

【要約】

修士課程優秀論文

FRETを用いた細胞表面受容体RAGEの挙動の解析

Behavior of a cell surface receptor, RAGE: analyses by two FRET systems

金沢大学大学院医学系研究科血管分子生物学
(生化学第二)

齋藤 英 仁

【はじめに】

RAGE (receptor for AGE) とは, AGE (advanced glycation endproducts) と結合する細胞膜受容体として同定されたり分子量55kDaの一回膜貫通型のI型膜タンパクである。AGEとはタンパク質が非酵素的に糖化・修飾されて生成する物質の総称であり, 高血糖状態下で過剰に生成されるAGEがRAGEと結合することにより引き起こされる細胞応答が, 糖尿病血管障害を促進すると考えられている²⁾。

近年, RAGEはAGE以外の様々なリガンドとも結合することが明らかになり, 糖尿病以外の病態にも関与していると考えられるようになった²⁾。さらに, 最近我々は, グラム陰性細菌菌体壁の主要成分の1つであるLPS (lipopolysaccharide) がRAGEのリガンドであり, LPSが引き起こす感染性ショックにRAGEが関与していることを明らかにした (投稿準備中)。

RAGEによる細胞内シグナル生成には, リガンド結合によるRAGE分子同士の会合(オリゴマー化)が重要であることが示唆されている。本研究では, RAGEのオリゴマー化と細胞内シグナル生成との関係を単一細胞レベルで明らかにすることを目指し, 2分子FRET (fluorescence resonance energy transfer) によるRAGEオリゴマー化検出系と, 1分子FRETによる細胞内シグナル検出系の開発を行った。

【方法】

2分子FRETによるRAGEオリゴマー化の観察

FRETのドナーとアクセプターである蛍光色素Alexa Fluor 488 (AF488)とAlexa Fluor 594 (AF594)により抗RAGEモノクローナル抗体を標識し, この抗体をRAGEを強制発現させたヒト血管内皮由来細胞株ECV-1-4の培養液中に添加し, 細胞表面

RAGEの各分子に対してAF488標識抗体かAF594標識抗体のいずれかが結合するようにした。培養液を交換後, RAGEリガンドの1つであるLPSを終濃度50 μ g/mlで添加し, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM5 PASCAL, Zeiss)で経時的に観察した。励起波長は常に488nmを用い, AF594の蛍光(560nm以上の帯域)およびAF488の蛍光(505~530nm帯域)の蛍光画像をそれぞれチャンネル1 (Ch1)およびチャンネル2 (Ch2)で記録した。図1に示すように, RAGEが単量体で存在するときには, FRETは起こらずAF488の蛍光が観察され, RAGEのオリゴマー化が起こると, 近接したAF488とAF594との間でFRETが起こり, AF488の蛍光の減弱とAF594の蛍光の増強が観察される。Ch1とCh2の蛍光画像における各ピクセルのAF594 (Ch1)蛍光強度 y とAF488 (Ch2)蛍光強度 g から蛍光強度比 r ($r=y/g$), レシオ画像(RI)を生成した。RAGEのオリゴマー化によりFRETが観察される領域では r 値が高くなる。

1分子FRETによる細胞内シグナルの検出とRAGE発現量との相関解析

NF κ Bプロモーターの下流にレポーターとして β -ラクタマーゼ遺伝子を組み込んだ細胞株NF κ B-bla-293Fに, ヒト全長型RAGE発現プラスミドを導入した。この細胞はRAGE依存性に転写因子NF κ Bを活性化し, β -ラクタマーゼを発現する。 β -ラクタマーゼ活性の検出には, 1分子FRET分子CCF2を用いた。CCF2は, FRETのドナーとアクセプターとなる2つの蛍光色素, クマリンとフルオレセインを β -ラクタム環で結合させた分子で, 409nmの励起光を照射すると, 分子内FRETによりクマリン部分が励起光を吸収しフルオレセイン部分が蛍光を発する。 β -ラクタマーゼにより β -ラクタム環が分解されると分子内

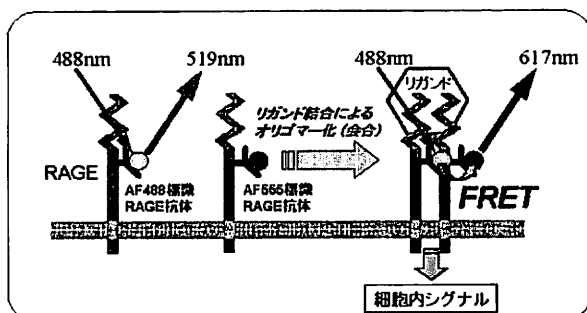


図1. 2分子FRETを利用した細胞表面受容体のオリゴマー化の検出原理

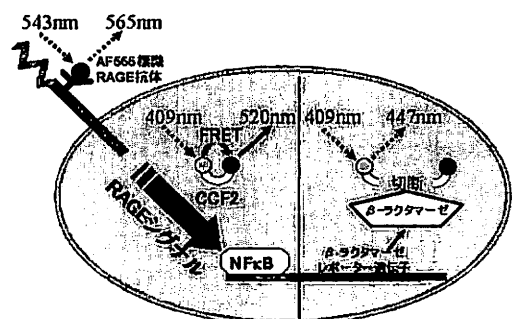


図2. 1分子FRETを利用した細胞内シグナルの検出原理

FRETが消失し、クマリンの蛍光を発するようになる⁹⁾。CCF2を取り込ませた細胞に409nmの励起光を照射し、未分解CCF2の分子内FRETによる蛍光を520nm帯域で、分解CCF2のクマリン部分の蛍光を447nm帯域でそれぞれ検出することにより細胞内の β -ラクタマーゼ活性を測定できる(図2)。まずNF κ B-bla-293F細胞を20ng/mlのLPSで30時間刺激し、CCF2を培養液中に添加後、さらに1時間培養し、蛍光顕微鏡(BZ-8000, KEYENCE)により観察した。さらに、個々の細胞のRAGEの発現レベルを調べるため、Alexa Fluor 555標識抗RAGEモノクローナル抗体を添加して細胞表面のRAGEを標識し、励起光543nm、蛍光565nm帯域で検出した。

