

20111015A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ヒトソマトスタチン受容体を標的とする  
RNAアプタマーの創製とその応用による  
新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

(H21-ナノ-若手-013)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 藤原 俊伸

平成24(2012)年 5月

# 目 次

I. 総括研究報告	
ヒトソマトスタチン受容体を標的とする RNA アプタマーの創製と その応用による新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発 . . . . .	1
藤原 俊伸 (公益財団法人 微生物化学研究会・微生物化学研究所・主席研究員)	
II. 分担研究報告	
1. GPCR 結合性および作動性 RNA アプタマースクリーニングの ための新規レポーターアッセイ系の開発 . . . . .	12
近藤 昭彦 (神戸大学大学院工学研究科・教授)	
2. 原子間力顕微鏡(AFM)を用いたアプタマー作成系の構築 . . . . .	15
荻野 千秋 (神戸大学大学院工学研究科・准教授)	
3. 蛍光蛋白質を利用した、受容体の発現量・局在性・ シグナル伝達能評価系の確立 . . . . .	17
田中 勉 (神戸大学自然科学系先端融合研究環・助教)	
4. 糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを導入した 蛍光性核酸プローブによる一塩基多型の検出 . . . . .	20
上野 義仁 (岐阜大学大学院工学研究科・准教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	27

## ヒトソマトスタチン受容体を標的とするRNAアプタマーの創製と その応用による新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

研究代表者：藤原 俊伸 （公財）微生物化学研究会・微生物化学研究所・主席研究員

### 研究要旨

ソマトスタチン（SST）は内因性の環状ペプチドであり、様々な組織の細胞表面に発現しているソマトスタチン受容体（SSTR）と結合し、生理活性を発揮する。SSTRはG蛋白質共役型受容体（GPCR）であり、これまでに5つのサブタイプが同定され、それぞれ組織特異的な発現がみられる。そして、内分泌腫瘍の殆どがSSTRを高密度に発現しており、SSTRの高発現に基づいて、腫瘍の診断や治療が可能である。これまでに、RI標識したSSTおよびSSTアナログを用いたSSTRを標的とする腫瘍イメージングが行われている。また、抗腫瘍作用を有するSSTアナログの開発も盛んに行われている。しかしながら、従来の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面のSSTRのみならず、正常細胞に発現しているSSTRとも交差反応するために、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されている。そのため、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々は、酵母を用いてヒトSSTRからのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた。そして、出芽酵母にヒトSSTRを発現させ、酵母内在性G蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功した。この系では、SSTRの作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。また、酵母を用いるため、大規模かつ迅速なリガンドスクリーニングが可能である。そこで、このスクリーニング系を応用し、SSTRの各サブタイプと特異的に結合できる、また特異的に作動させる人工リガンドをRNAという高分子マテリアルを利用し、創製する。

### A. 研究目的

内分泌腫瘍の診断には、そのソマトスタチン受容体（SSTR）高発現性に基づき、RI標識したソマトスタチン（SST）およびSSTアナログを用いたSSTRを標的とする腫瘍イメージングが有効である。さらに、抗腫瘍作用を有するSSTアナログの開発も進

んでいる。しかしながら、既存の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面の SSTR のみならず、正常細胞に発現している SSTR とも交差反応する。さらに、SSTR には SST に対してほぼ同様の親和性を有するサブタイプが 5 つ存在する。そのため、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されて、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々はこれまでに、酵母を用いてヒト G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) からのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた (Ishii et al., 2008)。ヒト GPCR の中でも SSTR は、酵母において機能的に発現し、リガンドである SST 刺激に応答して酵母内シグナル伝達経路が作動する (MCB., 1995, Yeast 2000)。そして、我々は出芽酵母にヒトの SSTR を発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP 蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功している。この系では、SSTR の作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。そこで、本研究では、内分泌腫瘍の診断および治療薬のリード化合物として、SSTR 作動性 RNA アプタマーの創製を試みる。

本研究計画で最重要であるのは各 SSTR サブユニットを標的とした RNA アプタマーの創製である。既に酵母を用いた SSTR リガンド大規模スクリーニング系を有していること、そして代表者が RNA 工学を専門とすることから速やかに創製可能と考えており、既に予備実験も開始している。一方、我々の研究チームは蛍光性のヌクレオシドアナログを導入することにより RNA を光らせる技術（および修飾塩基を利用した RNA アプタマーの無菌的製造ラインを有している。そこで、本研究計画での達成目標は、①創製した RNA アプタマーをそれ自身が発光する蛍光性 RNA アプタマーへと変換し、次世代診断薬を開発すること、②作動性 RNA アプタマー自身あるいはその構造に基づく新規抗腫瘍薬の開発である。

RNA アプタマーは、RNA 結合部位を持たない標的や細胞表面受容体に対して創製可能であり (Ishii et al., 2008)、抗体を凌ぐ強い結合力と特異性を併せ持つものもこれまでに創製されている。これは RNA が立体構造を形成して機能しうること、そして標的物質の表面構造を広範囲に認識することが可能であるためである。このことは、リガンドに対して同じ親和性を有する SSTR の各サブタイプそれぞれに特異的に結合する RNA アプタマーが創製可能であるということを意味する。本研究では、① RNA を光らせる技術を利用し、サブタイプ特異的結合 RNA アプタマーを内分泌腫瘍の診断薬として利用する。一方で、これまでの RNA アプタマーの創製は、上記のように標的に対する結合性で選択され、その後機能を評価するという手順が取られていた。従って、結合性と機能性が必ずしも一致するとは限らない。我々が開発した SSTR 作動性の評価・スクリーニング系では、② RNA アプタマーを、結合性かつ作動性を基盤に選択、創製することが可能であり、RNA アプタマーを創製する行程として他に例をみない。作動性で

