

糖輸送蛋白質の蛍光プローブによる可視化に関する研究

Single Cell Imaging of Glucose Transporter Proteins by Fluorescent Probes

研究代表者 東京大学大学院理学系研究科 助手 小澤 岳昌

Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo

Takeaki Ozawa

A new method was described for detecting translocation of glucose transporter 4 protein (GLUT4) from intracellular vesicles to plasma membrane. Upon binding of insulin to cell-surface insulin receptor, it activates intracellular signaling cascade, and the translocation event of GLUT4 occurs. To detect the translocation, tetracystein motif (CCXXCC) was introduced into the outersegment of GLUT4. The outersegment was labeled with a synthetic fluorescent probe, fluorescein arsenical helix binder (FLASH), which selectively bound to the tetracystein motif and showed green fluorescence in the cytoplasm. When GLUT4 translocates to the cell membrane, the GLUT4-accommodating FLASH molecule dissociates from the tetracystein motif, and thereby the fluorescence is expected to be diminished. The potential use of the present method for evaluating of a wide range of agonists toward insulin signaling pathways is discussed.

1. 研究目的

単一細胞内の生理活性物質のネットワークを明らかにすることは、生命科学研究の重要なテーマである。現在までの生命科学研究における細胞内の生理活性物質の検出は多くの場合、細胞をすりつぶした破壊分析に依存しており、細胞外刺激に対応した細胞内応答の非破壊的な直接的状態検出は、 Ca^{2+} 、cAMPなどの限られた低分子化合物あるいは緑色蛍光蛋白質を用いたキメラ蛋白質以外ほとんど研究が行われていない。真の生理機能を解明するには、“生きている状態”における生理活性物質の機能及び活性を定量的に測定すること、すなわち、生命現象を分子レベルで明らかにするための分析手法を開発することが必要である。

本研究ではインシュリン情報伝達に關与する糖輸送蛋白質 (GLUT4) を含む細胞内小胞のエキソ・エンドサイトーシスを可視化することを目的として、(1)インシュリン刺激により細胞膜上に輸送される糖輸送蛋白質 (GLUT4) 及び

GLUT4 と共に形質膜に輸送される膜結合型アミノペプチダーゼ (vp165) を検出するための蛍光プローブ分子を開発し、(2)インシュリン、糖尿病治療薬などのアゴニスト分子の選択性の序列を、蛍光プローブを導入した単一細胞の蛍光強度に基づき評価する方法の開発を行った。

原理—形質膜上に輸送される GLUT4 の第一細胞外ドメイン、及び GLUT4 と共に形質膜に輸送される vp165 の C 末に、テトラシステインモチーフを遺伝子工学手法により導入する (図 1)。

このモチーフは、蛍光物質 fluorescein 誘導体である fluorescein arsenical helix binder (FLASH) と特異的に結合する。組み換え GLUT4 及び vp165 をインシュリンリセプター過剰発現した CHO 細胞で発現させる。細胞外に FLASH を添加し GLUT4 又は vp165 を蛍光標識する。細胞外に ethanditiol 誘導体を添加する。GLUT4 が形質膜へ輸送されるとテトラシステインモチーフに結合した FLASH は ethanditiol に結合するため、FLASH の蛍光が消光する。この蛍光強度

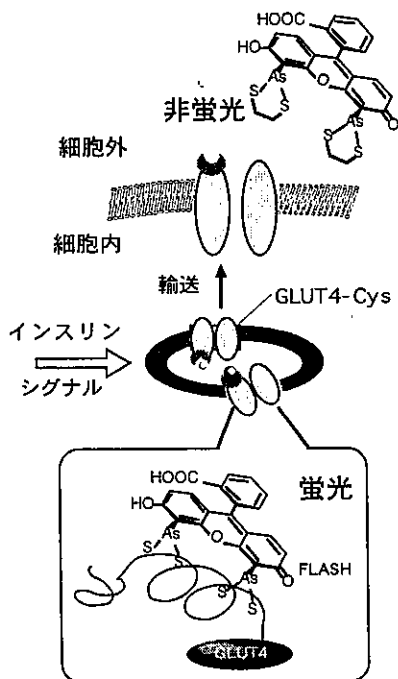


図 1

変化を指標として、GLUT4の輸送を評価する。

2. 研究経過

2. 1 実験方法

FLASH誘導体の合成

4,5-bis(acetoxymethyl)fluorescein を $AsCl_3$ でヒ素化し、FLASHを得た。このFLASHに ethanedithiol (EDT)を還元させ、FLASH-EDTを得た。

