基礎研究の対象としてだけでなく巨大な医薬品開発のターゲットとして注目されています。

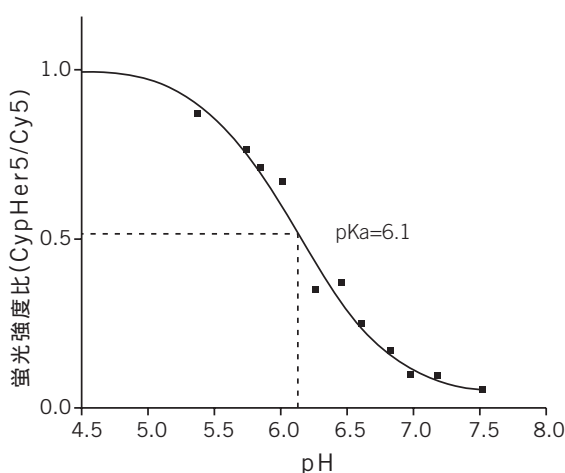


図1. 異なるpH条件下におけるCypHer5の蛍光シグナル変化

pH5（酸性条件下）ではCy5の蛍光シグナルの95%以上の蛍光を発しますが、pH7.4（中性条件下）では5%未満です。

インターナリゼーションを用いたGPCR / リガンド結合解析

これまでGPCRの解析は分離した細胞膜を用いて行われていましたが、最近では生細胞によるレセプターインターナリゼーション解析が、新規のGPCRの機能を確認するための手法として脚光を浴びています。

インターナリゼーションとはリガンドと結合したレセプターが細胞表面から細胞内へ取り込まれる現象です。GPCRを含め多くのレセプターは、リガンドが結合した後にインターナリゼーションを起こすことが知られています。インターナリゼーション解析ではレセプターを蛍光色素で標識してその挙動を検出します。この手法には大きな2つの利点があります。ひとつは生細胞を使うため、経時変化の追跡が可能なこと。もうひとつは、GPCRのN末端に蛍光タグをつけて検出するためさまざまなGPCRの機能解析に対応できることです。従来法としてGPCRとリガンドが結合したときに、シグナル伝達系の過程で産出されるcAMPやCa<sup>2+</sup>などのセカンドメッセンジャーを測定するアプローチが用いられていました。現在ではGPCRアッセイにはこのインターナリゼーションの検出がもっとも有効な方法の一つとされています。

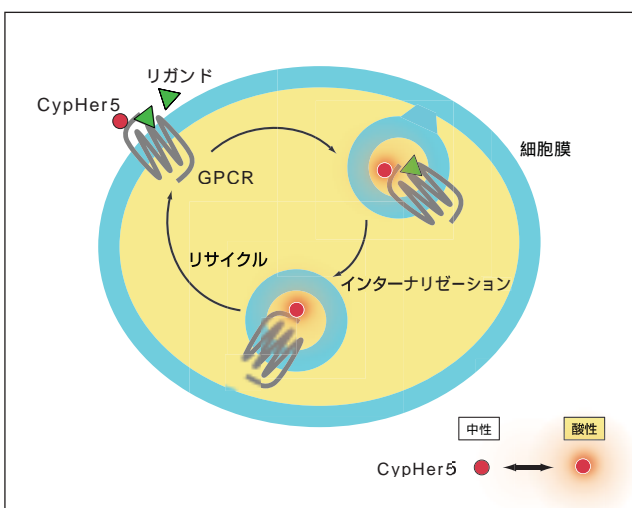


図2. GPCRのインターナリゼーション

GPCRはリガンドと結合することで細胞内へ移動します。その後、リガンドが外され再び細胞膜表面に現れます。GPCRはリサイクルされるため、細胞内に留まることがなく、細胞の生育を阻害しません。

## pH感受性の蛍光色素：CypHer5

CypHer5は蛍光色素Cy5をベースに開発されたレセプターインターナリゼーション解析用試薬で、酸性条件下でのみ蛍光を発します（図1）。一般的な細胞培養条件は中性pH状態ですので、CypHer5は細胞膜表面上にある場合は蛍光を発しません。レセプターがエンドサイトーシスによりインターナリゼーションを起こし酸性状態のエンドソームに移行することで始めて蛍光を発するようになります（図2）。

実際の検出では目的のレセプターのN末端にタグをつけて発現させ、抗タグ一次抗体にCypHer5 NHS esterを用いてCypHer5を標識して解析を行います（図3）。このため通常は発現の確認および発現量のモニターのため導入されているタグをそのままインターナリゼーション解析に使用することが可能です。従来法では、細胞外の蛍光物質が蛍光を発するためバックグラウンドが高くなるという欠点がありましたが、CypHer5は細胞外部で蛍光を発することがないため、バックグラウンドを低く抑えS/N比を高くすることができます。

## IN Cell Analyzer 1000

今回の実験には検出システムとして弊社のIN Cell Analyzer 1000システムを用いました。

IN Cell Analyzer 1000は96 ウェルプレートで培養した細胞をサンプルとして、顕微鏡と同等の解像度でイメージの検出から解析まで自動で行うことができるシステムです。このため、多検体の解析が必要となるGPCRアッセイには最適のシステムといえます。