選択された RNA アプタマーはそれ自身を修飾すること、またはその構造を解析することによる新規化合物のスクリーニングにより抗腫瘍薬開発に応用する。技術的制約がある高等真核細胞を用いるのではなく、酵母を利用することにより、大規模なスクリーニングが可能であることが本研究の特色であり利点である。酵母そのものを用いた SELEX 法は有効ではないが、得られる RNA アプタマーの評価を行う上では非常に強力なツールである。(図 1)

## B. 研究方法

本年度では、結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築、酵母を用いたアゴニスト選択法開発、そして蛍光性アプタマーの機能性検証を目指して以下の点に関して研究を進めた。

### ・結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築

生体内で重要な機能を持つ生理活性ペプチドの一つであるソマトスタチンは、細胞膜上にある G タンパク質共役型のソマトスタチン受容体 (SSTR) に結合することによって、標的細胞に作用する。ヒトの SSTR には、5 種類のサブタイプが知られており、組織特異的な発現様式を示す。一方、SSTR は、内分泌腫瘍において発現の亢進が見られること、原発細胞により固有の発現パターンを示すことなどから、がんの診断においてきわめて重要なマーカータンパク質であり、治療薬のターゲットとしても注目を浴びている。

研究代表者藤原が率いる研究グループでは、5 種のヒト SSTR のうち SSTR2 および SSTR5 を発現する出芽酵母を開発し、酵母内在性 G タンパク質を介したレポーター (GFP) 遺伝子の活性化によって、アゴニスト活性を測定できるシステムの確立にすでに成功している。そして、SSTR に対する RNA アプタマーを取得する目的で、このシステムを活用し酵母細胞を用いた SELEX を行った。しかしながら、RNA アプタマー作成を目的とする場合には、酵母表層提示系をスクリーニング系として用いると、大量の RNA が非特異的に酵母に結合してしまうという問題点が浮上し、その解決法の考案が急務であることが判明し、前年度よりヒト SSTR を安定発現する接着性の培養細胞および組換えタンパク質を用いた SELEX 法を用いることで上記の問題を回避し、目的の RNA アプタマーの取得を目指した。そして、レンチウィルスベクターを用いて、ヒト SSTR を安定発現する接着性の培養細胞を作成し、これまでに TGF $\beta$  受容体に対する SELEX で実績がある Ohuchi 等の方法 (*Biochimie*) で SELEX 法を実施した。

前年度までに作成したヒト SSTR2 発現 CHO-K1 細胞 (図 2) を用いて Ohuchi 等

の方法 (Biochimie) に従って SELEX 法を実施した。具体的には、60 塩基のランダム配列が、プライマー結合配列および T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含む一定の配列に挟まれたような鋳型 DNA のプールを調製した。そして、この鋳型 DNA のプールから転写反応を行い、ランダム RNA プールを調製した。そして、まずこの RNA プールを SSTR が発現していない CHO-K1 細胞をセミコンフルエントまで培養した Dish に加え、非特異的に細胞表面に結合する RNA を排除した。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR を発現させた CHO-K1 細胞をセミコンフルエントまで培養した Dish に加え特異的に結合する RNA プールを選択した。この作業を 10 回程度繰り返し、得られた RNA を逆転写し、クローニングベクターへとサブクローニングし配列を解析した。さらに、上記 cell-based SELEX 法とは独立に、GST 融合 SSTR2 および SSTR5 組換えタンパク質を用いた SELEX を実施した。GST 融合 SSTR2 および SSTR5 は Abnova 社より購入した。そして、上記と同様に調製したランダム RNA プールと、GST とを反応させ、非特異的に GST に結合する RNA を排除した。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR2 および SSTR5 と反応させ、特異的に結合する RNA プールを選択した。この作業を 10 回程度繰り返し、得られた RNA を逆転写し、クローニングベクターへとサブクローニングし配列を解析した。RNA の選択にはニトロセルロース膜を使用している。従って、ニトロセルロース膜に非特異的に結合する RNA も本実験前に排除している。

#### ・酵母を用いた酵母を用いたアゴニスト評価系の構築

結合性を基盤に創製されたアプタマーの機能性は、これまでに構築した酵母リガンド応答解析系で検証できる。一方、機能性をもたないアプタマーがアゴニストであるかどうかをより簡便に検証する目的で、リガンドの結合によりシグナル伝達が引き起こされたときに、簡便に検証できる系の構築を試みた。具体的には、SSTR5 を細胞表面に発現させた酵母を用いてアゴニストとして作用する環状型リガンドペプチドである S-14 を用いてシグナル応答を検出できるアッセイ系の開発を試みた。アッセイ系の簡便化および迅速化のために、リガンドペプチドを自己分泌させ、さらに酵母細胞表層でトラップする系の確立を目指した。

#### ・蛍光性アプタマーの機能性検証

これまでに細胞を用いた SELEX 法により TGF- $\beta$  III 型受容体に対するアプタマーが創製されている。そこで、このアプタマーの構造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し (図 3)、細胞表面上の受容体の発現を検出できる「RNA 診断

薬」としての可能性を検証している。これまでに、335nm で励起し蛍光が 395nm、320nm で励起し蛍光が 450nm の蛍光性ヌクレオチドアナログを用いて検証してきたが蛍光強度に不足があったため、新たに 376nm で励起し蛍光が 520nm の蛍光性ヌクレオチドアナログ (図 3) を用いて検証し、導入部位も増やした (図 3)。

