

平成18年 3 月 2 日

氏名 駱煥東



## 21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科  
応用化学専攻、化学システム工学専攻、  
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成17年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	らく かんとう 駱 煥 東	生 年 月 日
所属機関名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻	
所在地	東京都文京区本郷7-3-1	
申請時点での 学 年	博士課程1年	
研 究 題 目	細胞内シグナル伝達過程のイメージング技術の開発	
指導教員の所属・氏名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 長棟 輝行 教授	

I 研究の成果 (1000 字程度)

【概要】

生細胞内シグナル伝達分子の挙動を調べるために、蛍光蛋白質などで標識することなく細胞内在性シグナル分子の挙動をイメージングする技術が望ましい。そこで、我々は以前開発した Enhanced FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 免疫測定法原理(Fig. 1)に基づき、シグナル分子を特異的認識する蛍光標識抗体コンジュゲートを利用したイメージングする技術の開発を行った。この方法により、EGF 刺激による抗体コンジュゲートを導入した細胞内でモデルシグナル分子 GST-ERK1 のリン酸化過程をイメージングすることを試みた。

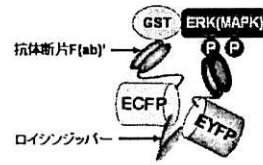


Fig.1 Enhanced FRET法により細胞内ERK1リン酸化の検出原理

【実験方法】

1. 抗体コンジュゲートの調製

抗 GST 抗体断片 F(ab)'を二価性マレイミド架橋剤で ECFP と結合した。この ECFP は N 末側にフレキシブルリンカー、C 末側にロイシンジッパー(c-jun)を持つ融合蛋白質である。フレキシブルリンカーの N 末端付近にマレイミド結合部位として導入した Cys 残基に架橋剤を介して F(ab)'を結合させ、抗 GST 抗体 F(ab)'-ECFP-Jun を調製した。同様に抗リン酸化 ERK 抗体 F(ab)'-EYFP-Jun 抗体コンジュゲートも作製した。

2. EGF 刺激による GST-ERK1 分子の細胞内リン酸化の観察

無血清 DMEM 培地で 3 時間以上血清スタベーションをかけた HeLa 細胞に抗 GST 抗体 F(ab)'-ECFP-Jun 抗体コンジュゲート (2 $\mu$ M) と抗リン酸化 ERK1 抗体 F(ab)'-EYFP-Jun 抗体コンジュゲート (2 $\mu$ M) とモデルシグナル分子 GST-ERK1 融合蛋白質 (4 $\mu$ M) の混合液をマイクロインジェクションにより導入した。この細胞の培養液中に EGF (40ng/ml) を添加し、細胞内に導入した GST-ERK1 のリン酸化挙動を FRET 蛍光顕微鏡で観察した。

【結果】

GST-ERK1 分子と二種類の抗体コンジュゲート分子を導入した HeLa 細胞に EGF を添加すると、細胞質部分で FRET 比の上昇が観察された。(Fig. 2, A) EGF 添加約 6 分 15 秒に FRET 比は添加前の 1.19 から最大値の 1.53 に上昇し、その後、徐々に減少していった (Fig. 2, B)。この FRET 比の上昇は、EGF 刺激により細胞内 MAP キナーゼシグナル伝達経路が活性化し、導入した GST-ERK1 がリン酸化されることで、抗体コンジュゲートと結合し、FRET が観察できたと考えられる。この方法は適切な抗体があれば、細胞内他の内在性シグナル伝達分子のリン酸化挙動をイメージングすることにも応用が期待できる。

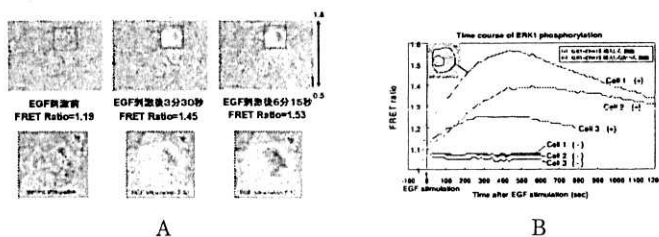


Fig. 2 EGF 刺激による HeLa 細胞内での GST-ERK1 のリン酸化

氏 名 駱煥東

Ⅱ (1) 學術雜誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

氏 名 駱煥東

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者 (全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

ポスター発表

1. 蛍光共鳴エネルギー移動現象を利用した細胞内 ERK1 リン酸化変化のイメージング

駱 煥東・加藤耕一・大廣義幸・柴田典緒・長棟輝行

日本化学工学会第 37 回秋季大会、岡山、2005 年 8 月。

2. **Bioimaging of phosphorylation of ERK1 in living cell using Fluorescence Resonance Energy Transfer**

Huandong Luo, Koichi Kato, Yosiyuki Ohiro, Norio Sibata, Teruyuki Nagamune

11<sup>th</sup> YABEC, Beijing, October 2005.