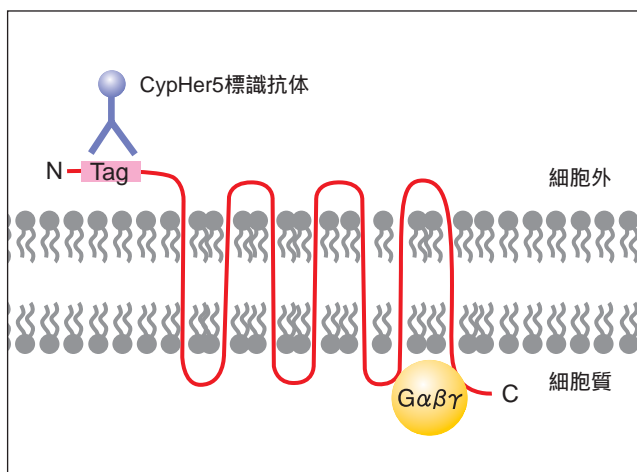


図3 CypHer5によるレセプターインターナリゼーションモデル

## 実験プロトコール

今回は 2アドレナリンレセプターのインターナリゼーションについて検証しました。材料としてVSV-Gタグを結合した 2アドレナリンレセプター（B2AR）を安定して発現しているHEK293細胞、およびCypHer5標識した抗VSV-G抗体（PA45407, GEヘルスケア バイオサイエンス）を用いました。

2-アドレナリンレセプターのリガンドにはイソプロテレノールを使用しました。

## 生細胞アッセイ

Poly-D-lysineでコートした96ウェルプレートにVSV-G-B2ARを発現しているHEK293細胞を50,000 細胞/ウェルになるように分注し、37 °Cで一晩培養しました。翌日培地を取り除き、2 μg/mlのCypHer VSV-G antibody、1 μMのHoechst 33342（H3570, Molecular Probes）が含まれたKRB（Kerb ' s - Ringer Buffer）で1ウェルあたり70 μlになるように置換し、室温で15分間静置しました。さらに濃度の異なるイソプロテレノールを加えたKRBを1ウェルあたり30 μlになるように加え、室温で60分間インキュベートした後、IN Cell Analyzer 1000でイメージの検出と解析を行いました。

## 固定細胞アッセイ

生細胞アッセイと同様の処理を施したプレートに8%パラホルムアルデヒドを1ウェルあたり100 μl加えた後、室温で20分間静置しました。上清を丁寧に取り除いた後、PBSを1ウェルあたり100 μlになるように加えました。画像は生細胞と同様にIN Cell Analyzer 1000で検出と解析を行いました。

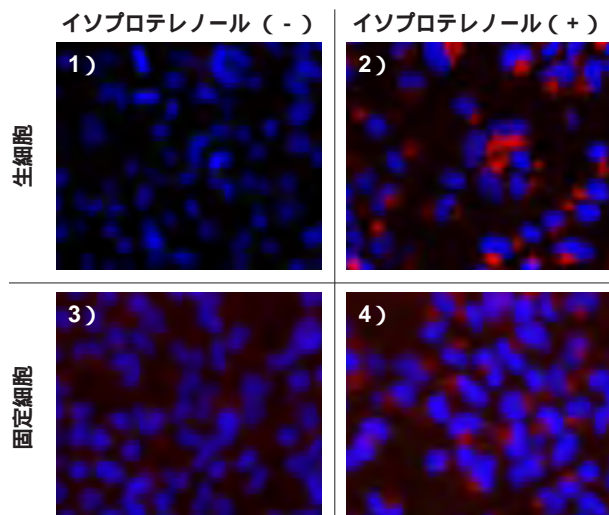


図4. IN Cell Analyzer 1000で検出した画像

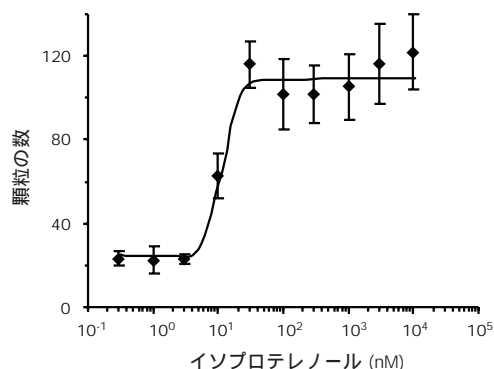
1)と2)は生細胞アッセイ、3)と4)は固定細胞アッセイで得られた細胞画像で、2)と4)は3  $\mu$ M イソプロテレノールで刺激しました。青いスポットは Hoechst 33342 で染色した核を示します。赤いスポットはインターナリゼーションされたCypHer5標識抗体とレセプターの複合体を示しています。

### 結果

生細胞を用いた解析の結果では、イソプロテレノールによる刺激後、全ての核の周りに明るいスポットが現れました(図4)。顆粒の数を計測することによって刺激に対する反応を定量解析したところ、イソプロテレノールが10~30 nMのときに顆粒数が極端に増加することがわかりました(図5)。

CypHer5 GPCRアッセイは固定細胞においても生細胞を用いた場合と同等の結果が得られることがわかりました(図4、5)。固定したサンプルは遮光条件下では数日間安定であることから、アッセイとは別の日にイメージの検出が可能です。ただし、生細胞を用いたアッセイのほうがシグナル強度が高くバックグラウンドも抑えることができます(図4)。以上のことを考慮したうえで実験系にあわせて生細胞、固定細胞のどちらを採用するか選択していただくとよいでしょう。

### a) 生細胞アッセイ



### b) 固定細胞アッセイ

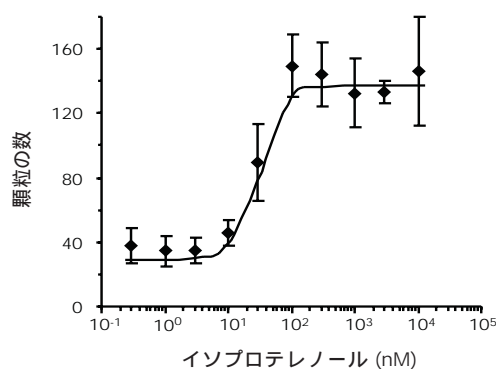


図5 生細胞 a) および固定細胞 b) におけるイソプロテレノール濃度と蛍光を発している顆粒数の相関関係