### C. 研究結果

#### ・結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築

作成したヒト SSTR2 発現 CHO-K1 細胞を用いて SELEX 法を実施した。現在、配列を精査すると共に、32P 標識したアプタマーを用いて特異性を検証している。さらに、上記 cell-based SELEX 法とは独立に、GST 融合 SSTR2 および SSTR5 組換えタンパク質を用いた SELEX を実施した。現在、配列を精査すると共に、32P 標識したアプタマーを用いて特異性を検証している。

#### ・酵母を用いた酵母を用いたアゴニスト選択法の開発

GFP 応答性酵母株において  $\alpha$ -factor を自己分泌させることで、アゴニスト依存的なシグナル伝達を検出できることを確認した (図 4A, Sec)。また、5 種類のアンカータンパク質を  $\alpha$ -factor の C 末端側に融合したところ、すべてにおいてシグナル伝達を活性化することができた (図 4A, 3'AG-Flo318)。本評価系は、アゴニスト活性を蛍光強度測定によって相対定量することが可能であり、Flo42 をアンカーとして用いることで、最も強くシグナル伝達を活性化できることを明らかとした。また、蛍光抗体染色の結果より、アンカーを融合したもののみが適切に細胞表面にトラップされていることが確認できた (図 4B)。

次に、標的であるヒト SSTR5 発現した酵母株において、環状型 S-14-Flo42 融合リガンドを自己分泌させたところ、SSTR5 および S-14 を発現する細胞のみが特異的に GFP の蛍光を示し、その他のコントロール細胞は蛍光を示さなかった (図 5A)。また、リガンドとして SSTR 以外に作用するペプチドリガンドを用いて同様の実験を行ったところ、S-14 以外のペプチドでは GFP 蛍光を示さなかった (図 5B)。このことから、SSTR5 特異的なアゴニストリガンドを選択的に検出できたといえる。

また、これらの細胞において、抗タグ抗体を用いた Western blotting において特異的なバンドが見られたことから、SSTR5 と S-14 の発現を確認した (図 6)。さらに、蛍光標識抗体による細胞染色により、S-14-Flo42 リガンドペプチドの酵母細胞表面でのトラップに成功していることも確認した (図 7)。

最後に、マルチコピー型プラスミドによりレポーター遺伝子を発現するよう改変した酵母株を作製したところ、GFP の発現レベルが大幅に向上させることに成功した (図

8)。

#### ・蛍光性アプタマーの機能性検証

研究手法で記したように、これまでに得られている TGF- $\beta$  III 型受容体に対するアプタマーの構造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し、細胞表面上の受容体の発現を検出できるかを検証している。

### D. 考察

#### (1) 達成度について

以上結果の項で示すとおり、平成 23 年度の研究は、Cell-based SELEX 法を実施した。さらに、組換えタンパク質を用いた従来の SELEX 法の実施を行った。一方、結合性を基盤とした RNA アプタマー取得法に転換したため、作動性を持たない RNA アプタマーが、アゴニストとして機能しうのかを検証する系の構築が急務となった。そこで、前年度までに構築済みである酵母を用いた微量のスクリーニング系を改変し、アゴニスト検定系の構築に成功した。

RNA アプタマーの取得も順調に進んでおり、現在その配列の解析および機能の解析にとりかかっている。また、昨年度に続き分担者による研究もきわめて純情に進んだ。

#### (2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

SSTR2 は初期の膵臓ガン発生において、血管新生を抑制する因子の発現を促進し、浸潤ガンへの転化を阻止する働きがある。今回 SSTR2 に対する高感度リガンド検出系の構築に成功した。このことは、RNA アプタマーのみならず、新規ソマトスタチンアナログの開発に貢献できるのではないかと考えている。

さらに SSTR5 のリガンド認識に必須名アミノ酸残基を特定したことは非常に重要な知見であり、現在特許出願に向け検討しているところである。これまで、おぼろげながら判明したい機能ドメイン全容が明らかになったと考えている

### E. 結論

昨年度に浮上した酵母表層提示系をスクリーニング系として用いたアプタマー作成での問題点は、SSTR2 および SSTR5 を恒常的に発現する接着性の培養細胞を作成し、これらを用いる Cell-based SELEX を行うこと、さらにはこれら細胞から得られた膜画分を用いることで回避を試みた。その結果、これまでに SSTR5 発現細胞由来膜画分を用いた SELEX で数種類の特異的に結合するアプタマーを得た。現在、その配列の解析および標的への結合力の解析を行っている。

また、本年度ではこれまでに得られている TGF- $\beta$  III 型受容体に対するアプタマーの構



造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し、細胞表面上の受容体の発現を検出できる「RNA 診断薬」としての可能性を検証している。あらたに 376nm で励起し蛍光が 520nm、の蛍光性ヌクレオチドアナログを用いて検証しており、現在検出のための至適条件を検討している。

当初の計画からは変更を余儀なくなれたが、受容体に対するアプタマーを得て、その活性を速やかに検証するという点においては 100%の達成度である。また、柔軟な研究計画の変更を行ったため、既知の受容体に対するアプタマーに蛍光ヌクレオチドアナログを導入し、現在その診断薬としての薬理を検証中である。この点においても 100%の達成度が期待される。一方で、アプタマー取得が当初計画より遅れたため、その哺乳細胞に対する薬効を検証する点で遅れが生じている。しかしながら既に酵母を用いた活性を検証済みであり、速やかに哺乳細胞の系へと移行可能である。