【結果・考察】

RAGEの恒常的細胞内取り込み

培養下のECV-14細胞表面のRAGEにAF594標識抗体を結合させ、添加物を加えず通常の培養条件下でRAGE分子の挙動を観察したところ、時間の経過に従い細胞表面の蛍光が減弱し、核周辺部の蛍光が増強していくのが観察された。このことから、恒常的なRAGEの細胞内取り込みが起こっていることが推測された。そこでpinocytosisを抑制することが知られているEIPA(5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride)⁹⁾ 50 μ Mを培養液中に添加したところ、観察開始から20分後までのRAGEの細胞内取り込みが部分的に抑制されたことから、RAGEの細胞内への取り込み機構の一部にpinocytosisが関わっていると考えられた。

リガンド依存性RAGEオリゴマー化の検出

抗体を介して細胞表面RAGEをAF488とAF594で標識したECV-14細胞を50 μ g/mlのLPSで刺激し、AF594(Ch1)、AF488(Ch2)の蛍光強度および蛍光強度比(R1)の時間的変化を記録した。LPSのみの添加ではCh1、Ch2、R1のいずれにも大きな変化は見られなかった。次に、50 μ M EIPA存在下で、50 μ g/ml LPSを添加したところ、Ch1においてLPS添加1分後に蛍光強度の急激な増強が見られ、この増強は5分後まで観察された(図3, Ch1)。一方、同じ時間帯にCh2においては蛍光強度の減弱が見られた(図3, Ch2)。これによりレシオ画像R1では、LPS投与1分後にr値の上昇が見られた(図3, R1。r値の上昇がピクセルの暗色化として表されている)。以上の結果からリガンド刺激に

よりRAGEのオリゴマー化が起こっていることが初めて実験的に示された。EIPA処理によりLPS依存性のFRET現象が明瞭に観察されるようになったのは、RAGEの細胞内取り込みが抑制されたことによると考えられた。

RAGE発現量とNF κ B活性化の解析

NF κ B-bla-293FにRAGE発現ベクターを一過性に導入することにより、単一細胞レベルでRAGEの発現量と細胞内シグナル強度の相関関係の解析を行った。その結果、RAGE低発現細胞ではNF κ B活性化レベルは低く、中程度発現細胞においてNF κ B活性化レベルが最も高い傾向が認められた。RAGE高発現細胞では中程度発現細胞に比べ、むしろNF κ B活性化レベルが低い傾向が認められた。このことから、RAGEの発現が一定のレベルを超えると、NF κ Bの過剰な活性化を抑制する機構が存在する可能性が考えられた。

【結語】

本研究により、ECV細胞において細胞表面のRAGEが恒常的に細胞内に取り込まれており、その機構の一部にpinocytosisが関わっていることが明らかになった。また、2分子FRETを用いた系により、ECV細胞表面に存在するRAGEがリガンド依存的にオリゴマー化することが観察された。さらに、1分子FRETを用いてRAGE発現量とRAGE依存性細胞内シグナル強度を同時に検出可能な系を構築し、過剰なRAGEの発現によってシグナル伝達経路がダウンレギュレーションされている可能性を示す結果を得た。

現在、RAGE発現量とNF κ B活性の相関関係を定量的に評価する手法を検討中である。そして、これをRAGEオリゴマー化検出系と組み合わせることによって、RAGEのオリゴマー化とそれによる細胞内シグナル伝達を単一細胞レベルで同時に観察・定量化できる系を構築したいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurlley W, Clauss M, Wang F, Pan YE, Tsang TC, Stern D. (1992) J. Biol. Chem. 267: 14987-14997
- 2) Yonekura H, Yamamoto T, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. (2005) J. Pharmacol. Sci. 97: 305-311
- 3) Simmons G, Rennekamp AJ, Chai N, Vandenberghe LH, Riley JL, Bates P. (2003) J. Virol. 77: 13433-13438
- 4) Xie J, Chiang L, Contreras J, Wu K, Garner JA, Medina-Kauwe L, Hamm-Alvarez SF. (2006) J. Virol. 80: 11833-11851

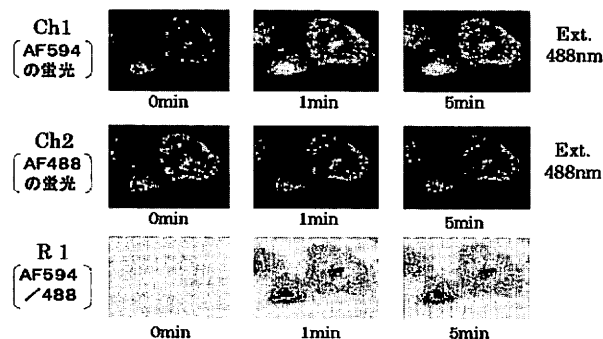


図3. リガンド依存性のRAGEオリゴマー化の検出(3個の細胞が観察されている。時間はLPS添加後の経過時間を示す。)



Profile

2006年3月 金沢大学薬学部薬学科卒業
 2007年9月 金沢大学大学院医学系研究科修士課程修了
 2008年 金沢大学大学院医学系研究科博士課程在学中
 趣味：サッカー、青春18切符の旅、写真を撮ること