組み換え GLUT4 及び vp165 発現細胞

GLUT4 の第一細胞外ドメインに上述のテトラシステインモチーフを導入するために、図2に示す cDNA を作製した。N 末から 66 番目のプロリンと 67 番目のグリシンをコードする DNA に点変異を加え制限酵素サイトを創製し、ここに Cys4 モチーフをコードする oligoDNA を挿入した。GLUT4-Cys4 とは別に、vp165 の C 末端にシアン色蛍光蛋白質 (CFP) およびその C 末にテトラシステインモチーフを導入した cDNA を作製した。作製した GLUT4-Cys4 及び vp165-CFP-Cys4 の cDNA を発現ベクター-pcDNA3.1

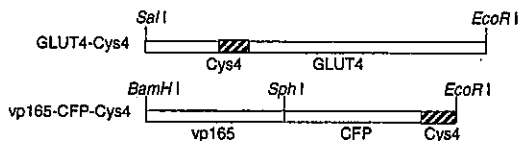


図 2

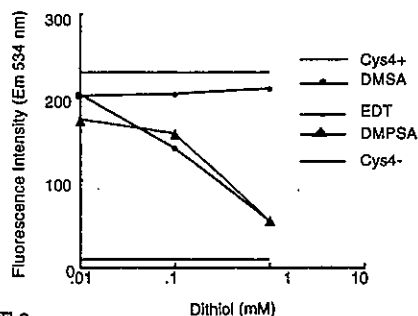
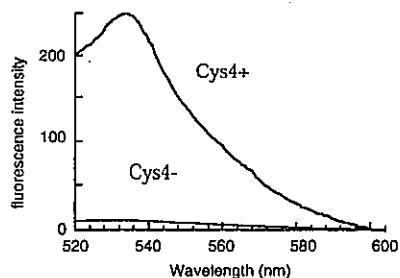


図 3

に挿入し、リン酸カルシウム法を用いて CHO-IR 細胞株に遺伝子導入した。安定に GLUT4-Cys4 蛋白質及び vp165-Cys4 蛋白質を発現する細胞株を樹立するため、G418 薬剤耐性実験を行った。得られたクローン細胞株の GLUT4-Cys4 蛋白質発現量を Western blot により評価し、発現量の多いクローンを単離した。GLUT4 の一次抗体は GLUT4 の C 末端の断片ペプチドをウサギに免疫して作製した。vp165-CFP-Cys4 の一次抗体は抗 CFP 抗体を用いた。

2. 2 結果及び考察

FLASH 誘導体とテトラシステインモチーフとの結合・解離による蛍光強度変化

FLASH-EDT はそれ自体は蛍光が無くテトラシステインモチーフに結合して初めて、蛍光が増大することが知られている (*Science* 281, 269

(1997)) . テトラスチンモチーフとして EAAAREACCRECCARA を作製し, in vitro 中での FLASH-EDT との結合による蛍光強度変化を測定した. 励起波長 508nm における蛍光スペクトルを図 3 に示す. FLASH-EDT は殆ど蛍光を示さないのに対し, テトラスチンモチーフペプチドを添加すると, 蛍光強度が大きく増大した. 最大蛍光波長は 534nm であった. 次に FLASH 分子をテトラスチンモチーフから脱離させるために, ethanedithiol (EDT), meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), 及び 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPSA) を添加した. EDT, DMPSA は濃度依存的に蛍光が消光するのに対し, DMSA は蛍光変化を示さなかった.

FLASH-EDT は arcanite と EDT が共有結合しており, 非蛍光性の原因は励起エネルギーが蛍光としてではなく, EDT の回転エネルギーに使われる為と推測されている. テトラスチンモチーフに結合した FLASH 分子は EDT, 及び DMPSA と再結合することにより, 励起エネルギーが分子内回転エネルギーに転移したため, 蛍光が消光したと推察される.