#### **F. 研究発表**

分担者の項参照

#### **G. 知的財産の出願・登録状況**

該当なし

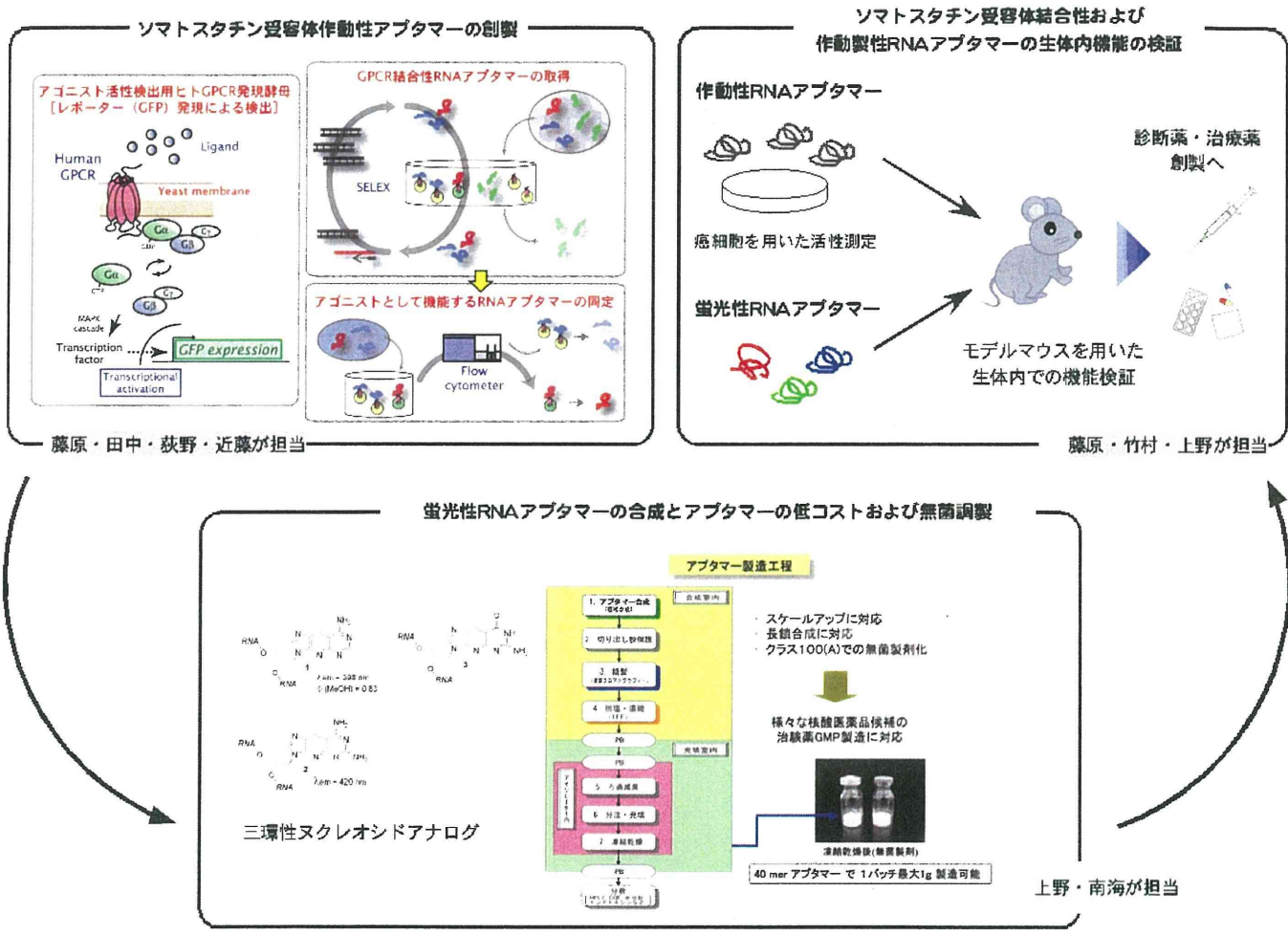
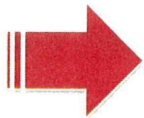
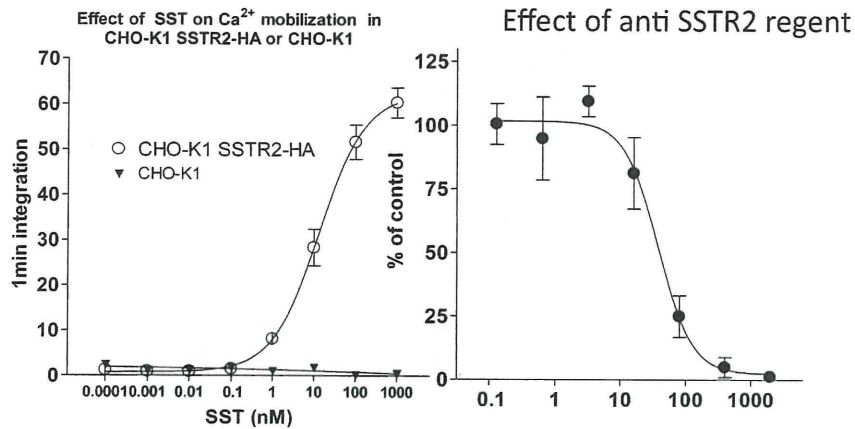


