

研究区分	教員特別研究推進（地域振興）
------	----------------

研 究 テーマ	生細胞ベースでの膜タンパク質の分子間相互作用の測定				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	児島 憲二
	研究協力者	所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発 表 者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	児島 憲二

講演題目
生細胞ベース BLI 法によるチロシンキナーゼ型レセプター - リガンド間相互作用の測定
研究の目的、成果及び今後の展望 【目的】 細胞表面に発現するレセプターは格好の創薬標的である。可溶性のレセプターについては、リガンドとの相互作用の測定に表面プラズモン共鳴（SPR）測定が汎用されている。一方、細胞膜レセプターについて SPR 測定を行う場合、膜タンパク質であるためその精製に時間がかかることや天然の立体構造を保持した状態で精製することが困難であるといった課題があげられる。そこで、レセプターを細胞表面に発現させた状態でリガンドとの相互作用を測定する“生細胞ベースでの測定系”を開発できれば、細胞膜レセプターを標的とする薬剤の探索が加速すると考えられる。本研究では、SPR 法よりもクルードな試料の測定に向いているバイオレイヤー干渉（BLI）法を用い、ペプチドホルモンのカイコガ前胸腺刺激ホルモン PTTH とショウジョウバエ胚由来 S2 細胞表面に発現させたレセプターTorso をモデルとして用い、生細胞ベース BLI 測定法の開発を試みた。 【方法】 BLI 測定には Octet R2（Sartorius）を用いた。C 端に His₆ タグを付加した PTTH（PTTH-His₆）を NTA Biosensor に固定化する方法として、①Biosensor 上の Ni-NTA 基と PTTH-His₆ の His₆ タグ間の相互作用を利用する方法と、②Biosensor を EDC/NHS で処理してから PTTH-His₆ を共有結合させた後、エタノールアミンおよび EDTA で処理する方法の 2 通りを試し、対照実験用として PTTH-His₆ を加えずに同様の処理をした Biosensor も用意した。これらの Biosensor をそれぞれ、遺伝子を導入して Torso を細胞表面に発現させた S2 細胞と対照となる Torso が発現していない野生株の S2 細胞の懸濁液に浸し、両者のレスポンス値の差より Torso-PTTH 間の相互作用を評価した。 【成果と今後の展望】 ①の方法に比べ、②の方法で PTTH-His₆ を固定化した場合では、Biosensor への S2 細胞の非特異的吸着が抑制され、PTTH-His₆ と S2 細胞表面上の Torso との間の相互作用を明瞭に検出できた。また、PTTH-His₆ の代わりにウシ血清アルブミンを固定化した Biosensor ではそのような相互作用が検出されず、Torso と PTTH-His₆ との間の相互作用を検出できていることを支持する結果が得られた。今後は、Torso-PTTH 間の相互作用を遮断するような候補化合物を細胞懸濁液に添加した際に相互作用に由来するレスポンスが減弱することを確認するなどして、本測定法のレセプター阻害剤探索への利用可能性を調べる予定である。