GLUT4-Cys4 発現細胞の作製

GLUT4-Cys4 蛋白質を安定に発現する細胞株を確立するために, G418 薬剤耐性細胞株をクローン化した. 得られた 24 個のクローン細胞株に対して, GLUT4-Cys4 蛋白質発現量を Western blot により評価した結果を図 4 に示す. GLUT4 の分子量 48kDa に明確なバンドを示すクローンは 8 個であった.

次に得られた 8 個のクローンの中で, 5, 13, 15, 18 番目の 4 個のクローンに対してインシュリン刺激によるグルコース取り込み能を, トリチウム(T)標識したグルコースを用いて放射化学分析を行った (図 5). クローン D13 及び D15 は, GLUT4-Cys4 を発現していないコントロール細

胞株と比較して明らかにインシュリン依存的にグルコース取り込み量が増大していることが分かった. 以上から, D13 及び D15 はグルコース輸送活性を保持した GLUT4-Cys4 蛋白質を安定に発現する細胞株であることが分かった.

vp165-CFP-Cys4 発現細胞の作製

vp165-CFP-Cys4 の cDNA を CHO-IR 細胞に遺伝子導入し, 励起波長 440 nm における細胞の観測を蛍光顕微鏡下で行った (図 6). CHO-IR 細胞のサイトゾルに均一に CFP の蛍光が観測された. これは目的の組み換え vp165-CFP-Cys4 が一過性に高効率で発現していることを示している. 次に G418 薬剤耐性実験によりクローンを得, Western blot により vp165-CFP-Cys4 蛋白質の発現を確認したところ, vp165-CFP-Cys4 を発現する細胞株は存在しなかった. これは, vp165-CFP-Cys4 が細胞毒性を有するために, 安定に vp165-CFP-Cys4 を発現する細胞株が得られなかった為と考えられる. 以下, vp165-CFP-Cys4 については, 一過性に発現させた CHO-IR 細胞を実験に用いることとした.



図 4

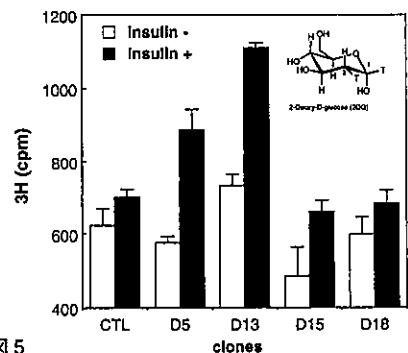


図 5



図 6

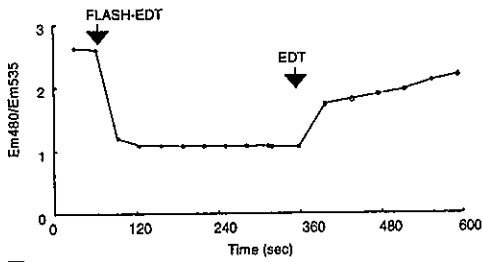


図7

vp165-CFP-Cys4発現細胞のFLASH-EDTによる蛍光ラベル

vp165-CFP-Cys4をCHO-IRに一過性に発現させ、10 mM FLASH-EDTで蛍光ラベルした結果を図7に示す。FLASH-EDTを添加1分後に480 nmの蛍光強度が減少し、535 nm 蛍光強度が増大した。これはFLASHがvp165のテトラシステインモチーフに結合し、CFPとFLASH間で蛍光共鳴エネルギー移動が起きたことを示している。また、細胞外液を洗浄後1mMのEDTを添加すると、蛍光強度比(Em480/Em535)の値が時間依存的に増加した。これは、EDTがテトラシステインモチーフに結合したFLASHを細

胞内で解離させたことを示しており、FLASHとテトラシステインモチーフとの結合が可逆的であることが分かった。

3. 研究成果

糖輸送蛋白質(GLUT4)の形質膜への輸送を検出するための新規方法を提唱した。糖輸送蛋白質を検出するための、テトラシステインモチーフを導入したGLUT4蛋白質を安定に発現する細胞株を作製した。

4. 今後の課題と発展

本研究で作製した改変GLUT4あるいはvp165蛋白質の発現細胞および、合成したプローブ分子を用いて、インシュリン刺激による改変GLUT4及びvp165蛋白質の細胞膜への輸送を蛍光強度変化を指標として検出する。このGLUT4の形質膜への輸送量を指標として、インシュリン及び糖尿病治療薬など生理活性物質を作用させたときのインシュリン様作用を定量評価する。