図1 研究の流れ図

# ヒトSSTR2発現CHO-K1細胞



ヒトSSTR2発現CHO-K1細胞を用いた細胞SELEX

図2 ヒトSSTR2発現CHO-K1

## 蛍光性抗TGF-β受容体アプタマーの合成

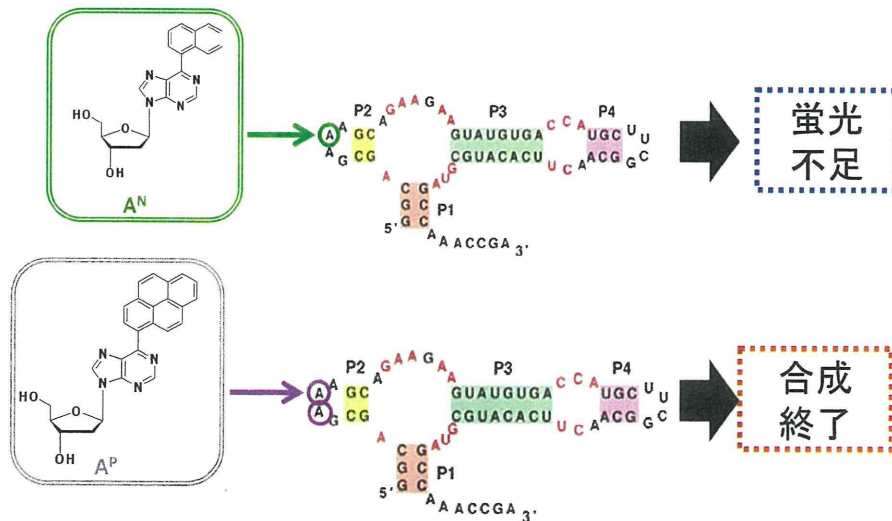


図3 新たに合成した蛍光性アプタマー

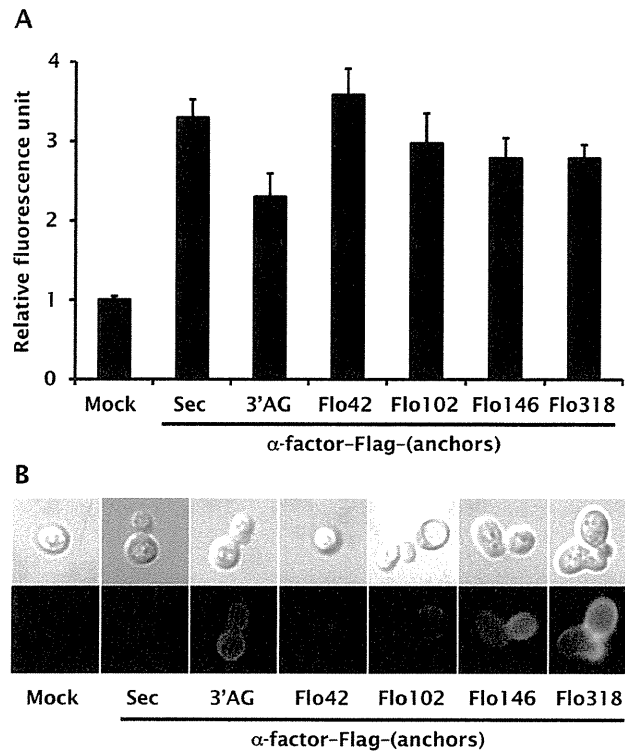


図4  $\alpha$ -factor 自己分泌および表層提示酵母株によるシグナル伝達アッセイ

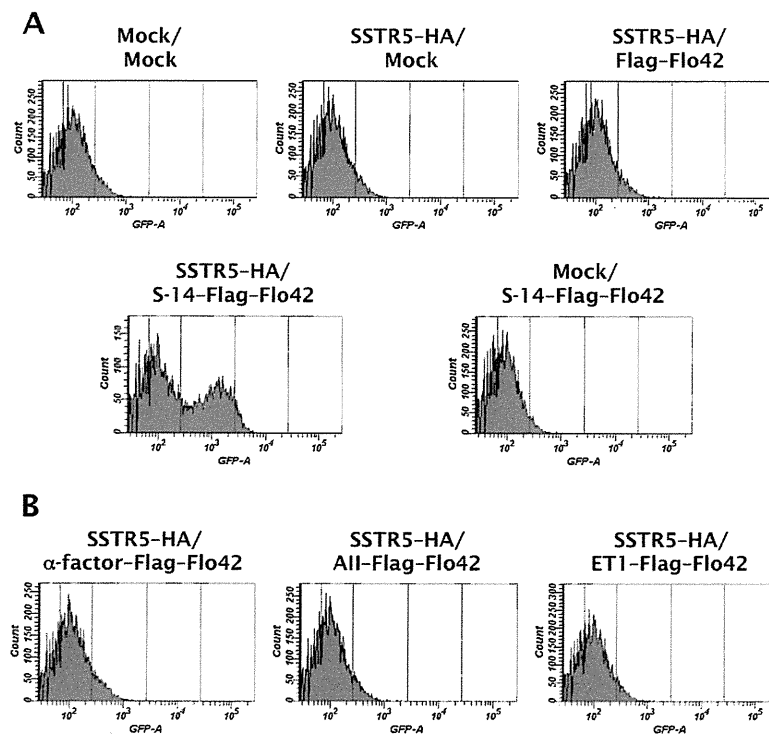


図5 SSTR5 発現酵母株での S-14 表層提示によるシグナル伝達アッセイ

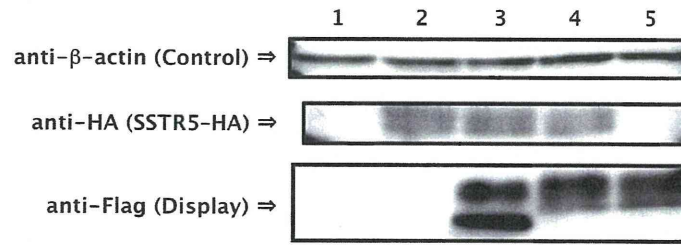


図6 Western blotting による SSTR5 および S-14 の発現確認

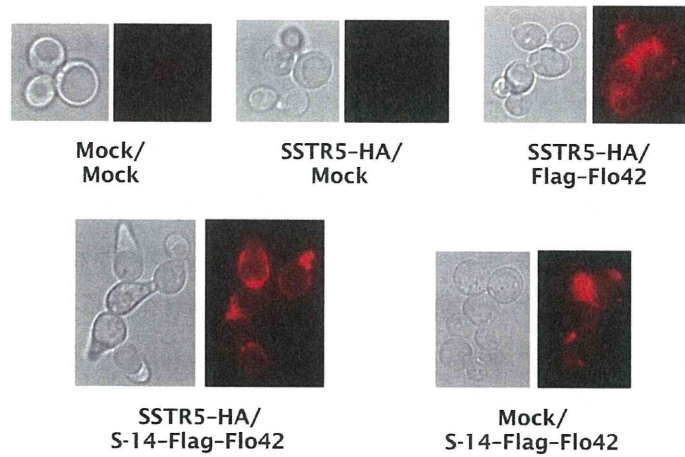


図7 蛍光抗体染色による S-14 リガンドの細胞表層でのトラップ確認

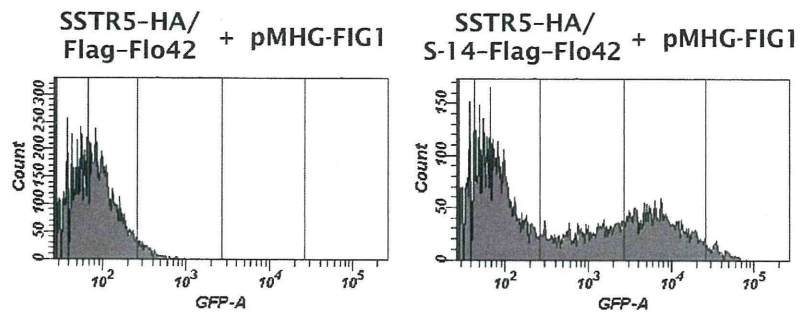


図8 マルチコピー型プラスミドによるシグナル伝達アッセイ感度の向上

## GPCR 結合性および作動性 RNA アプタマースクリーニングのための 新規レポーターアッセイ系の開発

研究代表者：近藤 昭彦 神戸大学大学院工学研究科・教授

### 研究要旨

ヒトソマトスタチン受容体 (SSTR5) の高感度リガンド応答アッセイ可能な酵母株の創製に成功した。本系は、RNA アプタマーの効率的スクリーニングを可能とする。

### A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトソマトスタチン受容体 (SSTR) を標的としてアゴニストとして作用する RNA アプタマーを取得することである。そこで、前年度までに開発した系を発展させ、SSTR5 を標的としてさらなる高感度リガンド応答アッセイを可能とする酵母アッセイ系の開発を試みた。

### B. 研究方法

シグナル伝達アッセイ用に改変した酵母細胞 (IMFD-70) および細胞内の酵母由来三量体 G 蛋白質の  $\alpha$  サブユニット (G  $\alpha$ ) の C 末端 5 アミノ酸をヒト由来 G  $\alpha$  i3 の C 末端 5 アミノ酸と置換し、キメラ Gi3 蛋白質を発現する酵母細胞

(IMFD-72) に加え、

GFP レポーターをプラスミドで発現する酵母株 (IM-50/pGK421-SSTR5/pMHG-FIG1) を構築した。リガンドであるソマトスタチン (SST) を添加し、蛍光レポーター遺伝子発現によるシグナ

ル伝達アッセイを行った。

### C. 研究結果

GFP レポーターをプラスミドで発現する IM-50/pGK421-SSTR5/pMHG-FIG1 株を構築することで、IMFD-72 株よりもさらに高いシグナル検出感度を得ることに成功した (図 1)。GFP 蛍光強度の定量比較においてもその結果が示された (図 2)。

### D. 考察

レポーターの発現システムを改変することにより、SSTR5 のシグナル検出感度を大幅に向上することに成功した。本アッセイ系は、効率的な RNA アプタマーの取得が可能である。

### E. 結論

SSTR の RNA アプタマー認識を評価できる高感度な酵母リガンドアッセイ系を確立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ishii J, Yoshimoto N, Tatematsu K, Kuroda S, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. (2012) Cell wall trapping of autocrine peptides for human g-protein-coupled receptors on the yeast cell surface. PLoS One. 7, e37136.

Ishii J, Moriguchi M, Hara KY, Shibasaki S, Fukuda H, Kondo A. (2012) Improved identification of agonist-mediated G $\alpha$ i-specific human G-protein-coupled receptor signaling in yeast cells by flow cytometry. Anal Biochem. 426, 129-133.

Ryo S, Ishii J, Iguchi Y, Fukuda N, Kondo A. (2012) Transplantation of the GAL regulon into G-protein signaling circuitry in yeast. Anal Biochem. 424, 27-31.

Fukuda N, Ishii J, Kaishima M, Kondo A. (2011) Amplification of agonist stimulation of human G-protein-coupled receptor signaling in yeast. Anal Biochem. 417, 182-187.

Togawa S, Ishii J, Ishikura A, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. (2010) Importance of asparagine residues at positions 13 and 26 on the amino-terminal

domain of human somatostatin receptor subtype-5 in signalling. J Biochem. 147, 867-873.

### 2. 学会発表

Togawa S, Ishii J, Tanaka T, and Kondo A. "Functional analysis of mutant human somatostatin receptor using a yeast-based fluorescence reporter assay" Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC 2009), 2009, Nov, Kobe, Japan

## G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

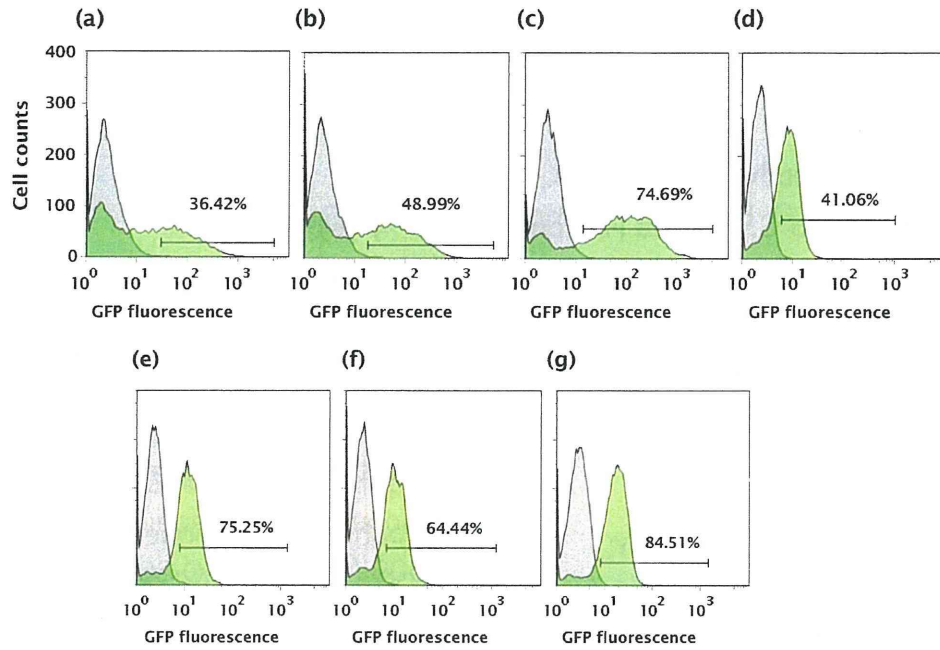


図 1 各種酵母株によるシグナル伝達アッセイ

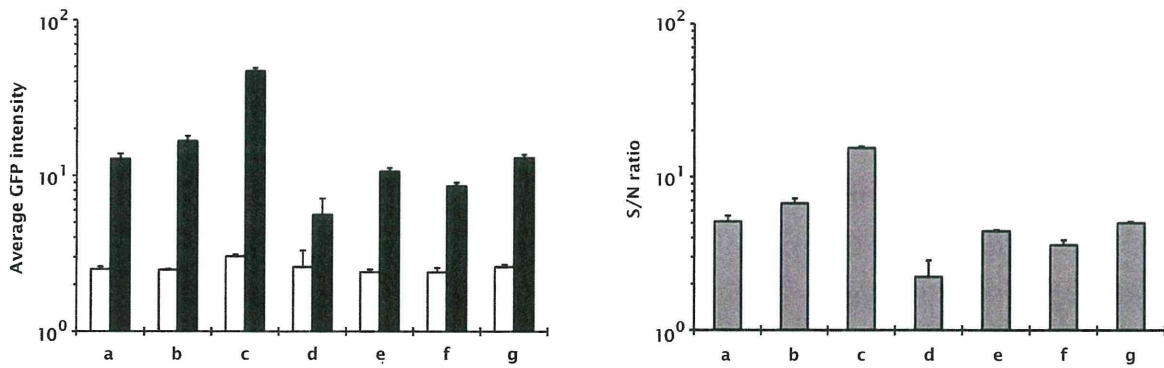


図 2 各種酵母株によるシグナル伝達アッセイの定量比較

- (a) MI-150/pGK421-SSTR5/pSL-GPA1/pMHG-FIG1
- (b) MI-150/pGK421-SSTR5/pSL-Gi3tp/pMHG-FIG1
- (c) IM-50/pGK421-SSTR5/pMHG-FIG1
- (d) IMF-50/pGK421-SSTR5
- (e) IMFD-50/pGK421-SSTR5
- (f) IMFD-70/pGK421-SSTR5
- (g) IMFD-72/pGK421-SSTR5



## 原子間力顕微鏡(AFM)を用いたアプタマー作成系の構築

研究分担者：荻野 千秋 神戸大学大学院工学研究科・准教授

### 研究要旨

細胞の表面には疾病の治療薬の標的となるレセプターや抗体が多数存在することが報告されているが、細胞上に着目したとき、細胞表面の蛋白質の分布等は分かっていない。そこで AFM を用いた生体分子へのアプローチ方法を考案した。対象の細胞として培養が容易である酵母を用い、酵母表面に存在する G 蛋白質共役型受容体(GPCR)である Ste2p とそのリガンドである  $\alpha$ -factor との相互作用の確認を行った。

### A. 研究目的

細胞の表面には様々な蛋白質が存在し、疾病の治療薬の標的となるレセプターや抗体が多数存在することが報告されている。しかし、細胞上に着目したとき、細胞表面の蛋白質の分布等は分かっていないため、細胞表面に存在する生体分子へ薬剤等の局所的なアプローチを行って細胞応答や生体分子間の相互作用を明らかにすることが求められている。AFM を用いた生体分子へのアプローチ方法を考えた。対象の細胞として培養が容易である酵母を用い、酵母表面に存在する G 蛋白質共役型受容体(GPCR)である Ste2p とそのリガンドである  $\alpha$ -factor との相互作用の確認を行った。

### B. 研究方法

酵母をアガロースで固定化し、カンチレバーに  $\alpha$ -factor を修飾し、AFM により Ste2p- $\alpha$ -factor 間相互作用を測定した。

### C. 研究結果

カンチレバーと試料表面の親和力を測定した結果、Ste2p が存在する酵母において、 $\alpha$ -factor を修飾したカンチレバーと酵母表面との間に働く特異的な力が検出された。コントロールとして Ste2p をノックアウトした酵母では大きな親和力は測定されなかった。

#### D. 考察

カンチレバーにリガンドを修飾して、酵母上 300 nm 四方の親和力を測定し、その値をヒストグラムにしたものを Fig. 6 に示す。α-factor を修飾したカンチレバーには平均結合力が強く測定され、一方で未修飾のものは弱い力が働いた。また、Ste2 を欠損させた酵母でも強い力は見られなかったため、酵母表面の Ste2p とカンチレバー先端の α-factor の間に親和力が働いていると考えられる。これらの結果より、AFM により細胞表層のレセプターとリガンド間の相互作用の検出が可能になったと考えられる。

#### E. 結論

本研究では細胞表層のレセプターとリガンド間の相互作用評価系の構築に成功した。この評価系の構築により、取得されたアプタマーの機能評価を従来と比較して迅速に行うことが可能となると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

○荻野 千秋・野坂 和輝・石井 純・宮地 佑典・近藤 昭彦「AFMを用いた生細胞表層のレセプター・リガンド間相互作用解析と細胞応答の観察」『日本化学会第91春季年会』, 神奈川、2011年3月

○荻野 千秋・早瀬 太治・宮地 佑典・近藤 昭彦「原子間力顕微鏡を用いたアミノ酸に対する機能性核酸分子・アプタマーの新規選抜法の開発」『日本化学会第91春季年会』, 神奈川、2011年3月

○野坂和輝, 宮地佑典, 石井純, 荻野千秋, 近藤昭彦「力学的指標による生細胞表面におけるリガンド-受容体の相互作用解析」『化学工学会第42回秋季大会』, 京都, 2010年9月

○Nosaka K, Miyachi Y, Ishii J, Ogino C, Kondo A. Investigation of the interaction between GPCR and ligand by AFM equipped with bio-molecule modified cantilever. Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC 2009), 2009, Nov, Kobe, Japan

#### G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

蛍光蛋白質を利用した、  
受容体の発現量・局在性・シグナル伝達能評価系の確立

研究代表者：田中 勉 神戸大学大学院工学研究科・准教授

## 研究要旨

これまでに開発したシアン蛍光蛋白質（CFP）を利用した新規評価系を用いて 4 種類のヒト GPCR の発現量比較を行った。

### A. 研究目的

これまでに構築した新規評価系の有効性を検証するために、4 種類のヒト GPCR に CFP を融合して、発現量を比較した。本系により、SSTR5 以外の GPCR についても RNA アプタマーの評価を行うことが可能である。

### B. 研究方法

ヒト GPCR の標的として、ソマトスタチン受容体サブタイプ 5（SSTR5）に加え、アンジオテンシン受容体（AGTR1）、エンドセリン受容体（EDNRB）、セロトニン受容体（HTR1A）を選択した。これらの N 末端に分泌シグナル配列として、prepro、pre、Ste2N 配列を付加し、さらに C 末端にシアン蛍光タンパク質（CFP）を融合した。これらを発現する酵母株を用いて、細胞内での CFP の蛍光強度を測定した。さらに、各種シグナル配列を付加した SSTR5 について、緑色蛍光レポーター（GFP）遺伝子発現によ

りリガンド添加によるシグナル伝達効率を測定した。

### C. 研究結果

C 末端に CFP を融合した評価系により、4 種類すべてのヒト受容体の発現量をモニターしたところ、SSTR5 以外の GPCR について prepro 分泌シグナル配列の付加により最も発現量を向上させることに成功した（図 1）。さらに、SSTR5 のシグナル伝達効率を GFP によりモニターした結果から、CFP での受容体の発現量とシグナル伝達効率が対応することを明らかとした。

### D. 考察

CFP を用いることにより、様々な受容体の発現量をモニターすることが可能であることを示した。さらに、CFP の蛍光を測定することにより、シグナル伝達効率についても評価することにも成功した。本評価系は取得したアプタマーを簡便に

評価することが可能である。

## E. 結論

CFP 蛍光蛋白質の蛍光強度を測定することで、受容体の発現量・局在性・シグナル伝達能を評価できる系を確立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Iguchi Y, Ishii J, Nakayama H, Ishikura A, Izawa K, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. (2010) Control of signalling properties of human somatostatin receptor subtype 5 by additional signal sequences on its amino-terminus in yeast. J Biochem. 147, 875-884.

### 2. 学会発表

Iguchi Y, Ishii J, Tanaka T, Kondo A. "Expression and signaling analyses of human G protein-coupled receptor in yeast" Asia Pacific Biochemical Engineer -ing Conference 2009 (APBioChEC 2009), 2009, Nov, Kobe, Japan

## G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし