

平成 29 年度 博士学位論文

主論文

2 次元 SPR 技術を用いた細胞内反応の リアルタイムモニタリングとその応用

Real-time monitoring of intracellular reactions using
two-dimensional surface plasmon resonance technique and its application

生命融合科学教育部 生体情報システム科学専攻

氏名 白石 有希

指導教員 篠原 寛明 教授

平成 30 年 1 月

目次

第 1 章 序論

| | |
|----------------------------------|---|
| 1-1 本研究の背景----- | 1 |
| 1-1-1 最近の細胞内反応可視化技術----- | 1 |
| 1-1-2 表面プラズモン共鳴(SPR)測定----- | 2 |
| 1-1-3 2次元 SPR 観察法----- | 2 |
| 1-1-4 生細胞の 2次元 SPR 観察の利点と応用----- | 3 |
| 1-2 本研究の目的----- | 4 |

第 2 章 神経モデル細胞において 2次元 SPR 観察は

何をモニタリングしているのか？

| | |
|--|----|
| 2-1 緒言----- | 5 |
| 2-1-1 本章の実験目的と実験計画----- | 5 |
| 2-1-2 PKC の蛍光観察----- | 6 |
| 2-2 試薬および測定装置----- | 6 |
| 2-3 実験方法----- | 8 |
| 2-3-1 試薬の調製および細胞培養----- | 8 |
| 2-3-1-1 DMEM の調製----- | 8 |
| 2-3-1-2 HBSS の調製----- | 8 |
| 2-3-1-3 阻害剤の調製と細胞への添加濃度----- | 9 |
| 2-3-1-4 PC12 細胞の培養----- | 10 |
| 2-3-2 2次元 SPR イメージング装置による観察方法----- | 10 |
| 2-3-2-1 2次元 SPR 観測用チップ上での細胞培養----- | 10 |
| 2-3-2-2 共鳴 (SPR) カーブの測定----- | 10 |
| 2-3-2-3 経時変化測定----- | 11 |
| 2-3-3 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による PKC のトランスロケーション観察----- | 11 |
| 2-4 結果および考察----- | 12 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2-4-1 | PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答観察----- | 12 |
| 2-4-1-1 | PMA 刺激に対する PC12 細胞領域の共鳴角の変化----- | 12 |
| 2-4-1-2 | PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答の経時変化----- | 12 |
| 2-4-2 | 阻害剤処理後の PC12 細胞の PMA に対する SPR 応答観察----- | 13 |
| 2-4-2-1 | スタウロスポリンで前処理した場合の PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答----- | 13 |
| 2-4-2-2 | サイトカラシン B で前処理した場合の PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答----- | 13 |
| 2-4-2-3 | D-エリスロスフィンゴシンで処理した場合の PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答----- | 14 |
| 2-4-3 | 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による PKC トランスロケーション観察----- | 14 |
| 2-5 | まとめ----- | 14 |
| 図表 | ----- | 15 |

第 3 章 インスリン刺激時のラット骨格筋芽細胞内反応の

2 次元 SPR 観察と検討

| | | |
|---------|-------------------------------|----|
| 3-1 | 諸言----- | 21 |
| 3-2 | 試薬および測定装置----- | 22 |
| 3-3 | 実験方法----- | 24 |
| 3-3-1 | 試薬の調製および細胞培養----- | 24 |
| 3-3-1-1 | MEM alpha の調製----- | 24 |
| 3-3-1-2 | 阻害剤の調製と細胞への添加----- | 24 |
| 3-3-1-3 | インスリン溶液の調製----- | 24 |
| 3-3-1-4 | ラット骨格筋芽細胞 L6 の培養と継代操作----- | 24 |
| 3-3-2 | 2 次元 SPR イメージング装置による観察方法----- | 25 |
| 3-3-2-1 | 2 次元 SPR 観測用チップ上での細胞培養----- | 25 |

| | |
|---|----|
| 3-3-2-2 共鳴(SPR)カーブの測定----- | 25 |
| 3-3-2-3 経時変化の観察----- | 26 |
| 3-4 結果および考察----- | 27 |
| 3-4-1 2次元 SPR 観察におけるインスリン刺激時の L6 細胞の応答----- | 27 |
| 3-4-1-1 インスリン刺激に対する L6 細胞領域の共鳴角変化----- | 27 |
| 3-4-1-2 L6 細胞の SPR 応答のインスリン濃度依存性----- | 27 |
| 3-4-2 阻害剤処理後のインスリン刺激に対する L6 細胞の SPR 応答観察----- | 27 |
| 3-4-2-1 スタウロスポリンで前処理した L6 細胞のインスリン刺激時の SPR 応答----- | 28 |
| 3-4-2-2 サイトカラシン B で前処理した L6 細胞のインスリン刺激時の SPR 応答----- | 28 |
| 3-4-3 予想される細胞内情報伝達経路と SPR 観察される細胞内反応の阻害剤による検討----- | 28 |
| 3-5 まとめ----- | 29 |
| 図表----- | 30 |

第 4 章 インスリン及びブラジキニン刺激に対する

ラット筋管細胞内反応の 2 次元 SPR 観察と考察

| | |
|------------------------------------|----|
| 4-1 緒言----- | 35 |
| 4-2 試薬及び測定装置----- | 35 |
| 4-3 実験方法----- | 37 |
| 4-3-1 試薬の調製および細胞培養----- | 37 |
| 4-3-1-1 MEM alpha の調製----- | 37 |
| 4-3-1-2 インスリン溶液の調製----- | 37 |
| 4-3-1-3 ブラジキニン溶液の調製----- | 37 |
| 4-3-1-4 ラット骨格筋芽細胞 L6 の培養と継代操作----- | 37 |

| | | |
|---------|---------------------------------|----|
| 4-3-1-5 | L6 細胞の筋管細胞への分化誘導 | 38 |
| 4-3-2 | 2次元 SPR イメージング装置による観察方法 | 38 |
| 4-3-2-1 | 2次元 SPR 観察用チップ上での細胞培養 | 38 |
| 4-3-2-2 | 経時変化観察 | 39 |
| 4-4 | 結果および考察 | 39 |
| 4-4-1 | インスリン刺激時の筋管細胞の 2次元 SPR 応答 | 39 |
| 4-4-2 | 筋管細胞領域における SPR 応答のインスリン濃度依存性 | 40 |
| 4-4-3 | ブラジキニン刺激時の筋管細胞領域における 2次元 SPR 応答 | 40 |
| 4-5 | まとめ | 41 |
| 図表 | | 42 |

第 5 章 インスリンアナログの刺激に対する

ラット筋管細胞内反応の 2次元 SPR 観察と考察

| | | |
|---------|-------------------------|----|
| 5-1 | 緒言 | 44 |
| 5-2 | 試薬および測定装置 | 45 |
| 5-3 | 実験方法 | 46 |
| 5-3-1 | 試薬の調製および細胞培養 | 46 |
| 5-3-1-1 | MEM alpha の調製 | 46 |
| 5-3-1-2 | インスリン溶液の調製 | 47 |
| 5-3-1-3 | インスリンアナログ溶液の調製 | 47 |
| 5-3-1-4 | ラット骨格筋芽細胞 L6 の培養と継代操作 | 47 |
| 5-3-1-5 | L6 細胞の筋管細胞への分化誘導 | 47 |
| 5-3-2 | 2次元 SPR イメージング装置による観察方法 | 47 |
| 5-3-2-1 | 2次元 SPR 観察用チップ上での細胞培養 | 47 |
| 5-3-3 | 経時変化観察 | 48 |
| 5-4 | 結果および考察 | 49 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 5-4-1 種々のインスリンアナログで刺激した際の | |
| 筋管細胞の2次元 SPR 応答の違いと考察----- | 49 |
| 5-4-2 筋管細胞の2次元 SPR 応答によるインスリン計測----- | 49 |
| 5-5 まとめ----- | 50 |
| 図表----- | 51 |

第6章 結章

| | |
|--------------|----|
| 本研究のまとめ----- | 56 |
| 参考文献----- | 58 |
| 謝辞----- | 62 |

第1章 序章

1-1

本研究の背景

細胞内における情報伝達反応の可視化は特定のタンパク質に対して GFP などの蛍光分子を標識化し、細胞質や核内における局在や、その移動を蛍光モニタリングする、あるいは Ca^{2+} インドicatorなどの蛍光プローブを用いてモニタリングする手法が一般的に広く用いられている。しかしながら分子レベルの反応の追跡はきわめて困難で手間と多くの時間を要する。また iPS 細胞、ES 細胞をはじめとする分化多能性細胞技術が進歩する中、これらの細胞内反応の可視化技術はそれら細胞の状態評価に必要不可欠な技術として様々な研究開発が行われている。現在最も一般的な細胞観察手段の一つとして顕微鏡観察が挙げられるが高倍率の光学顕微鏡や電子顕微鏡でも細胞内部における特定の反応を可視化することは、その前処理や技術面においても熟練を要する。また、細胞内で特定のタンパク質を検出する方法として、目的タンパク質に遺伝子レベルで GFP を標識化する方法のほか、特異的にタンパク質を認識する抗体を用いた免疫染色法やウェスタンブロット法などが広く信頼できる手法として用いられてきた。しかしながら無傷で非標識の細胞内観察技術は、これからの細胞生物学の発展、生理活性物質の細胞への作用評価、または分化多能細胞における分化状態評価などへの応用が可能であり、一層求められている。

1-1-1

最近の細胞内反応可視化技術

上記した GFP 融合タンパク質の作製および共焦点レーザー顕微鏡などを用いた観察法は目的タンパク質の細胞内での可視化に大変有効であり、様々な蛍光団を用いたマルチカラーイメージングによって複数の細胞内分子の挙動をイメージングできることが報告されている¹。また、標的分子に特異的なプローブを化学修飾することで細胞に外来の遺伝子を導入することなく細胞内分子を観察する方法も報告され様々な研究に用いられてきている²。

ごく最近報告された細胞内反応の可視化技術として注目されている手法1つとして、共焦点ラマン分光顕微鏡を用いた細胞内部で特定物質のトラッキングを行う方法がある。ラマンスペクトルを2次元的に取得しイメージングする技術で細胞内物質の固有スペクトルによるイメージングが可能である³。しかしながら、機器が大変高価である点や、励起光が高出力である点で細胞を傷害するという問題も報告され、またラマンスペクトル取得までに比較的時間がかかる点からリアルタイム細胞内反応の可視化に大きな障害となっている。

1-1-2

表面プラズモン共鳴(SPR)測定

バイオセンサのなかで近年広く使われている方法の一つに SPR(Surface Plasmon Resonance)測定法がある。SPR は金属表面を伝播する局在性自由電子の疎密波であるプラズモン波と臨界角を超える全反射条件で入射する電磁波が引き起こすエバネッセント波との共鳴吸収現象を指す。この SPR 現象を利用し、クレッチマン配置⁴と呼ばれるガラス上に蒸着された金属薄膜に対し、ガラス側から全反射条件で入射面に対して並行な P 波の光線を入射させることで、共鳴吸収現象を誘起させることができる。この時の反射光強度を記録することによって金属表面近傍(エバネッセント領域)における屈折率の変化を非常に敏感に検知することが可能である。そのため、この SPR 現象は金属薄膜表面の極微小な抗原-抗体反応や、DNA のハイブリダイゼーション反応などの分子間相互作用を検出・定量できるバイオセンサとして数多く応用されている⁵⁻⁷。

1-1-3

2 次元 SPR 観察法

1-1-2 に示した表面プラズモン共鳴現象を 2 次元で走査し観測することで、画像として情報を得ることができる 2 次元 SPR イメージング (2D-SPRi)が開発された。1 次元 SPR 測定では入射光はスポット光であるのに対して、2 次元 SPR では光源からの光を並行光として照射することで、観測対象の界面で生じる微細な変化を屈折率変化として敏感に画像として取得することができる。SPR 観察法特有の高感度な検出に加え、ある程度の面積における固体界面近くの屈折率変化を画像としてリアルタイムに観察しうることから、マルチスポット化したバイオセンサへの応用や、蛍光標識などの修飾を要しないため励起光による蛍光分子の光退色を考慮する必要がない非侵襲的な観察方法として細胞観察などにも応用が報告されてきている⁸⁻¹⁰。

1-1-4

生細胞の 2 次元 SPR 観察の利点と応用

2 次元 SPR による細胞観察では共焦点蛍光分光法や、共焦点ラマン分光法では得ることのできない金薄膜に接着した細胞底面の屈折率変化をリアルタイムにモニタリングすることが可能である。SPR 観察においては標的に対して特定の標識を必要としないため、ターゲットとなるタンパク質を限定する必要がある点から、生薬抽出物のような様々な混合物の中から標的組織の細胞に作用しうる物質の有無や、その複合物について薬剤の第一選択スクリーニングにおいて迅速に候補化合物を選別することが可能であると考えられる。

また細胞を分子認識素子として考えた場合では、細胞応答性のある物質の評価を極短時間で行える可能性がある。例として本論文で注目しているインスリンは通常その力価を抗体に結合する抗体結合能(immune reactive insulin :IRI)として評価されるが、SPR と細胞の組み合わせによって細胞活性なインスリンを検出・評価することも可能であると考えられる。またその細胞の SPR 応答は、様々な細胞内情報伝達反応を経由した結果であると考えられ、既存の評価技術やその情報伝達経路特異的な阻害剤などと組み合わせることによって今まで見落されてきた中間反応の存在を予見することも可能であると考えた。また、特定のレセプターや特定組織の細胞をセンサ素子として用いることで毒物スクリーニングや味覚などの擬似センシングにも応用が可能であると考えられる。

1-2

本研究の目的

私の所属する研究室では 2 次元 SPR 法を用いて非侵襲・非標識での細胞内反応の観察を種々の細胞で報告してきている。その中で PKC の細胞膜内側へのトランスロケーションが SPR シグナル変化の一因であることが示されてきた^{11,12}。そこで本研究ではまず生細胞の 2 次元 SPR 観察で観測される細胞内反応の適用範囲をさらに広げるため、受容体をアゴニスト刺激した場合の細胞内反応が異なる細胞を選び、種々のキナーゼ阻害剤やアクチフィラメント重合阻害剤で処理した場合、SPR 応答がどのように変化するかを検討することとした。

また、この PKC 以外で細胞膜近傍の屈折率変化させる可能性のある分子として Glut4(Glucose Transporter 4)に着目した。Glut4 は筋芽細胞、骨格筋、肥満細胞、など全身でも広範囲にわたり発現しており、遊離のグルコースを細胞内へと取り込むタンパク質因子である¹³。通常 Glut4 は貯蔵小胞に埋め込まれ細胞質内に分散しているが、インスリン刺激によって種々のリン酸化反応を経て、貯蔵小胞が細胞膜近傍へと能動輸送され、膜融合することによって細胞膜へ局在化しその密度を上昇させることが知られている¹⁴。この Glut4 の細胞膜へのトランスロケーション過程は、SPR と同様にエバネッセント領域を観察域とする TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) 顕微鏡によって細胞底部でもそのトランスロケーションが生じることが報告されている¹⁵⁻¹⁷。そこで 2 次元 SPR によっても Glut4 の細胞底部でのトランスロケーションが観察できるのではないかと考え、筋芽細胞や、それから分化誘導される筋管細胞を用いてその細胞膜受容体を持つインスリンやブラジキニンで刺激した際の 2 次元 SPR 観察を試みることにした。

本論文ではこれまで明らかになってきた PKC のトランスロケーション以外にも細胞内情報伝達反応として細胞底部の膜内側近傍でおきる種々のキナーゼ集合やアクチンフィラメントの重合反応が 2 次元 SPR で観察可能な事を明らかにし、その応用性を拡張する事を目的とした。

2 章 神経モデル細胞において 2 次元 SPR 観察は何をモニタリングしているのか？

2-1

緒言

2 次元 SPR を用いた神経モデル細胞(Pheochromocytoma 12:ラットの副腎髄質由来褐色細胞腫)PC12 の細胞内反応の観察において種々の濃度の KCl や PMA(ホルボール-13-アセテート:PKC 活性化剤)による刺激によって SPR シグナルがその刺激物質濃度依存的に変化することが 2013 年以降 Mir らのグループによって報告されている¹⁸。この報告は 2 次元 SPR が細胞内における PKC の細胞膜内側へのトランスロケーションをモニタリングしている可能性を示唆した。そこで本章では 2 次元 SPR 観察における PC12 細胞内で起きる PKC のトランスロケーションがどのように 2 次元 SPR シグナルへ影響を与えるかを詳細に検討するため、非特異的キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンおよび、PKC アイソタイプのうち cPKC(Conventional type PKC)特異的阻害剤である D-エリスロスフィンゴシン、または細胞骨格であるアクチンフィラメント構成要素であるアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン B で前処理した細胞に対して PMA 刺激を行なった場合の 2 次元 SPR シグナルを検討した。

2-1-1

本章の実験目的と実験計画

PC12 細胞は NGF 投与によって末梢神経様細胞に分化することから、神経前駆細胞モデルとして広く利用されている。細胞膜上にイオンチャネル型のニコチン性アセチルコリン受容体と代謝調節型のムスカリン性アセチルコリン受容体を発現することが報告されている。また、上記 Mir らの報告によると、2 次元 SPR 観察において PMA 刺激によって PKC のトランスロケーションに由来すると考えられる、シグナルの上昇が報告されている。本実験ではこの PC12 細胞を PMA 刺激した際の 2 次元 SPR シグナルが種々の阻害剤の処理によって変化することに基づき、このシグナル上昇が細胞内のどのような反応に起因するかを考察した。まず、最初に PKC のキナーゼ活性が SPR シグナルに及ぼす影響を検討するため、非特異的キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンで前処理した場合の PMA 刺激に応答した PC12 細胞がどのように SPR シグナルを変化させるか検討した。次に、PKC のアイソタイプである cPKC 特異的な阻害剤である D-エリスロスフィンゴシンで細胞を前処理した場合の PMA 刺激が SPR シグナルに及ぼす影響を検討した。さらに、細胞骨格構成因子であるアクチンフィラメントの合成阻害剤であるサイトカラシン B を前処理した場合に、PMA 刺激が SPR シグナルに及ぼす影響を検討した。アクチン重合阻害剤を添加した脂肪細胞において、TIRF 観察を行った報告があり¹⁶、アクチン重合阻害がエバネッセント領域における SPR シグナルに影響を及ぼす可能性があるものと予期して実験を行い、検討した。最後にこれらの結果を確認するため、蛍光ラベルした PKC の共焦点蛍光顕微鏡観察も行った。

2-1-2

PKC の蛍光観察

PKC の細胞内局在の研究は GFP 融合タンパク質や PKC 特異的結合能を持つ蛍光指示薬としてキナーゼドメインへ結合能をもつ Fim-1 や Rim-1 などが開発され、これらを用いた PKC の細胞内局在解析が行われている¹⁹⁻²²。また PC12 細胞において PKC に特異的に結合する蛍光指示薬として Fim-1 を、また蛍光カルシウム指示薬に Fura-2 AM を用いて二重染色した細胞に対して、アセチルコリン受容体アゴニストであるカルバコール刺激を行う研究がなされ、細胞内カルシウム濃度変化と PKC の局在変化のリアルタイム同時観察が報告されている²³。

本実験では細胞膜近傍への PKC トランスロケーションの観察を行うため、PKC を Fim-1 で、また細胞膜を FM1-43 で染色した細胞に対して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて PMA 刺激時の PKC の細胞膜へのトランスロケーション観察を行った。

2-2

試薬および測定装置

【培地(DMEM)】

Dulbecco's Modified Eagle Medium 品番 1184588 GIBCO

Sodium Hydrogen Carbonate(NaHCO_3) 99.5~100.3 % 品番 191-01305 Wako

Fetal Bovine Serum(FBS) 品番 S06931S1820 BioWest

Horse Serum (HS) 品番 546047 GIBCO

Penicillin-Streptomycin (Antibiotics) 品番 15070-063 GIBCO

【細胞培養】

0.05 % Trypsin-EDTA 品番 25300-054 GIBCO

Phosphate Buffered Saline Powder 品番 162-19321 Wako

プラスチックピペット(5 mL) 品番 94005 BM

遠心管(15 mL) 品番 90025 BM

培養フラスコ(60 mL) 品番 90026 BM

φ 35 mm ガラスボトムディッシュ 品番 3961-035 IWAKI

【Hanks' balanced Salt Solution: HBSS】

Calcium Chloride Dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 99.0~100.3% 特級品番 031-00435 Wako
Magnesium Sulfate(MgSO_4) 98.0 +% 特級 品番 137-12335 Wako
Potassium Chloride(KCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 163-03545 Wako
Potassium Dehydrogenphosphate (KH_2PO_4) $\geq 99\%$ 特級品番 169-04245 Wako
Sodium Chloride(NaCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 191-01665 Wako
Sodium Phosphate Dibasic(Na_2HPO_4) $\geq 99\%$ 特級 品番 197-02865 Wako
Sodium Hydrogen Carbonate(NaHCO_3) 99.5~100.3% 特級 品番 191-01305 Wako
Magnesium Chloride Hexahydrate($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 98.0+% 特級 品番 135-00165 Wako

【ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート:PMA】

Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) 細胞生物学用 品番 162-23591Wako

【スタウロスポリン】

Staurosporine $\geq 95.0\%$ (HPLC)生化学用 品番 193-10253 Wako

【サイトカラシン B】

Cytochalasin B $\geq 98.0\%$ (HPLC)生化学用 品番 030-17551Wako

【D-エリスロスフィンゴシン】

D-erythro-Sphingosine $\geq 99\%$ (TLC)生化学用 品番 192-11161Wako

【Fim-1 K+Salt】

Fim-1 K+Salt 品番 538-33541 Wako

【FM1-43】

FM1-43 $\geq 95\%$ (HPLC)品番 S6814-5MG Sigma-aldrich

【4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液】

4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution 組織固定用 品番 163-20145 Wako

【2次元 SPR 測定用チップ】

2次元 SPR 用金チップ 品番 012190 BAS Inc
flexiPERM 品番 90032039 greiner bio-one

【測定装置】

2次元 SPR イメージング装置(2D-SPR04B) NTT アドバンスドテクノロジー

- ・光源：発光ダイオード(LED)

670 nm、770 nm、870 nm の波長から選択可能、
コリメーターにより平行光とする。

- ・検出器：CCD カメラ、

画素数 45 万画素、

拡大レンズにより 1 倍、2 倍、4 倍、7 倍に拡大可能

- ・角度変化測定：走査角度範囲 49~57°

ステップ角度 0.1~2.0°

- ・時間変化測定：最大測定時間 60 分、

取り込みインターバル 0.5~600 秒

高速共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (SP8) Leica Microsystems

2-3

実験方法

2-3-1

試薬の調製および細胞培養

2-3-1-1

DMEM の調製

180℃耐熱用 250 mL メディウムビンに 180℃ 2 時間乾熱滅菌し、滅菌水を 210 mL 撈拌子とともに入れ、121℃、30 分間高圧蒸気滅菌した。DMEM 2.5 g を十分に溶解させた後、 NaHCO_3 0.925g を溶解させた。HS 25 mL (10%-v/v)、FBS 12.5 mL (5%-v/v)、Antibiotics 2.5 mL (1%-v/v) を添加後ボトルトップフィルターで濾過滅菌を行い、乾熱滅菌を行った 180℃耐熱用 250 mL メディウムビンに溶液を移し密栓して 5℃で保存した。

2-3-1-2

HBSS の調製

Hank's Balanced Salts 溶液の組成表を以下に記す。それぞれの粉末を滅菌水に溶解させ密栓して 4℃で保存した。細胞添加時は恒温槽にて 37℃に加温し使用した。

| | | | |
|---|-----------|-----------------------------|------------|
| ・ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 185 mg/L | ・ MgSO_4 | 97.67 mg/L |
| ・ KCl | 400 mg/L | ・ KH_2PO_4 | 60 mg/L |
| ・ NaCl | 8000 mg/L | ・ Na_2HPO_4 | 47.88 mg/L |
| ・ D-Glucose | 1000 mg/L | ・ NaHCO_3 | 350 mg/L |

2-3-1-3

阻害剤の調製と細胞への添加濃度

本章で用いた阻害剤の3種類のそれぞれの分子量、溶媒、24時間細胞に暴露した際に90%以上の生存率が認められた濃度を表2-1に示す。また図2-1にはこれら阻害剤の構造式を示す。各阻害剤は、溶媒が1%以下になるようHBSSで希釈し、2次元SPR観察の30分前に細胞が接着した金チップ上に表2-1の濃度で添加した。

表 2-1 阻害剤の溶媒と分子量および細胞添加濃度

| 阻害剤名 | 溶媒 | 分子量 (g mol ⁻¹) | 細胞添加濃度 (mol L ⁻¹) |
|-----------------------|----------|-------------------------------|----------------------------------|
| Staurosporine | DMSO | 299.49 | 3.0x10 ⁻⁷ |
| Cytochalasin B | Methanol | 466.53 | 2.0x10 ⁻⁷ |
| D-erythro Sphingosine | Methanol | 479.61 | 2.0x10 ⁻⁷ |

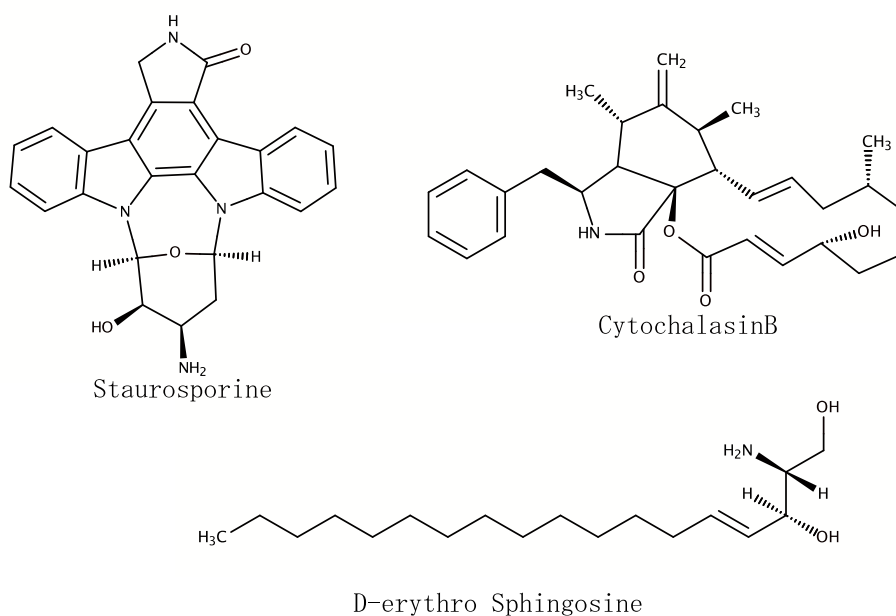


図 2-1 阻害剤の構造式

2-3-1-4

PC12 細胞の培養

DMEM を用いて 25 cm² 細胞培養用フラスコに PC12 細胞を播種した。37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養を行い、約 5 日間でコンフルエントに達した。継代操作はトリプシン EDTA で処理した細胞懸濁液を 2×10⁵ cells/mL になるよう調製し、1 mL を再び新しい培地へと播種した。

2-3-2

2 次元 SPR イメージング装置による観察方法

2-3-2-1

2 次元 SPR 観察用チップ上での細胞培養

金蒸着チップ上にフレキシバームを PDMS 樹脂を用いて固定し、180℃で 15 分間加熱し、固定し細胞用チャンバを作成した。70%エタノール消毒処理後風乾させ、クリーンベンチの中で 30 分間紫外線殺菌操作し、細胞を播種した。

細胞の播種は、継代操作と同様にトリプシン EDTA 処理した PC12 細胞を用いて密度 2.0 ×10⁵ cells/mL の懸濁液を調製し、細胞培養チャンバ上に 100 μL 添加し播種した。細胞を播種した金チップは、細胞を接着させるために約 24 時間 37℃、5%CO₂ インキュベーターで培養した。

2-3-2-2

共鳴 (SPR) カーブの測定

細胞接着させた細胞培養チャンバ内の培地をマイクロピペットで取り除き、HBSS 溶液で 2 回リンスした。その後 HBSS 260 μL をマイクロピペットを用いてチャンバ内に満たした。次に、観察装置上プリズムにマッチングオイル(屈折率 1.8)を 50 μL 滴下し、細胞チャンバを滴下したマッチングオイル上に設置した。PMA 刺激前と刺激後 40 分の時点での共鳴角を下記の条件で測定した。

測定条件：

| | | | |
|--------|---------|----------|-------|
| 光源波長 | 770 nm | 光源電流 | 50 mA |
| 走査確度範囲 | 49～52° | 走査角度ステップ | 0.1° |
| 露光時間 | 1.0 sec | レンズ倍率 | 7 倍 |

得られた結果はそれぞれ、SPR 装置備え付けのソフトウェア (SPR analyser) を用いて画像化 (639×479 pixel) し、ImageJ (Ver.1.45I) を用いて刺激前の細胞領域を元に、閾値 1:170 でマスク化し、粒子解析を用いてサイズ 40–200 (Pixel²)、Circularity 0.001–1.00 の範囲 (Option: Exclude on edges and Include holes) で RoI を作成した。そのバックグラウンド (金領域) と細胞領域 (RoI) 内の平均値を算出した。

2-3-2-3

経時変化観察

2-2-3-1 と同様に細胞接着した金チップをマッチングオイルを滴下した 2 次元 SPR 装置上のプリズムに設置した。PMA 刺激実験時は測定開始から 5 分後にコントロールとして HBSS を 20 μ L、10 分後に 1 μ M PMA 溶液を 20 μ L をマイクロピペットを用いて加え終濃度 100 nM とした。また、2 次元 SPR 装置の観察条件を下記にまとめた。

| | | | |
|------------|--------|----------|---------|
| 測定条件： | | | |
| 光源波長 | 770 nm | 光源電流 | 50 mA |
| 測定角度 | 50.2° | 露光時間 | 1.0 sec |
| レンズ倍率 | 7 倍 | | |
| 取り込みインターバル | | 3.0 sec | |
| 取り込み時間 | | 1200 sec | |

得られた SPR データは SPR カーブと同様に ImageJ を用いて解析し、それぞれのデータは独立した 3 回の実験の平均値を求め統計分析に供した。細胞領域はランダムに 100 箇所のデータを抽出し、統計処理に供した。

2-3-3

共焦点レーザー蛍光顕微鏡による PKC のトランスロケーション観察

PC12 細胞を継代時と同様に、トリプシン EDTA で処理し、 2×10^5 cells/mL の懸濁液を調製した。懸濁液を ϕ 35 mm ガラスボトムディッシュに 2×10^5 cells/dish で播種し、接着のため、約 24 時間 37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

共焦点レーザー顕微鏡観察に用いた PKC 特異的蛍光染色剤 Fim-1 K+salt は 200 μ M で HBSS に溶解させストックとして保存した。また、膜プローブである FM1-43 を用いて 2 重染色を行なった。FM1-43 は 50 μ g/mL 原液を DMSO に溶解させストックとして保存した。染色時は増殖培地中へ Fim-1 は 1/1000 量添加し、終濃度 200 nM で、FM1-43 は 1/100 量添加し終濃度 500 ng/mL で 30 分間 37°C、5% CO₂ の条件で細胞へロードした。細胞への刺激はそれぞれ終濃度 100 nM の PMA を添加後、10 分、20 分、30 分、40 分の時点で冷 PBS(-) でリンス後、4% ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 2 mL に素早く置換し 15 分間室温で固定化した。固定化後のサンプルは蛍光顕微鏡 SP8(Leica Microsystems)を用いて蛍光観察に供した。SP8 の観察条件を下記にまとめた。

得られたデータは LAS X Softwear を用いて分析した。

| | | | |
|----------------------------|--|-------|--------|
| 測定条件： | | | |
| 走査モード | XYZ | ビット深度 | 16 bit |
| 解像度 | 1048×1048 pixel | | |
| Ex λ /Em λ | = 48/520 \pm 10 nm (Fim-1), 480/598 \pm 10 nm (FM1-43) | | |
| Z 深度 | 30 μ m | | |

2-4

結果および考察

2-4-1

PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答観察

2-4-1-1

PMA 刺激に対する PC12 細胞領域の共鳴角の変化

図 2-2 および図 2-3 に 2 次元 SPR 観察で得られた画像とそれを基に ImageJ を用いて作製した RoI の範囲を示す。作製されたマスクから 130 箇所の RoI を作成し、経時的に RoI 内ピクセルの平均強度を Reflection intensity として記録した。

図 2-4 に PKC 活性化剤である PMA を終濃度 100 nM で刺激した前後での PC12 細胞領域における SPR 共鳴カーブの変化を示す。PMA 添加前の細胞領域では共鳴角は 50.4° であったのに対して PMA 刺激後 40 分の時点では 50.7° へポジティブシフトすることが観察された。PMA によって活性化される PKC のサブタイプは cPKC であり、その中でも刺激によってトランスロケーションするターゲットが変化することが知られている^{24,25}。ホルボールエステルで刺激された場合、cPKC は細胞膜へとターゲッティングされ 30 分以上細胞画分へ止まると言われており、この PMA 刺激時に観察される SPR シグナル上昇の一因であることが示唆された。また、この SPR カーブにおいて全体の 92% の細胞がほぼ同様の共鳴角を示したため、経時変化においては、 50.2° における経時変化を見ることで、刺激前後の差を最大で観察することができるため、今後の経時変化は 50.2° で観察を行った。

2-4-1-2

PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答の経時変化

図 2-5 には 100 nM PMA 刺激を行った場合の代表的な PC12 細胞領域における反射光強度の経時変化を示す。終濃度 100 nM の PMA で PC12 細胞を刺激した場合、全体の約 90%(n=100)の細胞が 10%以上($\pm 2.3\%$)の反射光強度の上昇が観察された。このことにより、PMA 刺激により PC12 細胞が SPR シグナルを上昇させることが確認された。このシグナル上昇パターンは Oancea らが報告したラット好塩基性白血病 2H3 細胞における GFP フュージョン PKC γ のトランスロケーションパターンと類似していた²⁶。

2-4-2

阻害剤処理後の PC12 細胞の PMA 刺激に対する SPR 応答観察

2-4-2-1

スタウロスポリンで前処理した場合の PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答

図 2-6 は 300 nM のスタウロスポリンで 30 分間前処理を行った PC12 細胞に対して同様に PMA 刺激を行なった場合の代表的な SPR 応答を示す。スタウロスポリンで処理すると PC12 細胞は PMA の刺激に対し 98%の細胞が約 3%($\pm 0.7\%$)以内のシグナル増加に止まった。スタウロスポリンのキナーゼ阻害機構はキナーゼの ATP 結合ポケットに競争的に結合し、リン酸化反応を阻害することが知られている²⁷。このことからスタウロスポリンによるキナーゼ類のリン酸化阻害が SPR 応答に影響を与えることが明らかとなった。しかし、この手法ではどのキナーゼが直接 SPR 応答に関与しているかは不明である。

2-4-2-2

サイトカラシン B で前処理した場合の PMA 刺激に対する PC12 細胞の SPR 応答

図 2-7 は 200 nM のサイトカラシン B で 30 分間前処理を行った PC12 細胞に対し PMA 刺激を行った場合の SPR 応答を示す。サイトカラシン B で前処理した PC12 細胞では PMA 刺激に対して全体の約 85%の細胞が約 7%以上の反射光強度($\pm 3.4\%$)の増加を示した。サイトカラシン B の前処理は細胞内のアクチンフィラメントの重合を阻害する。サイトカラシン B で前処理後、PMA を添加した直後にシグナル上昇が観察されていることから PMA 刺激による PKC の活性化に対してはアクチン重合・解重合の関与は低いものと考察した。シグナル上昇値は細胞領域全体においてサイトカラシン B 処理なしの場合と比較して約 3%程度低下していることから SPR 観察におけるシグナル上昇は、細胞膜内側のアクチンフィラメントの構造や働きとも関連していることが示唆された。また、ラット脂肪細胞においてエバネッセント領域を観察する TIRF 観察の結果においてもアクチン重合阻害剤の処理によって Glut4(Glucose Transporter 4)のトランスロケーションとグルコースの取り込み量の低下が報告されていることから¹⁷、アクチンフィラメントはエバネッセント領域においても重合・解重合を行なっていることが予想され、それらが SPR シグナル上昇量の低下に影響を与えていると考えた。これらの結果は HepG2 細胞における PMA 刺激がアクチンフィラメントの解重合を促進し、同時に PKC を活性化させるという Zegers-Hoekstra らの報告とも一致する²⁸。

2-4-2-3

D-エリスロスフィンゴシンで前処理した場合の PMA 刺激に対する PC12 細胞 SPR 応答

図 2-8 は 200 nM の D-エリスロスフィンゴシンで 30 分間前処理を行った。PC12 細胞に対して PMA 刺激を行った場合の代表的な SPR 応答を示す。全体の 98% の細胞が 4% 以下の反射光強度の変化にとどまった。D-エリスロスフィンゴシンは cPKC タイプのサブタイプに対して特異的結合能を持ち、天然のリガンドであるジアシルグリセロール結合部位である C1 ドメインに対して PMA と競合的に結合するが、膜画分へのターゲティングを行わない^{29,30}。そのため、PMA 刺激した際にも細胞膜への PKC のトランスロケーションを競争的に阻害したものと予想され、この事が SPR シグナル上昇を低下させる要因の一つであると考察した。

2-4-3

共焦点レーザー蛍光顕微鏡による PKC のトランスロケーション観察

図 2-9 および 2-10 は Fim-1 と FM1-43 で染色した PC12 細胞に対して 100 nM PMA 刺激を行った場合の共焦点蛍光観察画像である。PMA 添加から 10 分、20 分、30 分、40 分後それぞれのサンプルにおいて、Fim-1 および FM1-43 由来と考えられる蛍光が観察され、Fim-1 由来の蛍光から PKC が細胞質内に分散している様子を確認することができた。図 2-11 は添加前を 0% とした場合の各時間における Fim-1 の蛍光(F_{598nm})を PKC、細胞膜プローブである FM1-43 の蛍光(F_{520nm})を細胞膜領域と仮定し、それぞれの蛍光値の比を時間別に示したヒストグラムである。PMA による刺激によって PC12 細胞で発現している cPKC が細胞膜近傍へとトランスロケーションしていることが予想されたが、細胞間での誤差が大きく、Fim-1 蛍光の FM1-43 蛍光領域への優位な共局在化は観察されなかった。

2-5

まとめ

2 次元 SPR 観察法を用いて観察されるシグナル上昇は、PC12 細胞が発現している cPKC の局在変化に起因することがより明確になった。PMA で誘導される PKC のトランスロケーションはスタウロsporin または D-エリスロスフィンゴシンによってそのほとんどが抑制されることから SPR シグナルが PKC などのキナーゼの局在を示す一つの指標になることが示唆された。また D-エリスロスフィンゴシンは cPKC 特異的な結合能を持っていることから、PC12 細胞における PMA 刺激時の SPR シグナル変化の大部分が cPKC に由来することが示唆された。しかしながら、PKC とは直接関係の無いサイトカラシン B で前処理を行った場合でもシグナル上昇の一部が阻害されたことから、2 次元 SPR で検出されるシグナル変化は PKC にとどまらずアクチンフィラメントの重合・解重合などの細胞内反応も反映するため、細胞底部の屈折率変化が細胞内情報伝達反応を包括的にモニターしていることが確認された。

図表

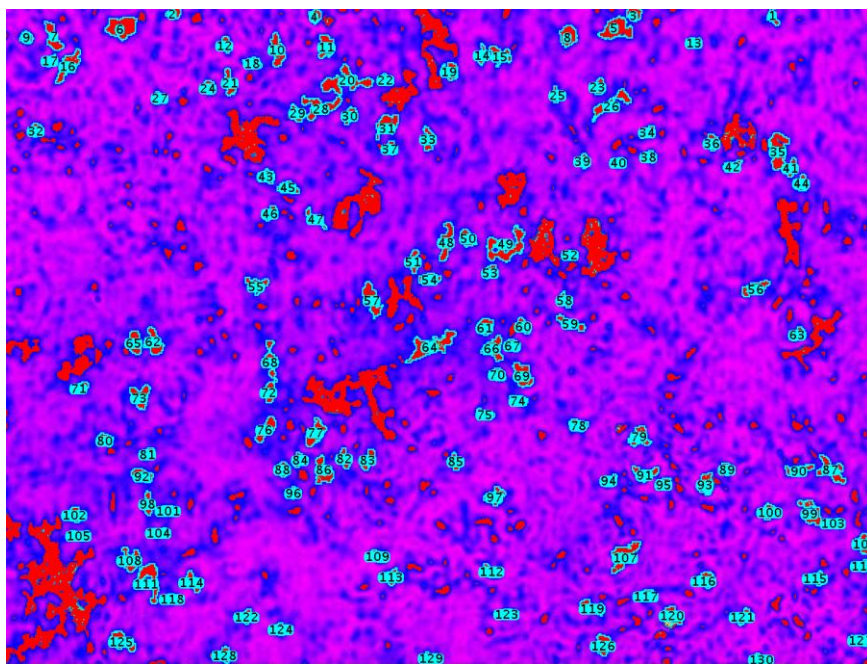


図 2-2 ImageJ による領域選択

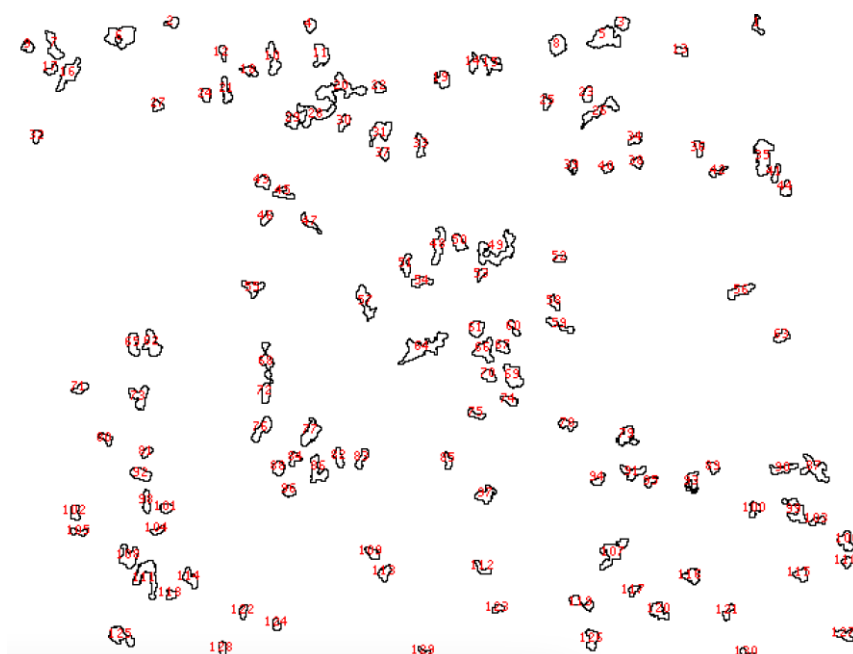


図 2-3 ImageJ による RoI の作成

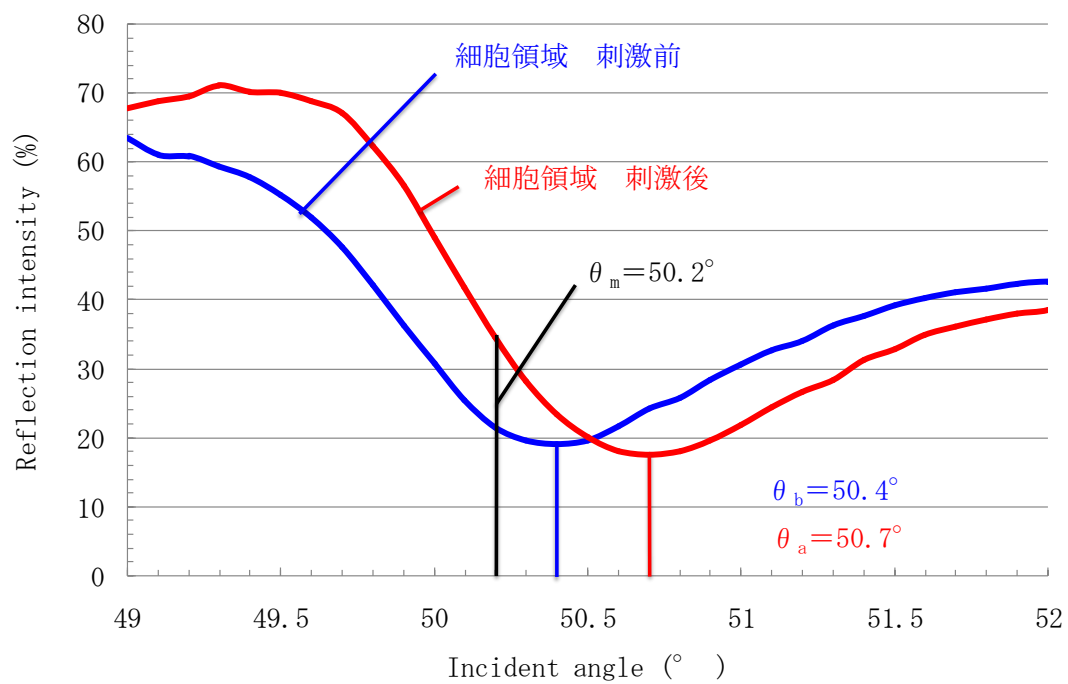


図 2-4 PMA 刺激前後の細胞領域の SPR カーブ

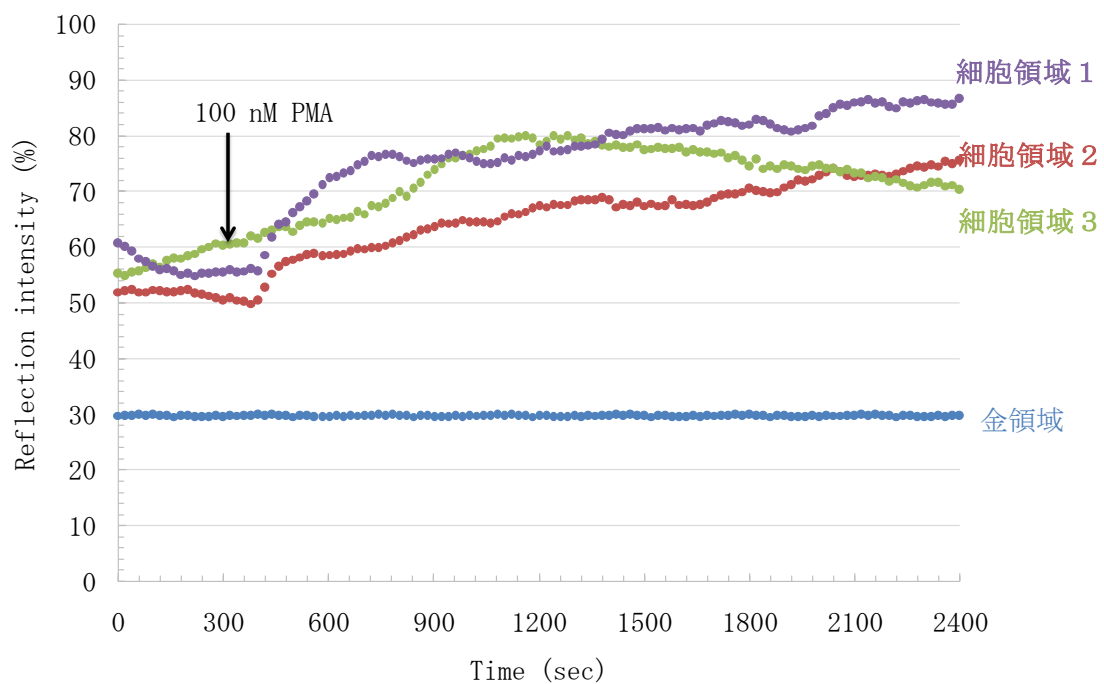


図 2-5 100 nM PMA 刺激時の PC12 細胞領域における 2 次元 SPR 応答の経時変化

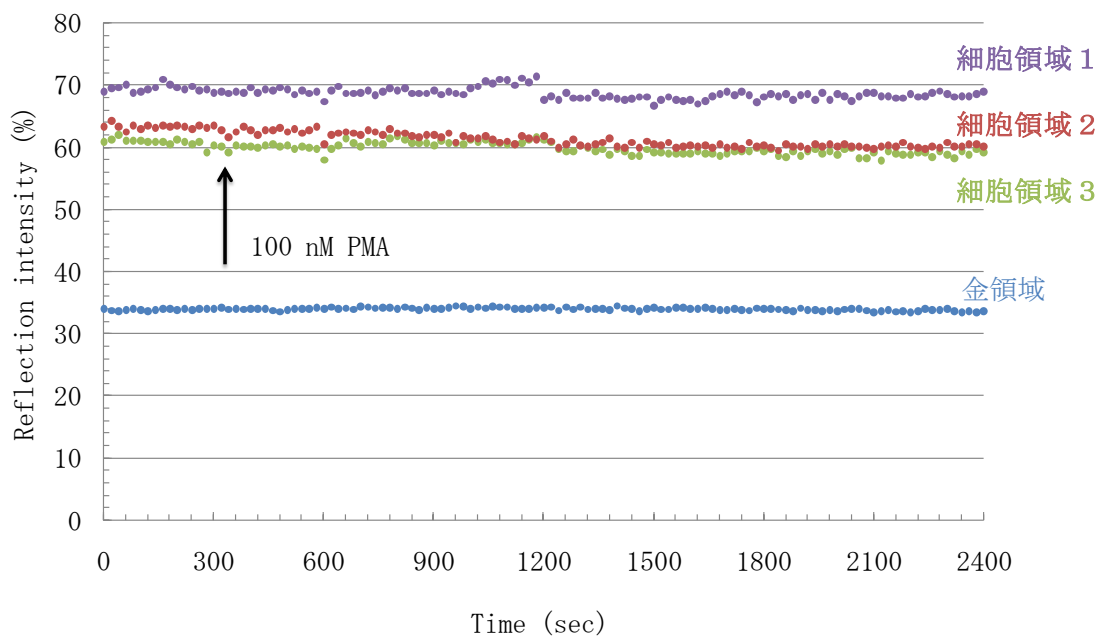


図 2-6 300 nM スタウロスポリンで前処理した場合の 100 nM PMA 刺激時の PC12 細胞領域における 2 次元 SPR 応答の経時変化

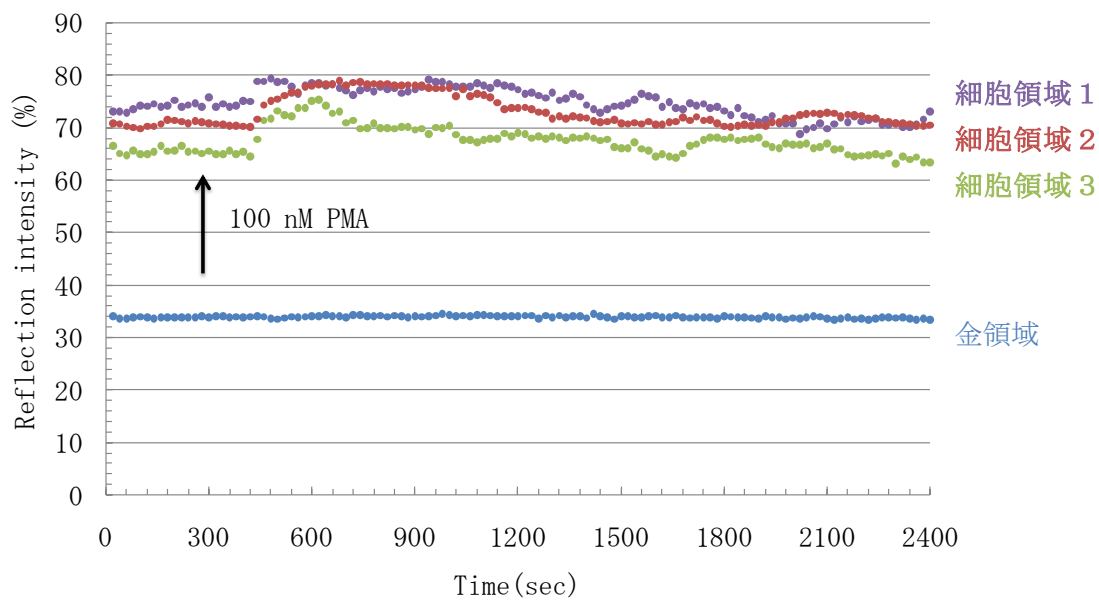


図 2-7 200 nM サイトカラシン B で前処理した場合の 100 nM PMA 刺激時の PC12 細胞領域における 2 次元 SPR 応答の経時変化

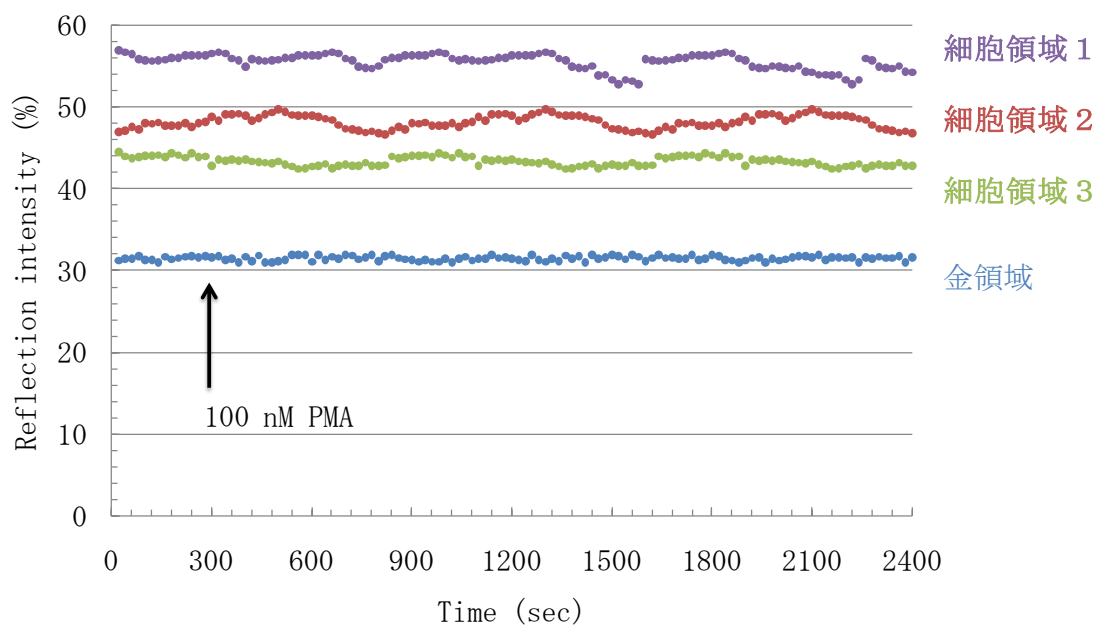


図 2-8 200 nM D-エリスロスフィンゴシンで前処理した場合の 100 nM PMA 刺激時の PC12 細胞領域における 2 次元 SPR 応答の経時変化

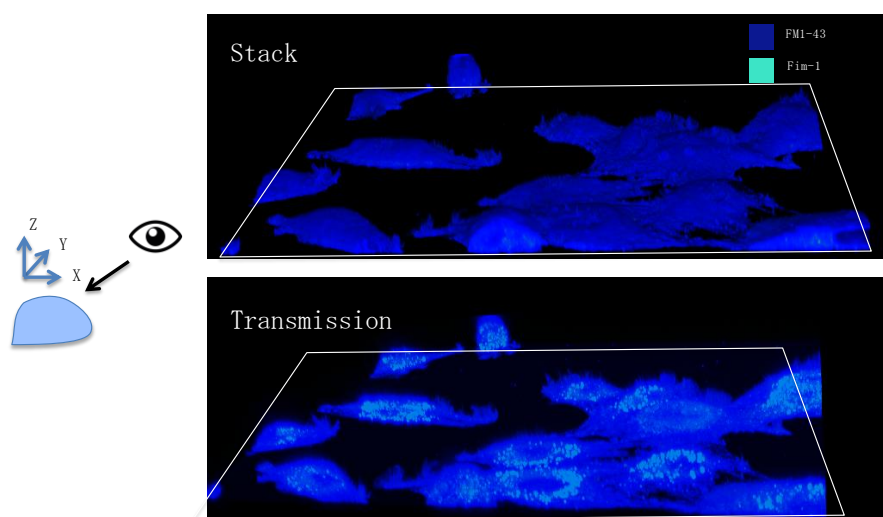


図 2-9 PMA 刺激前の Fim-1 と FM1-43 で染色した PC12 細胞の 3D 配置

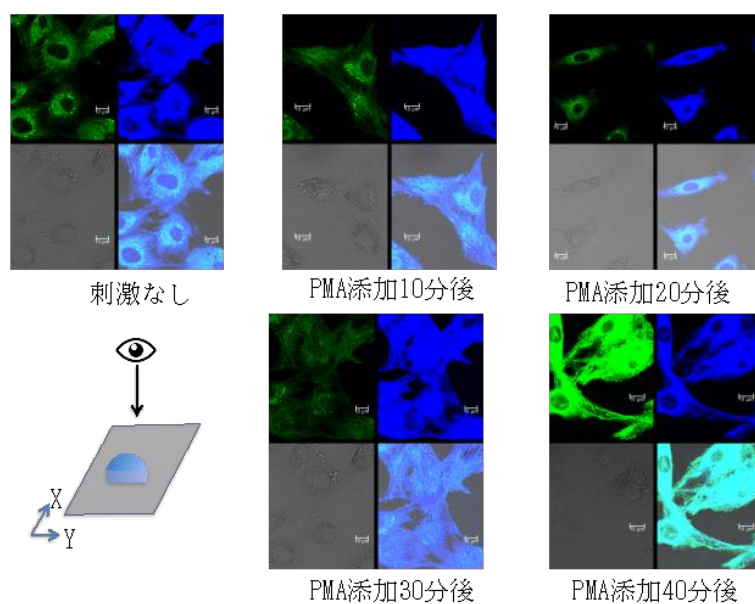


図 2-10 100 nM PMA で刺激した PC12 細胞内の PKC のトランスロケーションの共焦点蛍光顕微鏡観察

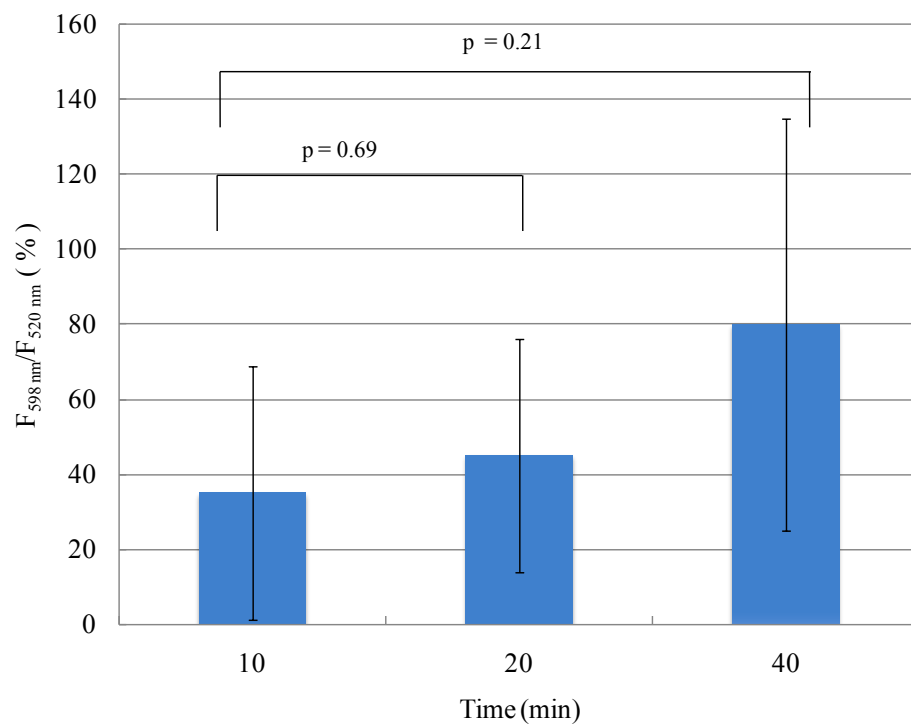


図 2-11 PMA 刺激時の FM1-43 蛍光と Fim-1 蛍光の共局在経時変化

第3章 インスリン刺激時のラット骨格筋芽細胞内反応の2次元 SPR 観察と検討

3-1

緒言

2章では2次元 SPR で観察されるシグナル上昇がどんな細胞内反応によって引き起こされるのか検討し、PKC の細胞膜内側へのトランスロケーションが2次元 SPR のシグナル上昇に影響する因子であることが確認され、さらに PKC のトランスロケーション以外の細胞内反応も観察されうることが示唆された。第3章では、PKC 以外の細胞底面近傍の屈折率上昇を引き起こす分子として Glut4 に着目し、その Glut4 トランスロケーションの過程を2次元 SPR でモニタリングすることが可能かどうかを検討することとした。Glut4 は全身で広く発現するグルコーストランスポーターファミリーの一つで、特に骨格筋、心筋、などの横紋筋と脂肪細胞で多く発現している³¹。Glut は12回膜貫通型の膜内性タンパク質ファミリーで、特にその中でも Glut4 は細胞へのインスリン刺激によって細胞質内のストレージである Glut4 貯蔵小胞(Glut4 storage vesicle)を細胞膜へとトランスロケーション(輸送、脂質膜への融合、膜表面への展開を含む)させる事が知られている³²。またインスリンをはじめとする種々の刺激に応じて Glut 分子が細胞膜へと蓄積し局在性を変化させるという報告もなされている³³。またこの Glut4 分子は第1章で述べた通り、エバネッセント領域における蛍光観察が可能な TIRF 顕微鏡によって GFP 融合 Glut4 の観察が行われ、インスリン刺激時に Glut4 が細胞膜底面に向けてトランスロケーションする様子が観察されている¹⁵。

本章ではこの Glut4 分子のトランスロケーション過程を2次元 SPR によって観察することができると考え、多くの関連する研究報告のあるラット骨格筋芽細胞 L6 を選んだ。L6 細胞はインスリン刺激に応じて Glut4 分子を細胞膜へとトランスロケーションさせることが報告されており、インスリンで刺激することによって2次元 SPR によってこのトランスロケーション過程を観察できるものと期待した。

3-2

試薬および測定装置

【培地(α MEM) Minimum Essential Medium alpha】

Minimum Essential Medium alpha 品番 12571 GIBCO

Sodium Hydrogen Carbonate(NaHCO_3) 99.5~100 % 品番 191-01305 Wako

Fetal Bovine Serum(FBS) 品番 S06931S1820 BioWest

Penicillin-Streptomycin(Antibiotics) 品番 15070-063 GIBCO

MEM Non-essential Amino Acids Solution ($\times 100$)品番 139-15651 Wako

【細胞培養】

0.05% Trypsin-EDTA 品番 25300-054 GIBCO

Phosphate Buffered Saline Powder 品番 162-19321 Wako

プラスチックピペット(5 mL) 品番 94005 BM

遠心管(15 mL) 品番 90025 BM

培養フラスコ(60 mL) 品番 90026 BM

【Hanks' Balanced Salt Solution: HBSS】

Calcium Chloride Dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 99.0~100.3% 特級 品番 031-00435 Wako

Magnesium Sulfate(MgSO_4) 98.0 +% 特級 品番 137-12335 Wako

Potassium Chloride(KCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 163-03545 Wako

Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) $\geq 99\%$ 特級 品番 169-04245 Wako

Sodium Chloride(NaCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 191-01665 Wako

Sodium Phosphate Dibasic (Na_2HPO_4) $\geq 99\%$ 特級 品番 197-02865 Wako

Sodium Hydrogen Carbonate (NaHCO_3) 99.5~100% 特級 品番 191-01305 Wako

Magnesium Chloride Hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 98.0+% 特級 品番 135-00165 Wako

【ヒトインスリン組換え体 動物由来フリー】

Insulin Human recombinant,細胞培養用 品番 11061-68-0 Nacalai tesque

【スタウロスポリン】

Staurosporine $\geq 95.0\%$ (HPLC)生化学用 品番 193-10253 Wako

【サイトカラシン B】

Cytochalasin B $\geq 98.0\%$ (HPLC)生化学用 品番 030-17551 Wako

【2次元 SPR 測定用チップ】

2次元 SPR 用金チップ 品番 012190 BAS Inc

flexiPERM 品番 90032039 greiner bio-one

【測定装置】

2次元 SPR イメージング装置(2D-SPR04B) NTT アドバンスドテクノロジー

- ・ 光源：発光ダイオード(LED)
670 nm、770 nm、870 nm の波長から選択可能、
コリメーターにより平行光とする。
- ・ 検出器：CCD カメラ 画素数 45 万画素
拡大レンズにより 1 倍、2 倍、4 倍、7 倍に拡大可能
- ・ 角度変化測定：走査角度範囲 49~57 °
ステップ角度 0.1~2.0 °
- ・ 時間変化測定：最大測定時間 60 分、
取り込みインターバル 0.5~600 秒

3-3

実験方法

3-3-1

試薬の調製および細胞培養

3-3-1-1

MEM alpha の調製

180℃耐熱用 250 mL メディウムビンに 180℃ 2 時間乾熱滅菌し、滅菌水を 220 mL と攪拌子を入れ、121℃、30 分間高圧蒸気滅菌した。

MEM alpha 2.5 g を十分に溶解させた後、NaHCO₃ 0.925 g を溶解させた。FBS 25 mL (10%-v/v)、Antibiotics 2.5 mL (1%-v/v)、100×非必須アミノ酸カクテルを 2.5 mL (1×) を加添後ボトルトップフィルターで濾過滅菌を行い、乾熱滅菌を行った 180℃耐熱用 250 mL メディウムビンに溶液を移し密栓して 5℃で保存した。

3-3-1-2

阻害剤の調製と細胞への添加

スタウロスポリンと、サイトカラシン B は溶媒が 1 % 以下になるよう HBSS で希釈し、2 次元 SPR 観察の 30 分前に細胞が接着した金チップ上に表 1-2 の濃度で添加した。

3-3-1-3

インスリン溶液の調製

ヒトインスリン溶液は 0.1 g インスリン 50 mM HCl で溶解させ、HBSS 溶液で希釈し 1 mM 溶液をストック溶液として-20℃で保存した。細胞添加時には HBSS 溶液で任意の濃度に希釈し、恒温槽で 37℃に加温してから細胞に添加した。

3-3-1-4

ラット骨格筋芽細胞 L6 の培養と継代操作

MEM alpha を用いて 25 cm²細胞培養用フラスコに L6 細胞を播種し。37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養を約 4 日間行いコンフルエントに達した。継代操作はトリプシン EDTA で処理した細胞懸濁液を 2×10⁵ cells/mL になるよう調製し、再び新しい培地へと播種した。

3-3-2

2次元 SPR イメージング装置による観察方法

3-3-2-1

2次元 SPR 観測用チップ上での細胞培養

金蒸着チップ上にフレキシパームをPDMS樹脂を用いて固定し、180℃で15分間加熱し、固定し細胞用チャンバを作成した。70% エタノール消毒処理後風乾させ、クリーンベンチの中で30分間紫外線殺菌操作し、細胞を播種した。

細胞の播種は、継代操作と同様にトリプシン EDTA 処理した L6 細胞を用いて密度 2.0×10^5 cells/mL の懸濁液を調製し、細胞培養チャンバ上に 100 μ L 添加し播種をおこなった。細胞を播種した金チップは、金チップ上へ細胞を接着させるために約24時間37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

3-3-2-2

共鳴(SPR)カーブの測定

細胞接着させた細胞培養チャンバ内の培地をマイクロピペットで取り除き、HBSS 溶液で2回リンスした。その後 HBSS 260 μ L をマイクロピペットを用いてチャンバ内に満たした。次に、観察装置上プリズムにマッチングオイルを 50 μ L 滴下し、細胞チャンバを滴下したマッチングオイル上に設置した。PMA 刺激前と刺激後40分の時点での共鳴角を下記の条件で測定した。

| | | | |
|--------|---------|----------|-------|
| 測定条件： | | | |
| 光源波長 | 770 nm | 光源電流 | 50 mA |
| 走査角度範囲 | 49～52° | 走査角度ステップ | 0.1° |
| 露光時間 | 1.0 sec | レンズ倍率 | 7 倍 |

得られた結果はそれぞれ SPR 装置備え付けのソフトウェア(SPR analyser)を用いて画像化(639×479 pixel)し、ImageJ (Ver.1.45I)を用いて刺激前の細胞領域をもとに、閾値 1:170 でマスク化し、粒子解析を用いてサイズ 40–200(Pixel²)、Circularity0.001–1.00 の範囲 (Option: Exclude on edges and Include holes)で RoI を作成した。そのバックグラウンド (金領域)と細胞領域(RoI)内の平均値を算出した。

3-3-2-3

経時変化観察

3-3-2-2 と同様に細胞接着した金チップはマッチングオイルを滴下した 2 次元 SPR 装置上のプリズムに設置した。インスリン刺激実験時は測定開始から 5 分後にコントロールとして HBSS を 20 μ L、10 分後に種々の濃度のインスリン溶液 20 μ L をマイクロピペットを用いて加えた。また、2 次元 SPR 装置の観察条件を下記にまとめた。

| | | | |
|------------|--------|----------|---------|
| 測定条件： | | | |
| 光源波長 | 770 nm | 光源電流 | 50 mA |
| 測定角度 | 50.2° | 露光時間 | 1.0 sec |
| レンズ倍率 | 7 倍 | | |
| 取り込みインターバル | | 10.0 sec | |
| 取り込み時間 | | 3600 sec | |

得られた SPR データは SPR カーブと同様に ImageJ を用いて解析した。それぞれのデータは独立した 3 回の実験の平均値を求め統計分析に供した。細胞領域はランダムに 100 箇所
のデータを抽出し、分析に供した。

3-4

結果及び考察

3-4-1

2次元 SPR 観察におけるインスリン刺激時の L6 細胞の応答

3-4-1-1

インスリン刺激に対する L6 細胞領域の共鳴角変化

図 3-1 に 100 μM インスリン刺激前後の SPR 共鳴カーブ変化を示す。インスリン添加前の細胞領域では共鳴角は PC12 細胞と同様に 50.4° インスリン刺激後 50 分の時点では 50.7° であり、 0.2° ポジティブにシフトすることが観察された。インスリンによって L6 細胞内の情報伝達経路上最初のトランスデューサーであるインスリン受容体(Insulin Receptor :IR)とその下流のインスリンレセプターサブストレート(Insulin Receptor Substrate :IRS)及びそのシグナル伝達の過程に位置する PI3K、AKT などのキナーゼ集合³⁴⁻³⁶や、さらに下流にある Glut4 小胞の細胞膜近傍へのトランスロケーション^{16,32}によって細胞底面の細胞膜近傍の屈折率を変化させ、2次元 SPR シグナルを上昇させたものと考えた。また、この SPR カーブにおいて全体の 94%の細胞が同様のほぼ同様の共鳴角を示したため、経時変化観察では、 50.2° における経時変化を観察する事で、刺激前後の差を最大化できると考え、今後の経時変化は 50.2° で観察を行った。

次に、L6 細胞を 100 μM のインスリンで刺激した場合の 2次元 SPR シグナルの経時変化を観察した。図 3-2 に 100 μM インスリンで刺激した場合の L6 細胞領域及び金領域の SPR シグナル経時変化を示す。この観察において特徴的な二相性の反射光強度変化が確認された。インスリン添加直後から 10 分程度までに約 4%程度の早い反射光強度の上昇が観察された。またインスリン添加から 10 分後に緩やかな、しかし大きな反射光強度上昇が観察された。このシグナル上昇は細胞によって違いはあるが平均で観察開始時より約 20%程度反射光強度を上昇させる。このシグナル上昇はインスリン注入から 50 分経過後も平衡に達しなかった。このことにより L6 細胞がインスリン刺激に応じてその細胞領域で屈折率を変化させることが確認された。

3-4-1-2

L6 細胞の SPR 応答のインスリン濃度依存性

3-4-1-1 において L6 細胞がインスリン刺激に応答し、細胞底面の屈折率を変化させることから、次に様々な濃度のインスリンで L6 細胞を刺激した際の SPR 応答を検討した。

図 3-3 に 5-100 μM のインスリンで刺激した際の SPR 応答を示す。全ての濃度で 100 μM 刺激時と同様に二相性のシグナル上昇が観察された。また、インスリン添加から 50 分後の反射光強度を濃度別にプロットしたものを図 3-4 に示す。このプロットにおいて L6 細胞はインスリン濃度上昇に応じて飽和様カーブで反射光強度を増加させることが示された。

3-4-2

阻害剤処理後のインスリン刺激に対する L6 細胞の SPR 応答観察

3-4-2-1

スタウロスポリンで前処理した L6 細胞のインスリン刺激時の SPR 応答

3-4-1においてL6細胞におけるインスリン刺激時のSPR応答が濃度依存的であることが示された。このシグナル上昇の要因を調べるため、L6細胞でもPC12細胞と同様に非特異的キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンで前処理を行った際のインスリン刺激応答を2次元SPRで観察した。図3-5に300 nMのスタウロスポリンで前処理したL6細胞に対して100 μ Mインスリンで刺激した場合の反射光強度の経時変化をスタウロスポリン非存在下の場合と共にプロットした。スタウロスポリンで前処理した場合はPC12細胞と同様にその大部分が抑制され、シグナル上昇の約70%(\pm 4%)が抑制された。これはインスリンによる刺激が細胞表面に存在するIRと結合することによるIRの自己リン酸化反応や、その下流におけるIRSのリン酸化反応をスタウロスポリンにより阻害された結果であると考えた。

3-4-2-2

サイトカラシン B で前処理した L6 細胞のインスリン刺激時の SPR 応答

次に、アクチンフィラメント重合阻害剤であるサイトカラシン B で前処理した L6 細胞に対して100 μ Mインスリンで刺激した場合の2次元SPR応答を図3-6に示す。200 nM サイトカラシン B で前処理した場合の2次元SPR応答はインスリン添加直後の小さなピークは観察されたものの、約10分後から観察されていた緩やかで大きな反射光強度の変化が観察されなくなった。Glut4を埋め込んだ小胞の輸送にアクチンフィラメントが関与することから、アクチン重合阻害によってGlut4小胞の輸送が結果的に阻害され、細胞膜近傍のGlut4の密度増加が抑制されたことに由来すると推察した。

3-4-3

予想される細胞内情報伝達経路と SPR 観察される細胞内反応の阻害剤による検討

本実験ではインスリン刺激時のSPR応答として、2段階のシグナル上昇が観察された。1段階目の上昇は非特異的キナーゼ阻害剤の添加によって減少することから、インスリンレセプターの自己リン酸化と下流に位置するIRSなどの一連のリン酸化反応に関わるキナーゼ類の会合が関与していることが示唆された。また、2段階目のゆっくりとした、かつ長いSPRシグナルの上昇は、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B を添加すると抑制されることから、Glut4を含む小胞のトランスロケーション過程が屈折率変化として観測されたものと考えた。本実験から予想される細胞内情報伝達経路の模式図を図3-7に示す。

3-5 まとめ

本章ではラット骨格筋芽細胞である L6 細胞に対してインスリン刺激を行った際に細胞底部で生じる細胞内反応を 2 次元 SPR によって観察した。インスリン刺激により L6 筋芽細胞の細胞底部の屈折率はインスリン濃度依存的に変化することから、インスリンセンシングに応用が可能であることが示された。また SPR 応答は経時的に 2 段階のステップが観測された。阻害剤で前処理した場合の SPR 応答からインスリン刺激時の細胞内情報伝達反応としてまずインスリン受容体のリン酸化に始まる細胞膜内側でのキナーゼ集合とその下流で引き起こされる Glut4 分子のトランスロケーション過程をモニタリングできたものと考えた。

図表

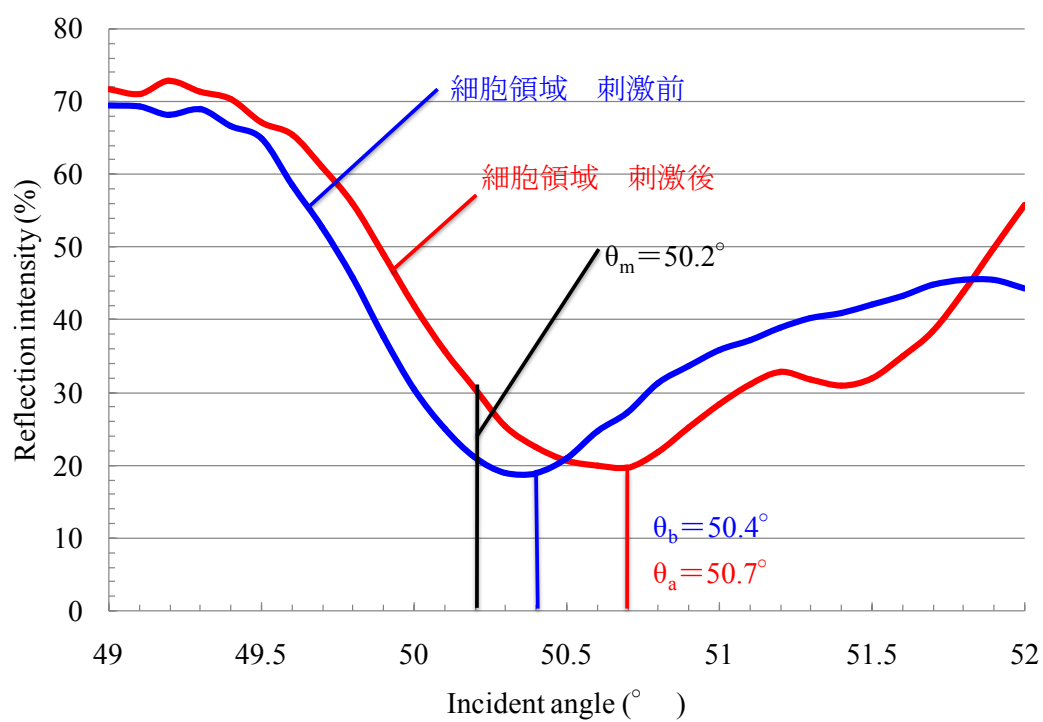


図 3-1 インスリン刺激前後の細胞領域の SPR カーブ

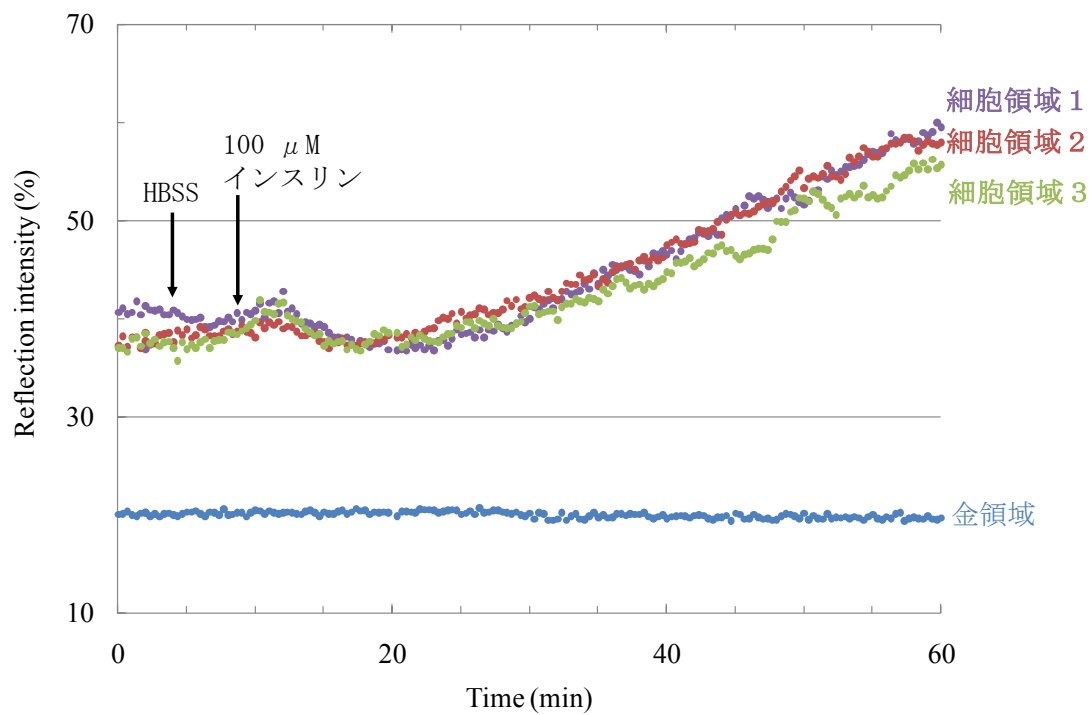


図 3-2 100 μ M インスリン刺激時の L6 細胞領域における 2 次元 SPR 応答の経時変化

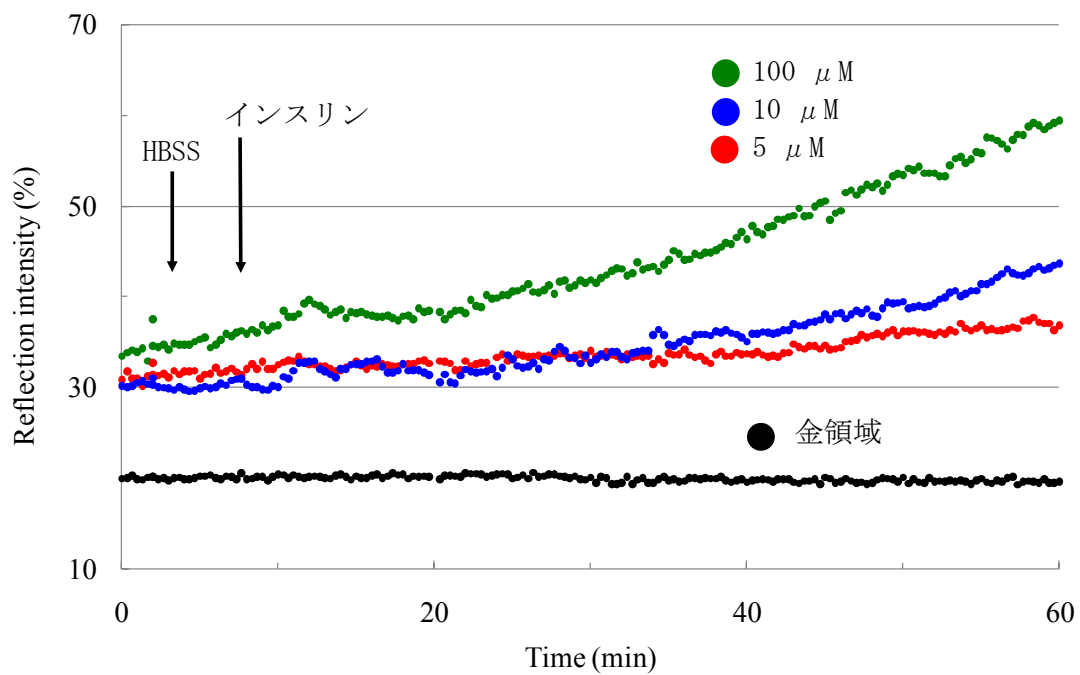


図 3-3 L6 細胞領域における反射光強度変化のインスリン濃度依存性

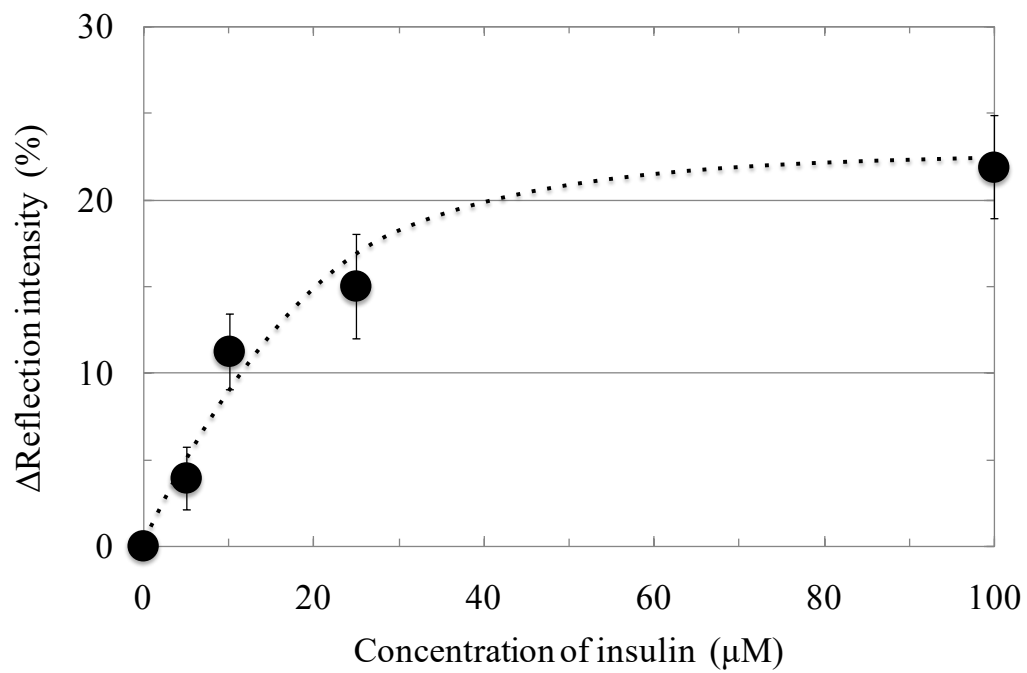


図 3-4 L6 細胞領域におけるインスリン刺激時の
反射光強度変化量のインスリン濃度依存性

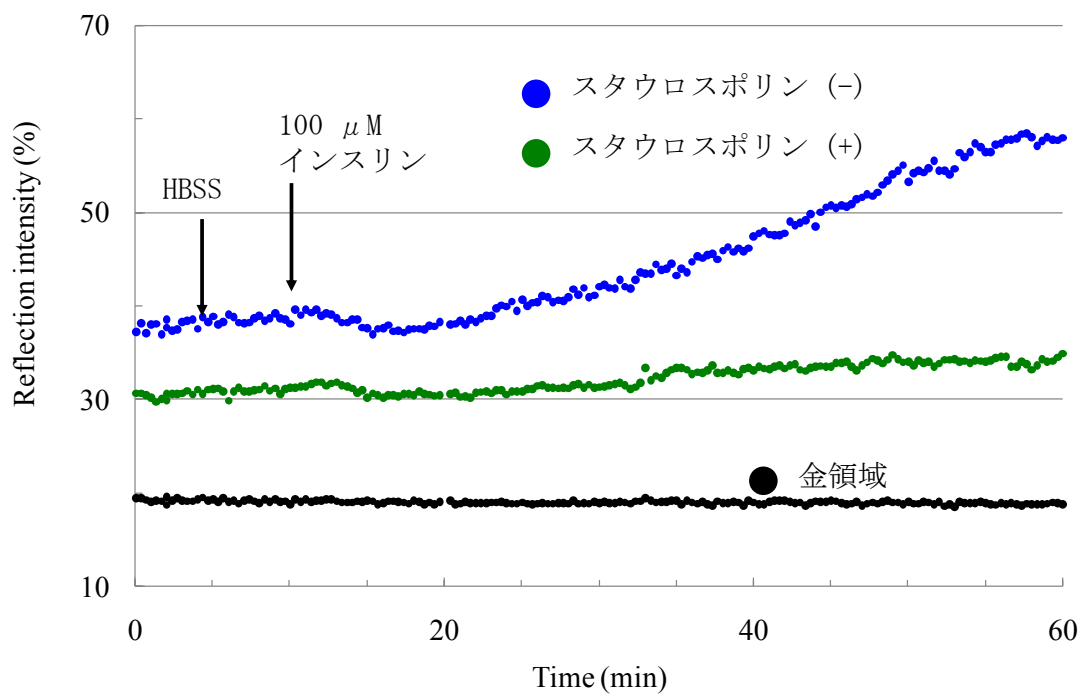


図 3-5 300 nM スタウロスポリンで前処理した L6 細胞における
100 μM インスリン刺激に対する SPR 応答

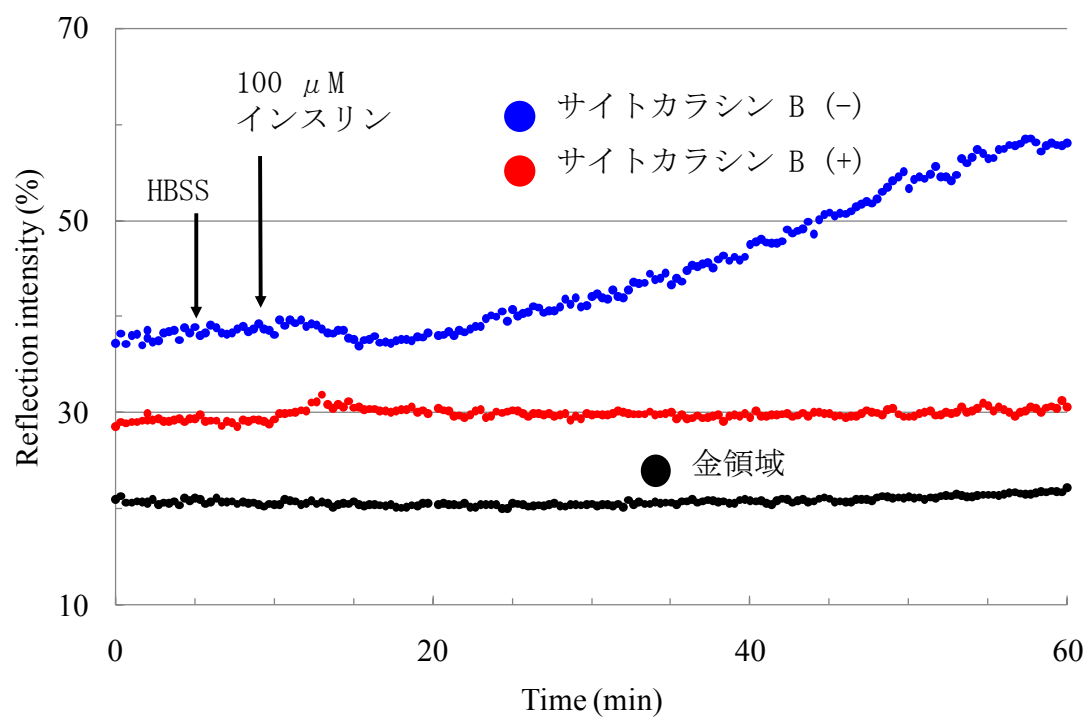


図 3-6 200 nM サイトカラシン B で前処理した L6 細胞における
100 μM インスリン刺激に対する SPR 応答

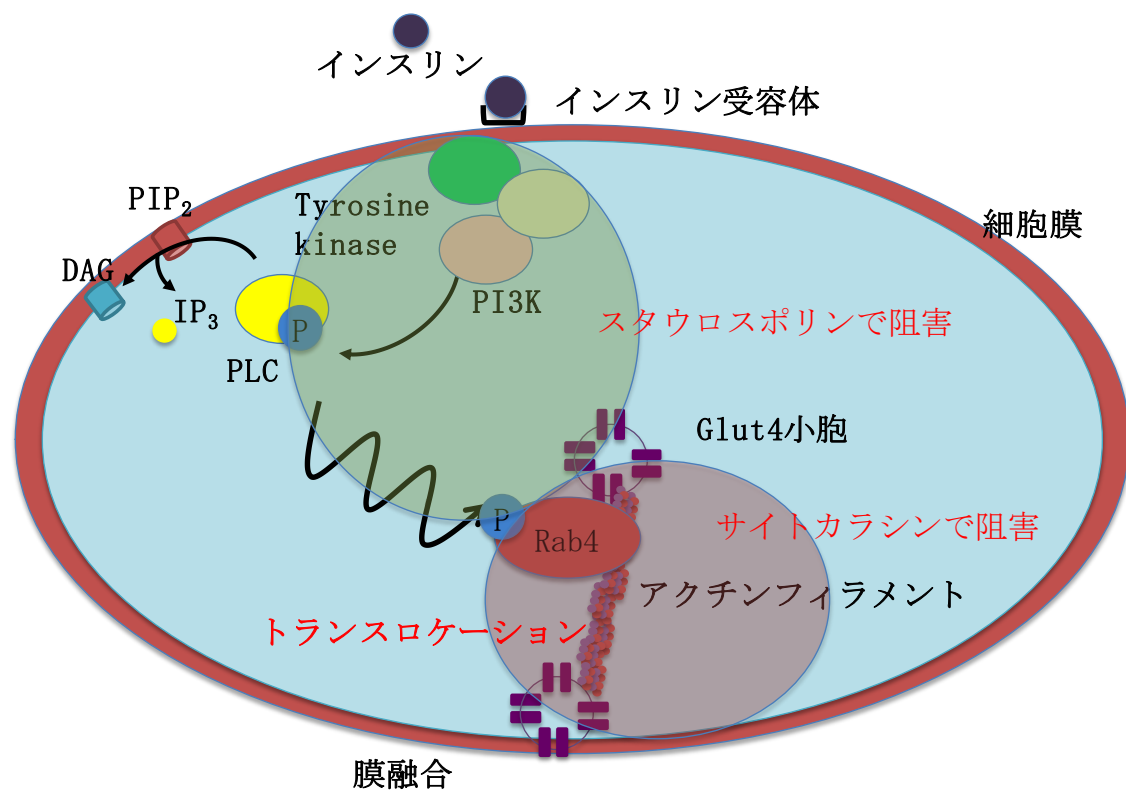


図 3-7 インスリン刺激で引き起こされる L6 細胞内の情報伝達反応の模式図

第4章 インスリン及びブラジキニン刺激に対するラット 筋管細胞内反応の2次元 SPR 観察と考察

4-1

緒言

第3章では、ラット骨格筋芽細胞 L6 に対してインスリンで刺激した場合の応答を 2 次元 SPR によって観察した。本章では、L6 細胞から分化誘導して得られる筋管細胞においてインスリン情報伝達経路上の種々のタンパク質発現量が増加することから、インスリン刺激時の SPR 応答シグナルが増加するのではないかと予測し観察を行うこととした³⁶⁻³⁸。

筋芽細胞から筋管細胞への分化に伴うタンパク質発現量のプロテオミクス解析はマウスを中心に行われ、インスリン情報伝達経路上のタンパク質発現量は概ね 5-10 倍程度に増加することが報告されている。その中でも Glut4 は、分化後は約 20 倍、Glut4 小胞輸送時にアクチン-ミオシン複合体形成に関与する Rab5C の発現も 200 倍に増加するという報告がなされている。一方で、逆にインスリン誘導性グルコース取り込みを負に制御する PKCθ の発現も 25 倍程度に上昇することが報告されている³⁹⁻⁴¹。

また、成熟した筋管細胞ではブラジキニン B2 レセプターを発現し、生体中において有酸素運動にともなって血漿中のキニンノーゲンの前駆体としてプロテアーゼであるカリクレインやトリプシン修飾によって血中に遊離するブラジキニンに応答しインスリン非依存的経路を活性化させ、直接 Glut4 小胞を細胞膜へとトランスロケーションさせることが報告されている^{42,43}。さらに、ヒトブラジキニン B2 レセプターを発現させた CHO 細胞においてブラジキニン刺激が PKC を活性化させることも報告されている^{44,45}。これらのことからラット筋管細胞へのブラジキニン刺激応答を SPR イメージャーによって観察することも試みた。

4-2

試薬および測定装置

【培地(αMEM)Minimum Essential Medium alpha】

Minimum Essential Medium alpha 品番 12571 GIBCO

Sodium Hydrogen Carbonate(NaHCO₃) 99.5~100.3 % 品番 191-01305 Wako

Fetal Bovine Serum (FBS) 品番 S06931S1820 BioWest

Penicillin-Streptomycin (Antibiotics) 品番 15070-063 GIBCO

MEM Non-essential Amino Acids Solution (×100) 品番 139-15651 Wako

【細胞培養】

0.05% Trypsin-EDTA 品番 25300-054 GIBCO

Phosphate Buffered Saline Powder 品番 162-19321 Wako

プラスチックピペット(5 mL) 品番 94005 BM

遠心管(15 mL) 品番 90025 BM

培養フラスコ(60 mL) 品番 90026 BM

【Hanks' Balanced Salt Solution: HBSS】

Calcium Chloride Dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 99.0~100.3% 特級 品番 031-00435 Wako

Magnesium Sulfate(MgSO_4) 98.0 +% 特級 品番 137-12335 Wako

Potassium Chloride(KCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 163-03545 Wako

Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) $\geq 99\%$ 特級 品番 169-04245 Wako

Sodium Chloride(NaCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 191-01665 Wako

Sodium Phosphate Dibasic(Na_2HPO_4) $\geq 99\%$ 特級 品番 197-02865 Wako

Sodium Hydrogen Carbonate(NaHCO_3) 99.5~100.3% 特級 品番 191-01305 Wako

Magnesium Chloride Hexahydrate($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 98.0+%特級 品番 135-00165 Wako

【ヒトインスリン組換え体動物由来フリー】

Insulin Human recombinant 細胞培養用 品番 11061-68-0 Nacalai tesque

【ブラジキニン】

Bradykinin 98.0+% (HPLC)生化学用 品番 020-07361 Wako

【2次元 SPR 測定用チップ】

2次元 SPR 用金チップ 品番 012190 BAS Inc

flexiPERM 品番 90032039 greiner bio-one

【測定装置】

2次元 SPR イメージング装置(2D-SPR04B) NTT アドバンスドテクノロジー

・光源：発光ダイオード(LED)

670 nm、770 nm、870 nm の波長から選択可能、
コリメーターにより平行光とする。

・検出器：CCD カメラ、

画素数 45 万画素、

拡大レンズにより 1 倍、2 倍、4 倍、7 倍に拡大可能

・角度変化測定：走査角度範囲 49~57°

ステップ角度 0.1~2.0°

・時間変化測定：最大測定時間 60 分

取り込みインターバル 0.5~600 秒

4-3

実験方法

4-3-1

試薬の調製および細胞培養

4-3-1-1

MEM alpha の調製

180℃ 耐熱用 250 mL メディウムビンに 180℃ 2 時間乾熱滅菌し、滅菌水を 220 mL と攪拌子を入れ、121℃、30 分間高圧蒸気滅菌した。

MEM alpha 2.5 g を十分に溶解させた後、 NaHCO_3 0.925 g を溶解させた。FBS 25 mL (10%-v/v)、Antibiotics 2.5 mL (1%-v/v)、100×非必須アミノ酸カクテルを 2.5 mL(1×)を添加後ボトルトップフィルターで濾過滅菌を行い、乾熱滅菌を行った。180℃ 耐熱用 250 mL メディウムビンに溶液を移し密栓して 5℃ で保存した。また分化誘導培地として、低血清含有 MEM alpha (2% FBS)も同様に調製した。

4-3-1-2

インスリン溶液の調製

ヒトインスリン溶液はインスリンを 50 mM HCl で溶解させ、HBSS 溶液で希釈し 1 mM 溶液をストック溶液として-20℃で保存した。細胞添加時には HBSS 溶液で任意の濃度に希釈し、恒温槽で 37℃に加温してから細胞に添加した。

4-3-1-3

ブラジキニン溶液の調製

ブラジキニン溶液は 1 mM 溶液を滅菌水で調製しストック溶液とし 5℃で保存した。細胞添加時は HBSS で任意の濃度に調製し、恒温槽で 37℃に加温し細胞に添加した。

4-3-1-4

ラット骨格筋芽細胞 L6 の培養と継代操作

MEM alpha を用いて 25 cm²細胞培養用フラスコに L6 細胞を播種した。37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養を行い、約 4 日間でコンフルエントに達した。継代操作はトリプシン EDTA で処理した細胞懸濁液を 2×10^5 cells/mL になるよう調製し、1 mL を再び新しい培地へと播種した。

4-3-1-5

L6 細胞の筋管細胞への分化誘導

筋管細胞への分化誘導は 25 cm² 細胞培養用フラスコ上でコンフルエントに達した L6 細胞に対して、2% FBS 含有の MEM α に交換し 5 日間 37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養を行い分化させた。その時の誘導処理スケジュールと位相差顕微鏡像を図 4-1 に示す。

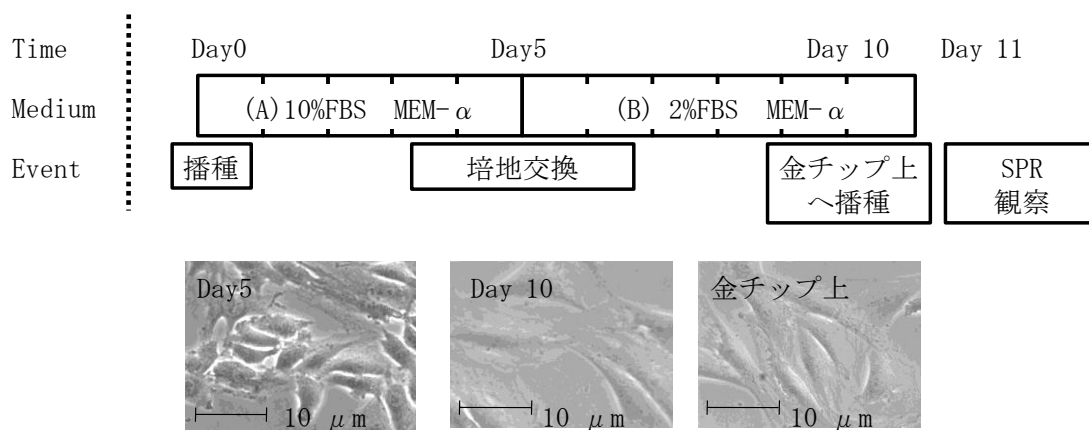


図 4-1 L6 細胞から筋管細胞への分化誘導スケジュールとその位相差顕微鏡観察

4-3-2

2 次元 SPR イメージング装置による観察方法

4-3-2-1

2 次元 SPR 観測用チップ上での細胞培養

金蒸着チップ上にフレキシパームを PDMS 樹脂を用いて固定し、180°C で 15 分間加熱し、固定し細胞用チャンバを作成した。70%エタノール消毒処理後風乾させ、クリーンベンチの中で 30 分間紫外線殺菌操作し、細胞を播種した。

細胞の播種は、継代操作と同様にトリプシン EDTA 処理した筋管細胞を用いて密度 2.0 $\times 10^5$ cells/mL の懸濁液を調製し、細胞培養チャンバ上に 100 μ L 添加し播種を行った。細胞を播種した金チップは、細胞を接着させるために約 24 時間 37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

4-3-2-2

経時変化観察

細胞接着した金チップはマッチングオイルを滴下した 2 次元 SPR 装置上のプリズムに設置した。インスリン刺激実験時は測定開始から 5 分後にコントロールとして HBSS を 20 μL 、10 分後に種々の濃度のインスリン溶液 20 μL をマイクロピペットを用いて加えた。また、2 次元 SPR 装置の観察条件を下記にまとめた。

| | | | |
|------------|--------|----------|---------|
| 測定条件： | | | |
| 光源波長 | 770 nm | 光源電流 | 50 mA |
| 測定角度 | 50.2° | 露光時間 | 1.0 sec |
| レンズ倍率 | 7 倍 | | |
| 取り込みインターバル | | 3.0 sec | |
| 取り込み時間 | | 1200 sec | |

得られた SPR データは ImageJ を用いて解析した。それぞれのデータは独立した 3 回の実験の平均値を求め統計分析に供した。細胞領域はランダムに 100 箇所のデータを抽出し、統計処理に供した。

4-4 結果及び考察

4-4-1 インスリン刺激時の筋管細胞の 2 次元 SPR 応答

筋管分化誘導を行った L6 細胞に対して 0.1–1.0 μM のインスリン刺激を行った場合の 2 次元 SPR 応答の経時変化を図 4-2 に示す。0.5 μM 以上の濃度でインスリン刺激した場合は反射光強度の変化率がほぼ同様であった。また同様に 0.5 μM のインスリン刺激をした際のシグナル上昇パターンは分化誘導する前の筋芽細胞の 100 μM インスリン刺激時の応答と酷似しており、添加後 50 分の時点で平均 34%程度の二相性の反射光強度の上昇が確認された。図 4-3 には未分化 L6 細胞に 1 μM インスリンで刺激した場合の SPR 応答経時変化を示す。未分化の L6 細胞領域においては 1 μM のインスリンに対しては平均で 5%程度のシグナル上昇が確認された。このことから分化誘導を行った L6 細胞では細胞底部の屈折率を指標とした場合著しい感度上昇が示された。

4-4-2 筋管細胞領域における SPR 応答のインスリン濃度依存性

4-4-1 で示した通り、L6 細胞を分化誘導して得られる筋管細胞は 2 次元 SPR 観察においてインスリン刺激に対して感度が上昇することが示された。

図 4-3 それぞれ 100 個の筋管細胞領域における反射光強度変化量の平均値をインスリン濃度に対してプロットした検量線である。データは独立した 3 回の実験の平均値から算出した($n=3 \times 100$ 細胞領域)。筋管細胞領域では検量線の直線的な初期傾きから 4.0%/0.1 μM でシグナル上昇させた。一方、図 3-4 で示した筋芽細胞のでは 0.06%/0.1 μM でシグナル上昇させ、筋管細胞のインスリン刺激応答感度は約 70 倍に上昇することが示された。この 2 種類の細胞間での SPR 応答の違いは分化誘導に伴う様々なタンパク質の発現量の変化に起因すると予想した。実際にインスリンシグナル伝達経路上のタンパク質発現量は分化前後で劇的に増加することが報告されている^{35-37,46,47}。しかし 4-1 の緒言で述べたとおり、インスリン応答性のグルコース取り込みを負に制御する PKC θ が IRS のセリン¹¹⁰¹ をリン酸化することによって、IRS の自己リン酸化反応を阻害することでシグナル伝達を阻害することも報告されている⁴⁸。分化に伴いこの PKC θ 発現量も約 25 倍程度に増加するため 2 次元 SPR で観察されたインスリン応答性も約 70 倍程度の感度上昇にとどまったものと考えた。これにより筋管細胞のインスリンセンサ応用性の可能性が示された。

4-4-3 ブラジキニン刺激時の筋管細胞の 2 次元 SPR 応答

図 4-4 は筋管細胞に対して 100 nM ブラジキニンで刺激を行った場合の 2 次元 SPR 応答を示す。ブラジキニンで刺激した場合の反射光強度増加の割合は平均で約 2.7% でインスリン刺激と比べると約 1/10 程度のシグナル上昇に止まった。またシグナル上昇のパターンも一貫せず、添加から 50 分かけて緩やかに上昇することが示された。ブラジキニン刺激が直接 Glut4 小胞のトランスロケーションを誘導するという報告があるが、SPR 観察においては、画一的なシグナル上昇の法則を見いだすことが出来なかった。インスリン刺激時及び、ブラジキニン刺激時の SPR 応答パターンの違いは細胞内でのシグナル伝達経路の違いを表しているものと考えた⁴⁵。また、PKC が関与していることも考えられるため、今後の課題の一つである。

4-5 まとめ

本章ではラット骨格筋芽細胞から低血清培地(2% FBS)によって分化誘導した筋管細胞に対してインスリンまたはブラジキニンで刺激を行った場合の2次元 SPR 応答について考察を行った。まず、筋管細胞に分化誘導した場合には細胞底部の屈折率を指標とした場合、インスリンに対する感度が L6 筋芽細胞の約 70 倍に上昇することが示された。これはインスリンとインスリン受容体との親和性自体が変化しないことを考えるとインスリン情報伝達経路上のカスケードにおいて情報伝達タンパク質の発現量の増加に由来するものと考察した。またこのような応答性の違いを利用することによって、2次元 SPR 観察によって特定のタンパク質の発現量の変化や、細胞の分化状態の評価に応用が可能であると期待された。

さらに有酸素運動に伴って血中に放出されるホルモンであるブラジキニンによって筋管細胞を刺激した場合では、インスリンと違ったシグナル上昇パターンが観察され、2次元 SPR によってモニタリングができることが示唆された。

図表

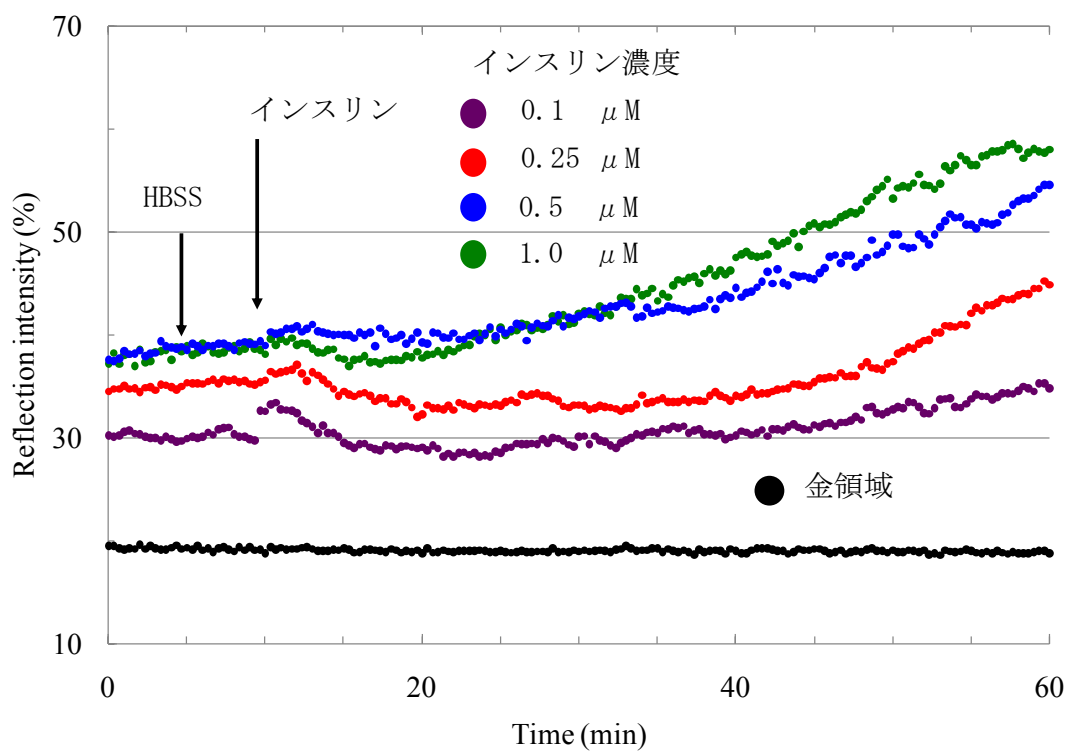


図 4-2 筋管細胞領域における反射光強度のインスリン濃度依存性

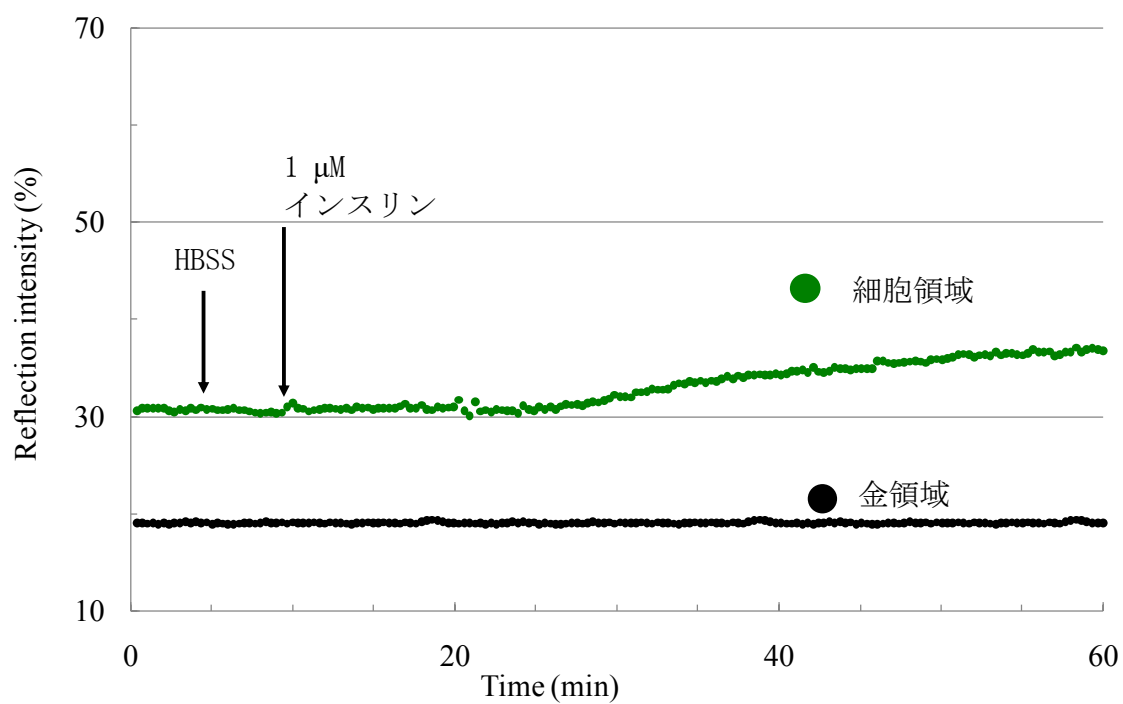


図 4-3 L6 筋芽細胞の 1 μM インスリン刺激時の SPR 応答

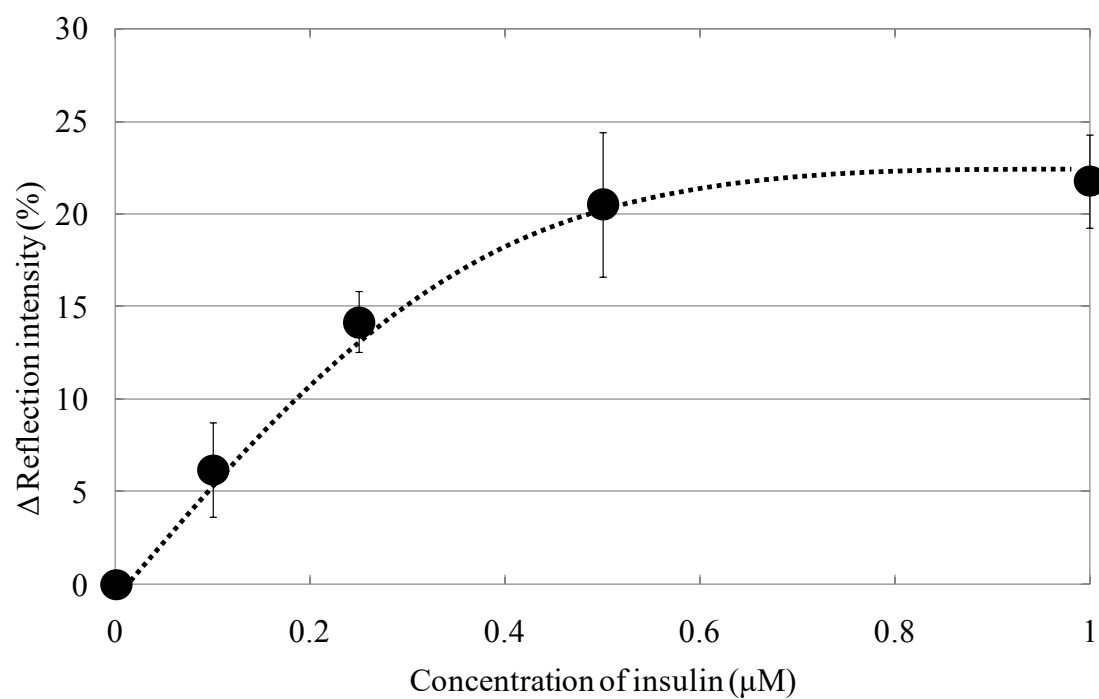


図 4-4 筋管細胞領域におけるインスリン刺激時の
反射光強度変化量のインスリン濃度依存性

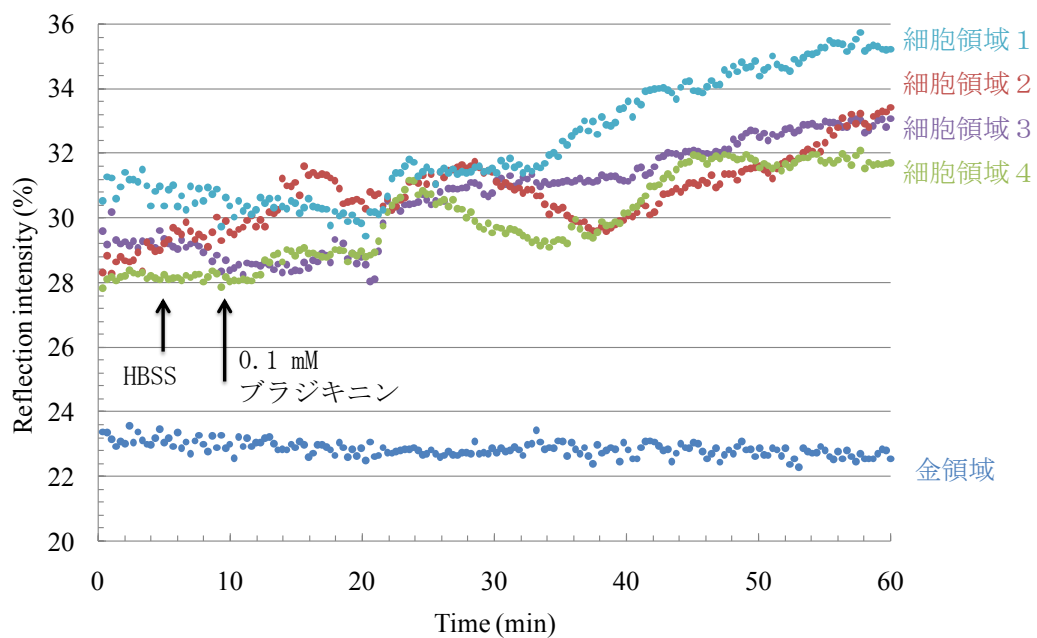


図 4-5 ブラジキニン刺激時の筋管細胞領域における SPR 応答の経時変化

第5章 インスリンアナログの刺激に対するラット

筋管細胞内反応の2次元 SPR 観察と考察

5-1

緒言

第3章及び4章ではL6筋芽細胞及び筋管細胞の2次元SPR観察によるインスリンセンシングとSPR観察でモニタリングされる細胞内反応の検討を行ってきた。本章では筋管細胞をインスリンアナログ製剤である3つの超速効型インスリンアナログで刺激した際の2次元SPR観察をおこなった。通常、ワイルドタイプのインスリンは溶液中ではホモダイマー、さらにダイマーの3集合体であるホモヘキサマーを形成しているが、超速効型インスリンアナログではダイマー形成能を抑制しているため、注入後の血中移行がワイルドタイプより早いと言われている⁴⁹。通常インスリンの定量評価は特異的抗体を用いる方法、あるいは細胞に添加しIR及びIRSのリン酸化度合いをウェスタンブロットで検出する方法が一般的である。一方、2次元SPR観察ではリアルタイムに、さらに細胞応答性のインスリン検出を行える長所があるので、これらのインスリンアナログで刺激した筋管細胞のSPR応答観察を試みることにした。インスリンの力価は通常IRIとして示されるが、インスリン注入療法を受ける2型糖尿病患者においては血中のインスリン濃度を正確に知ることはインスリン抵抗性発達の指標となる大変重要なパラメーターの一つである。しかしながら免疫学的な血中インスリン検出は自己インスリン抗体の影響を受けることから、サンプルの事前処理やインスリン前駆体の代謝産物であるc-ペプチドを指標とする計測方法が一般的である⁵⁰⁻⁵²。一方インスリンアナログはそのアミノ酸配列に遺伝的に変位がくわえられていることから、ワイルドタイプインスリンに比べてレセプターとの相互作用に差異がある。そこで、第3章から4章にかけて2次元SPRを用いた細胞観察が細胞活性なインスリンを検出できることから、これらアナログに対してそれぞれを識別可能であるか検討した。

本実験に用いたインスリンアナログ3種類の変異部位とワイルドタイプインスリンとの相対インスリン活性を表5-1にまとめた⁵³。

表 5-1 インスリンアナログとその変位部位及びワイルドタイプとの相対インスリン活性

| 商品名 | 一般名 | 変異部位 | 相対インスリン活性(WT Insulin) |
|-----------|----------------|--------------|-----------------------|
| ノボラピッド® | Aspart | B鎖 P28D | 0.92 ± 6 |
| ヒューマログ® | Lispro | B鎖 P28E、E29P | 0.84 ± 6 |
| アピドラ® | Glulisine | B鎖 N3K、K29E | 0.86 ± 3 |
| W.T.インスリン | Insulin(human) | - | 1.00 |

5-2

試薬および測定装置

【培地(α MEM)Minimum Essential Medium alpha】

Minimum Essential Medium alpha 品番 12571 GIBCO

Sodium Hydrogen Carbonate(NaHCO_3) 99.5~100.3 % 品番 191-01305 Wako

Fetal Bovine Serum(FBS) 品番 S06931S1820 BioWest

Penicillin-Streptomycin (Antibiotics) 品番 15070-063 GIBCO

MEM Non-essential Amino Acids Solution ($\times 100$)品番 139-15651 Wako

【細胞培養】

0.05% Trypsin-EDTA 品番 25300-054 GIBCO

Phosphate Buffered Saline Powder 品番 162-19321 Wako

プラスチックピペット(5 mL) 品番 94005 BM

遠心管(15 mL) 品番 90025 BM

培養フラスコ(60 mL) 品番 90026 BM

【Hanks' balanced salt solution: HBSS】

Calcium Chloride Dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 99.0~100.3% 特級品番 031-00435 Wako

Magnesium Sulfate(MgSO_4) 98.0 +% 特級 品番 137-12335 Wako

Potassium Chloride(KCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 163-03545 Wako

Potassium Dihydrogenphosphate(KH_2PO_4) $\geq 99\%$ 特級 品番 169-04245 Wako

Sodium Chloride(NaCl) $\geq 99.5\%$ 特級 品番 191-01665 Wako

Sodium Phosphate Dibasic(Na_2HPO_4) $\geq 99\%$ 特級 品番 197-02865 Wako

Sodium Hydrogen Carbonate(NaHCO_3) 99.5~100.3% 特級 品番 191-01305 Wako

Magnesium Chloride Hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 98.0 +%特級 品番 135-00165 Wako

【ヒトインスリン組換え体 動物由来フリー】

Insulin Human recombinant 細胞培養用 品番 11061-68-0 Nacalai tesque

インスリンアナログは富山大院生命融合科学教育部 磯部・黒澤研究室より寄贈された

【インスリンアスパルト/ノボラピット 注 100 単位/mL】

Insulin Aspart 処方医薬品

日本標準商品分類番号 22000AMX02125000 Novo nordisk

【インスリンリスプロ/ヒューマログ注 100 単位/mL】

Insulin Lispro 処方医薬品

日本標準商品分類番号 22000AMX02118 Eli Lilly

【インスリングルリジン/アピドラ 注 100 単位/mL】

Insulin Glulisine 処方医薬品

日本標準商品分類番号 22100AMX00659 Sanofi

【2次元 SPR 測定用チップ】

2次元 SPR 用金チップ 品番 012190 BAS Inc
flexiPERM 品番 90032039 greiner bio-one

【測定装置】

2次元 SPR イメージング装置(2D-SPR04B) NTT アドバンスドテクノロジー

- ・光源：発光ダイオード(LED)
670 nm、770 nm、870 nm の波長から選択可能、
コリメーターにより平行光とする。
- ・検出器：CCD カメラ、
画素数 45 万画素、
拡大レンズにより 1 倍、2 倍、4 倍、7 倍に拡大可能
- ・角度変化測定：走査角度範囲 49~57 °
ステップ角度 0.1~2.0 °
- ・時間変化測定：最大測定時間 60 分、
取り込みインターバル 0.5~600 秒

5-3

実験方法

5-3-1

試薬の調製および細胞培養

5-3-1-1

MEM alpha の調製

180℃耐熱用 250 mL メディウムビンに 180℃ 2 時間乾熱滅菌し、滅菌水を 220 mL と攪拌子を入れ、121℃、30 分間高圧蒸気滅菌した。

MEM alpha 2.5 g を十分に溶解させた後、NaHCO₃ 0.925 g を溶解させた。FBS 25 mL (10%-v/v)、Antibiotics 2.5 mL (1%-v/v)、100×非必須アミノ酸カクテルを 2.5 mL(1×)を添加後ボトルトップフィルターで濾過滅菌を行い、乾熱滅菌を行った 180℃耐熱用 250 mL メディウムビンに溶液を移し密栓して 5℃で保存した。また分化誘導培地として、低血清含有 MEM alpha (2% FBS)も同様に調製した。

5-3-1-2

インスリン溶液の調製

ヒトインスリン溶液はインスリンを 50 mM HCl で溶解させ、HBSS 溶液で希釈し 1 mM 溶液をストック溶液として-20℃で保存した。細胞添加時には HBSS 溶液で任意の濃度に希釈し、恒温槽で 37℃に加温してから細胞に添加した。

5-3-1-3

インスリンアナログ溶液の調製

インスリンアナログ製剤は各 608 nM 原液を HBSS で希釈し任意の濃度として、使用した。細胞添加時は恒温槽で 37℃に加温してから添加した。

5-3-1-4

ラット骨格筋芽細胞 L6 の培養と継代操作

MEM alpha を用いて 25 cm²細胞培養用フラスコに L6 細胞を播種した。37℃、5%CO₂ インキュベーターで培養を行い、約 4 日間でコンフルエントに達した。継代操作はトリプシン EDTA で処理した細胞懸濁液を 2×10⁵ cells/mL になるよう調製し、再び新しい培地へと播種した。

5-3-1-5

L6 細胞の筋管細胞への分化誘導

筋管細胞への分化誘導は 25 cm²細胞培養用フラスコ上でコンフルエントに達した L6 細胞に対して、2% FBS 含有の MEM alpha に交換し 5 日間 37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養を行い分化させた。詳細な分化スケジュールは図 4-1 に図示した。

5-3-2

2 次元 SPR イメージング装置による観察方法

5-3-2-1

2 次元 SPR 観察用チップ上での細胞培養

金蒸着チップ上にフレキシパームを PDMS 樹脂を用いて固定し、180℃で 15 分間加熱し、固定し細胞用チャンバを作成した。70%エタノール消毒処理後風乾させ、クリーンベンチの中で 30 分間紫外線殺菌操作し、細胞を播種した。

細胞の播種は、継代操作と同様にトリプシン EDTA 処理した筋管細胞を用いて密度 2.0 ×10⁵ cells/mL の懸濁液を調製し、細胞培養チャンバ上に 100 μL 添加し播種を行った。細胞を播種した金チップは、細胞を接着させるために約 24 時間 37℃、5 %CO₂ インキュベーターで培養した。

5-3-3

経時変化観察

細胞接着した金チップはマッチングオイルを滴下した 2 次元 SPR 装置上のプリズムに設置した。インスリンおよびインスリンアナログ刺激実験時は測定開始から 5 分後にコントロールとして HBSS を 20 μL 、10 分後に種々の濃度のインスリンまたはインスリンアナログ溶液 20 μL をマイクロピペットを用いて加えた。また、2 次元 SPR 装置の観察条件を下記にまとめた。

| | | | |
|------------|--------|----------|---------|
| 測定条件： | | | |
| 光源波長 | 770 nm | 光源電流 | 50 mA |
| 測定角度 | 50.2° | 露光時間 | 1.0 sec |
| レンズ倍率 | 7 倍 | | |
| 取り込みインターバル | | 3.0 sec | |
| 取り込み時間 | | 1200 sec | |

得られた SPR データは ImageJ を用いて解析した。それぞれのデータは独立した 3 回の実験の平均値を求め統計分析に供した。細胞領域はランダムに 100 箇所のデータを抽出し、統計処理に供した。

5-4

結果および考察

5-4-1

種々のインスリンアナログで刺激した際の筋管細胞の 2 次元 SPR 応答の違いと考察

筋管細胞に対して種々のインスリンアナログ刺激を行った結果、それぞれのアナログは濃度依存的に細胞領域での反射光強度を上昇させた。またそれぞれのアナログによって異なる SPR 応答パターンを示し、変異のないワイルドタイプのインスリンも含め特徴的な 4 種類のシグナル上昇パターンが得られた。

それぞれのインスリンアナログの濃度依存的シグナル上昇パターンを図 5-1～5-3 に示す。図 5-1 はノボラピッドを刺激した場合の筋管細胞領域における反射光強度の経時変化を濃度別に色分けしてプロットした。SPR 応答は、刺激直後から緩やかに上昇しはじめ、添加後約 15 分で一度定常に達し、その約 2 分後から再び上昇し始め、添加から約 20 分で定常状態に達する三相性のシグナル上昇パターンが観察された。図 5-2 はヒューマログを刺激した場合の筋管細胞領域における反射光強度上昇の経時変化を濃度別に色分けしてプロットした。ヒューマログで刺激した場合のシグナル上昇パターンは、刺激直後から急激にシグナル上昇し始め、そのまま緩やかに上昇し定常に達する飽和様カーブが観察された。

また、図 5-3 はアピドラで刺激した場合の SPR 応答を濃度別に色分けしてプロットした。アピドラで刺激した場合もヒューマログ刺激時と同様に刺激直後から急速なシグナル上昇が観察された。500 nM 刺激時ではヒューマログ刺激時よりもさらに上昇率が高く、刺激後約 13 分以内に定常状態に達した。また、興味深いことにインスリンアナログによる筋管細胞の刺激では、変異の入っていないワイルドタイプインスリンとは違い、刺激添加から 40 分後にはそれぞれ定常に達し、その反射光強度の増加も濃度依存的に増加した。SPR 応答パターンの違いがインスリンアナログのどの部分を反映しているかは未だ不明であるが、それぞれのインスリンアナログがアミノ酸置換によってホモ 2 量体形成が抑制されていることから、インスリンレセプターとの親和性の違いや、溶液中でのモノマー存在比に由来するものではないかと推察した。

5-4-2 筋管細胞の 2 次元 SPR 応答によるインスリン計測

5-4-1 で計測したそれぞれのインスリンアナログ濃度に対して刺激から 50 分後の時点での反射光強度の変化量をプロットした結果を図 5-4 から図 5-6 に示す。いずれのインスリンアナログでも 100-500 nM までの濃度範囲で直線的に SPR シグナルを上昇させることが示された。筋管細胞と 2 次元 SPR を組み合わせることで、インスリンアナログの検出・定量が可能であることが示された。

5-5 まとめ

本章では、L6 ラット骨格筋芽細胞から分化誘導した筋管細胞をインスリンアナログで刺激した場合の 2 次元 SPR 観察を行い、それぞれのインスリンアナログが 100-500 nM の範囲で濃度依存的に細胞領域の反射光強度を増加させることが示された。また、それぞれのアナログは細胞刺激時のシグナル上昇パターンがそれぞれ特徴的であり、そのシグナル上昇パターンの違いから、それぞれのインスリンアナログとインスリン受容体(IR)との親和性の違いや、作用の仕方の違いが観て取れ、アナログの識別も可能であることが示唆された。

図表

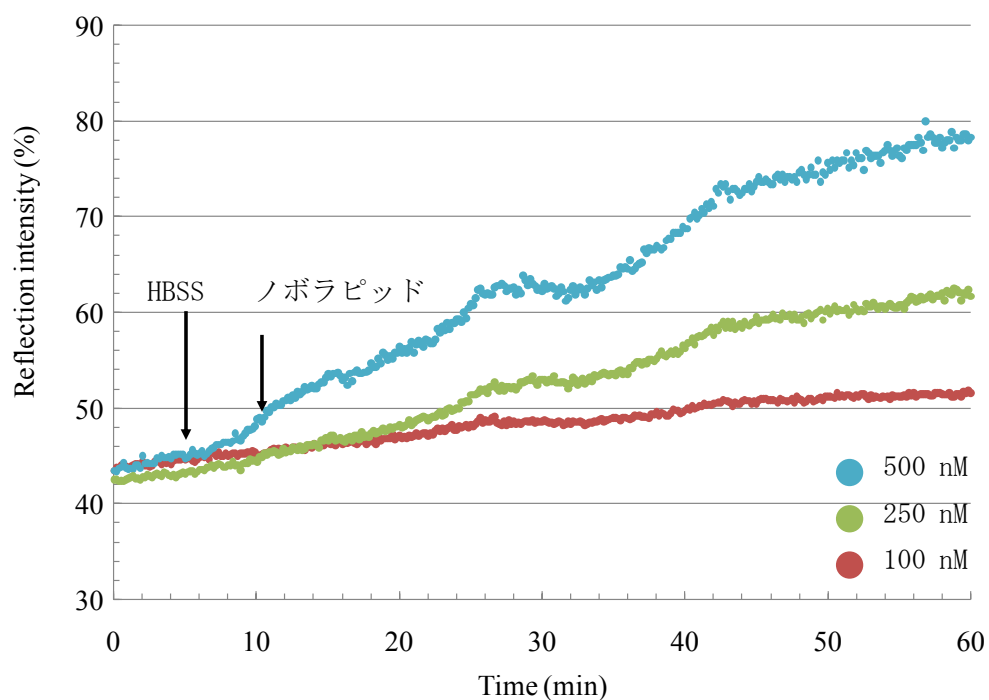


図 5-1 種々の濃度のノボラピッドで刺激した場合の
筋管細胞領域における反射光強度変化

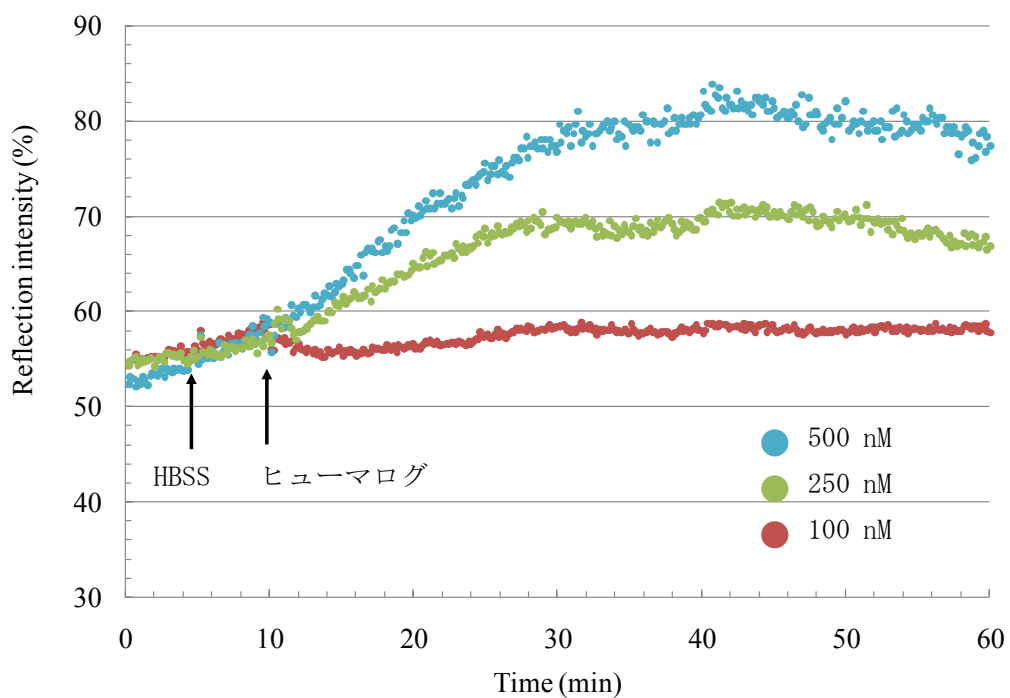


図 5-2 種々の濃度のヒューマログで刺激した場合の
筋管細胞領域における反射光強度変化

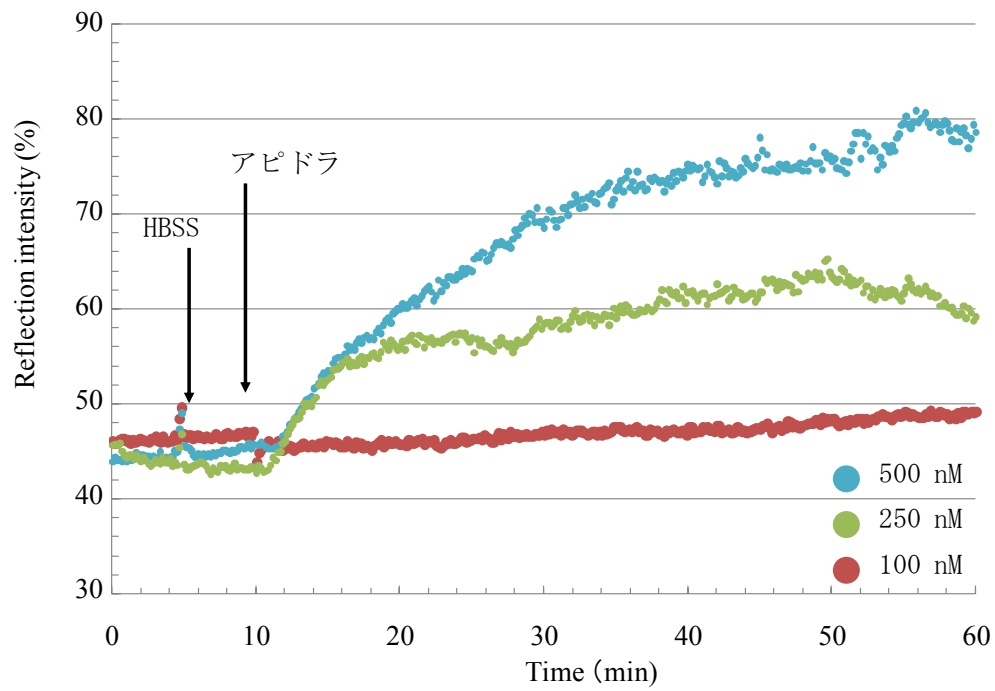


図 5-3 種々の濃度のアピドラで刺激した場合の
筋管細胞領域における反射光強度変化

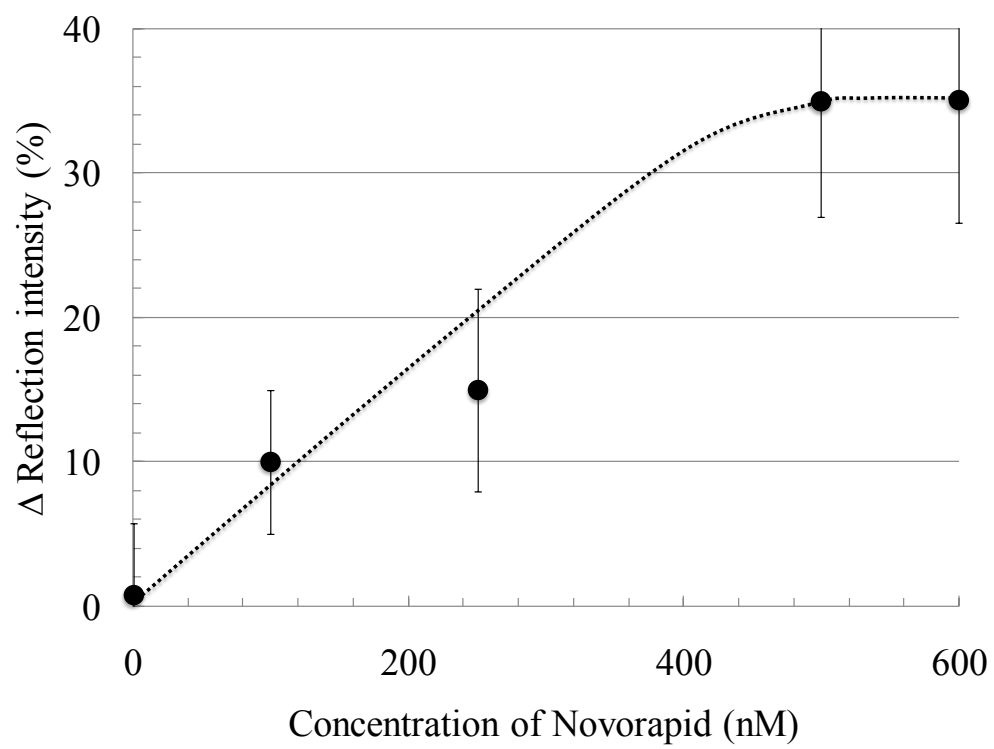


図 5-4 ノボラピッドで刺激した場合の筋管細胞領域
における反射光強度変化の濃度依存性

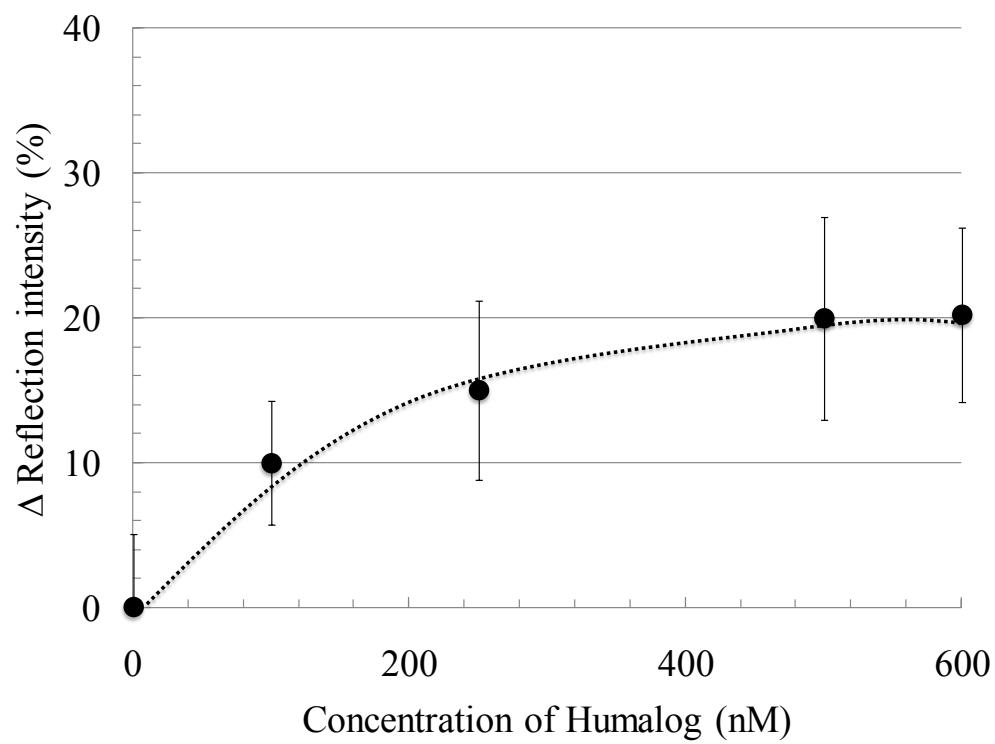


図 5-5 ヒューマログで刺激した場合の筋管細胞領域
における反射光強度変化の濃度依存性

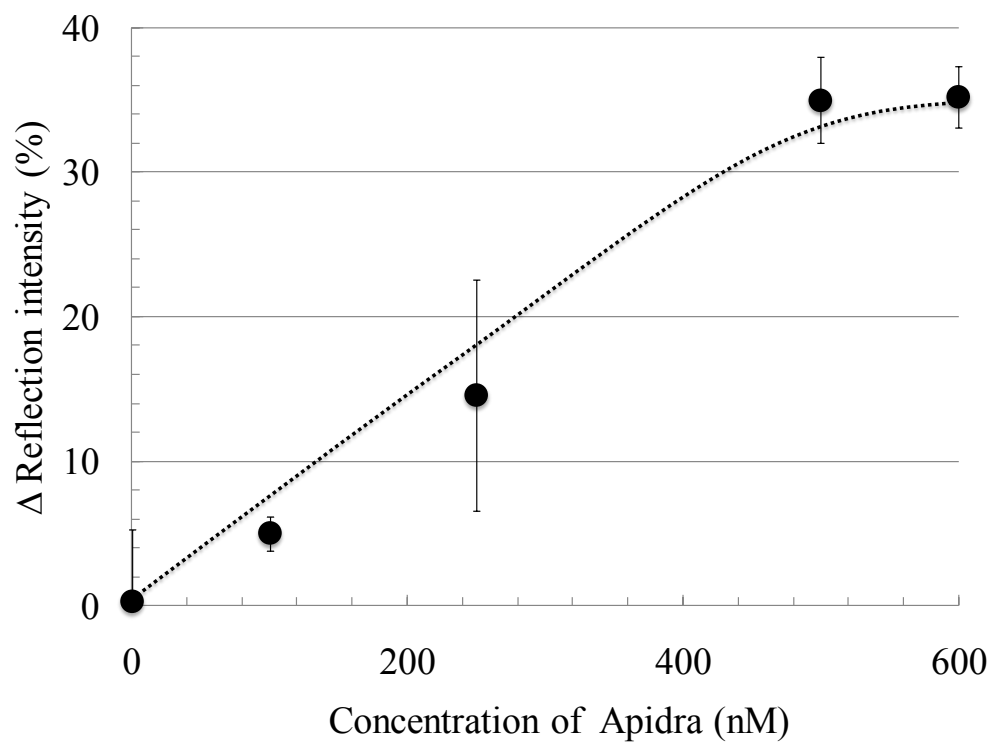


図 5-6 アピドラで刺激した場合の筋管細胞領域における反射光強度変化の濃度依存性

第 6 章 結章

本論文で得られた研究成果を以下にまとめる。

第 2 章

神経モデル細胞における2次元SPR観察は何をモニタリングしているのか？

本章では、私が在籍する研究室でこれまで報告されてきた 2 次元 SPR 観察法を用いた神経モデル細胞 PC12 の薬物刺激応答を PMA で細胞を刺激することで確認した。このシグナル変化の要因を種々の阻害剤を用いて考察した。その結果、観察されるシグナル上昇が PC12 細胞内で発現している cPKC の細胞膜近傍への局在変化に起因することがより強く示された。PMA で誘導される PKC のトランスロケーションはスタウロスポリン、または D-エリスロスフィンゴシンによってそのほとんどが抑制されることから SPR シグナルが PKC などのキナーゼの細胞膜へのトランスロケーションを示す一つの指標になることが示された。また D-エリスロスフィンゴシンは cPKC 特異的な結合能を持っていることから、PC12 細胞における PMA 刺激時の SPR シグナルの変化の大部分が cPKC トランスロケーションに由来することが示唆された。しかしながら、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B で前処理を行った場合でもシグナル上昇の一部が阻害されていることから、2 次元 SPR で検出されるシグナル上昇が PKC のトランスロケーションにとどまらず、アクチンの重合・解重合等の細胞膜近傍のタンパク質分子の動きを反映する事も示唆された。

第 3 章

インスリン刺激時のラット骨格筋芽細胞内反応の 2 次元 SPR を用いての観察と検討

第 3 章では、細胞の 2 次元 SPR 観察における観察対象候補として、グルコース取り込み因子である Glut に着目し、その SPR 観察を目指した。ラット骨格筋芽細胞 L6 はインスリン刺激に応答し、Glut4 を細胞質から細胞膜へとトランスロケーションさせることから、インスリン刺激時の L6 細胞を 2 次元 SPR を用いて観察した。インスリン刺激時によって L6 細胞の細胞底部の屈折率がインスリン濃度依存的に変化したことから、L6 細胞の 2 次元 SPR 観察がインスリンセンシングに応用が可能であることが示された。また、スタウロスポリンやサイトカラシンで前処理した場合のインスリン刺激に対する SPR 応答から、インスリン刺激時の細胞内反応として、細胞膜内側へのキナーゼ類の会合や、その下流の Glut4 のトランスロケーション過程が 2 次元 SPR 観察によってモニタリングできる可能性が示唆された。

第4章

インスリン及びブラジキニン刺激に対するラット筋管細胞内反応の2次元SPR観察と考察

本章ではラット骨格筋芽細胞から低血清培地によって分化誘導した筋管細胞をインスリン刺激、またはブラジキニン刺激した場合の2次元SPR応答について考察を行った。筋管細胞に分化誘導したL6細胞はSPR観察においてインスリンに対する感度が約70倍に向上することが示された。また、これはインスリンとインスリン受容体との親和性自体が変化しないことを考慮するとインスリンの細胞内情報伝達経路上のカスケードにおいて情報伝達タンパク質の発現量の変化に由来するものではないかと考察した。

このような分化前後の感度の変化を利用することによって、2次元SPR観察によりシグナル伝達に参与するタンパク質の発現量の変化や細胞の分化状態の評価への応用が可能であることが示唆された。また、有酸素運動に伴って血中に放出されるホルモンであるブラジキニンによって筋管細胞を刺激した場合では、インスリンと違ったシグナル上昇パターンが観察された。このことからブラジキニン刺激では2次元SPR観察によってインスリンと異なる情報伝達経路をモニタリングできることが示唆された。

第5章

インスリンアナログの刺激に対するラット筋管細胞内反応の2次元SPR観察と考察

本章では、4章で示された筋管細胞に対して3種類の超速効型インスリンアナログ製剤を作用させた場合の2次元SPR観察を行った。2次元SPR観察時の筋管細胞は、種々のインスリンアナログに対して100-500 nMの範囲で濃度依存的に細胞領域での反射光強度を増加させることが示された。また、それぞれのアナログは細胞刺激時のシグナル上昇パターンが異なる特徴を示し、そのパターンの違いから、インスリンアナログとインスリン受容体(IR)との親和性の違いや、作用の仕方の違いが観察でき、インスリンアナログを識別できることが示された。

本論文では金属薄膜上の屈折率変化を敏感に画像化し評価することが可能な2次元SPRを用いて非破壊・非標識でリアルタイムモニタリングできる細胞内反応の拡張について報告してきた。これまで報告されているPKCのトランスロケーションだけでなく、キナーゼ類の細胞膜近傍への集合やトランスポーターのトランスロケーションなども2次元SPR観察でモニタリングできる可能性が示され、また細胞センサとしての発展性も示された。今後、2次元SPR観察法が細胞生物学の発達や薬剤開発、細胞センサなど、関連分野においてますます寄与するものと期待している。

参考文献

1. Feng, G. *et al.* Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron* **28**, 41–51 (2000).
2. Miller, D. S. Protein kinase C regulation of organic anion transport in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* **274**, F156–64 (1998).
3. Sijtsema, N. M. *et al.* Intracellular reactions in single human granulocytes upon phorbol myristate acetate activation using confocal Raman microspectroscopy. *Biophys. J.* **78**, 2606–13 (2000).
4. Kretschmann, E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Phys. A Hadron. Nucl.* **241**, 313–324 (1971).
5. DiPippo, W., Lee, B. J. & Park, K. Design analysis of doped-silicon surface plasmon resonance immunosensors in mid-infrared range. *Opt. Express* **18**, 19396–19406 (2010).
6. Armstrong, R. a, Cairns, N. J. & Lantos, P. L. Spatial pattern of prion protein deposits in patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology* **21**, 19–24 (2001).
7. Cooper, M. A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 515–528 (2002).
8. Hida, Y. & Shinohara, H. Fabrication of a Dual-Enzyme Sensing System Based on Surface Plasmon Resonance Imager (SPRi) for Simultaneous Determination of Bio-Markers. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **6**, 6–9 (2015).
9. Hide, M. *et al.* Real-time analysis of ligand-induced cell surface and intracellular reactions of living mast cells using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Anal. Biochem.* **302**, 28–37 (2002).
10. Horii, M., Shinohara, H., Iribe, Y. & Suzuki, M. Living cell-based allergen sensing using a high resolution two-dimensional surface plasmon resonance imager. *Analyst* **136**, 2706 (2011).
11. Shinohara, H., Sakai, Y. & Mir, T. A. Real-time monitoring of intracellular signal transduction in PC12 cells by two-dimensional surface plasmon resonance imager. *Anal. Biochem.* **441**, 185–9 (2013).
12. Mir, T. A. & Shinohara, H. Two-dimensional surface plasmon resonance imager: An approach to study neuronal differentiation. *Anal. Biochem.* **443**, 46–51 (2013).
13. Huang, S. & Czech, M. P. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab.* **5**, 237–252 (2007).

14. Robinson, L. J. Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes: effects of ATP insulin, and GTP gamma S and localization of GLUT4 to clathrin lattices. *J. Cell Biol.* **117**, 1181–1196 (1992).
15. Lanzerstorfer, P. *et al.* Identification of novel insulin mimetic drugs by quantitative total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 5237–5251 (2014).
16. Chen, Y. *et al.* Rab10 and myosin-Va mediate insulin-stimulated GLUT4 storage vesicle translocation in adipocytes. *J. Cell Biol.* **198**, 545–60 (2012).
17. Bai, L. *et al.* Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action. *Cell Metab.* **5**, 47–57 (2007).
18. Mir, T. A. & Shinohara, H. Two-dimensional surface plasmon resonance imager: An approach to study neuronal differentiation. *Anal. Biochem.* **443**, 46–51 (2013).
19. Sakai, N. *et al.* Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* **139**, 1465–76 (1997).
20. SAKAI, N., SHIRAI, Y. & SAITO, N. Analysis of PKC targeting mechanism using PKC fused with fluorescent proteins. *Folia Pharmacol. Jpn.* **121**, 421–434 (2003).
21. Chen, C. S. & Poenie, M. New fluorescent probes for protein kinase C. Synthesis, characterization, and application. *J. Biol. Chem.* **268**, 15812–15822 (1993).
22. de Barry, J. *et al.* Time-resolved imaging of protein kinase C activation during sea urchin egg fertilization. *Exp Cell Res* **234**, 115–124 (1997).
23. Fontainhas, A. M., Obukhov, A. G. & Nowycky, M. C. Protein kinase Calpha modulates depolarization-evoked changes of intracellular Ca²⁺ concentration in a rat pheochromocytoma cell line. *Neuroscience* **133**, 393–403 (2005).
24. Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P. & Xu, H. The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J. Biol. Chem.* **276**, 36788–96 (2001).
25. Violin, J. D., Zhang, J., Tsien, R. Y. & Newton, A. C. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J. Cell Biol.* **161**, 899–909 (2003).
26. Oancea, E., Teruel, M. N., Quest, A. F. G. & Meyer, T. Green Fluorescent Protein (GFP)-tagged Cysteine-rich Domains from Protein Kinase C as Fluorescent Indicators for Diacylglycerol Signaling in Living Cells. *J. Cell Biol.* **140**, 485–498 (1998).

27. Karaman, M. W. *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **26**, 127–132 (2008).
28. Zegers, M. M. & Hoekstra, D. Sphingolipid transport to the apical plasma membrane domain in human hepatoma cells is controlled by PKC and PKA activity: a correlation with cell polarity in HepG2 cells. *J. Cell Biol.* **138**, 307–21 (1997).
29. Johnson, K. R., Becker, K. P., Facchinetti, M. M., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane: Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M203033200
30. Sachs, C. W. *et al.* Effects of sphingosine stereoisomers on P-glycoprotein phosphorylation and vinblastine accumulation in multidrug-resistant MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 603–612 (1996).
31. Wood, I. S. & Trayhurn, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* **89**, 3 (2003).
32. Asahi, Y., Hayashi, H., Wang, L. & Ebina, Y. Fluoromicroscopic detection of myc-tagged GLUT4 on the cell surface. Co-localization of the translocated GLUT4 with rearranged actin by insulin treatment in CHO cells and L6 myotubes. *J. Med. Invest.* **46**, 192–9 (1999).
33. Huang, S. *et al.* Insulin Stimulates Membrane Fusion and GLUT4 Accumulation in Clathrin Coats on Adipocyte Plasma Membranes. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3456–3469 (2007).
34. Chang, L. & Chiang, S.-H. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol. Med.* **12**, 1 (2006).
35. Wang, Q. *et al.* Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4008–4018 (1999).
36. Beguinot, F., Kahn, C. R., Moses, A. C. & Smith, R. J. The Development of Insulin Receptors and Responsiveness Is an Early Marker of Differentiation in the Muscle Cell Line L6*. *Endocrinology* **118**, 446–455 (1986).
37. Sarker, K. P. & Lee, K. L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway. *Oncogene* **23**, 6064–6070 (2004).
38. Lawson, M. A. & Purslow, P. P. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells. Tissues. Organs* **167**, 130–7 (2000).
39. Cui, Z. *et al.* Preliminary quantitative profile of differential protein expression between rat L6 myoblasts and myotubes by stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *Proteomics* **9**, 1274–1292 (2009).

40. Deshmukh, A. S. *et al.* Deep Proteomics of Mouse Skeletal Muscle Enables Quantitation of Protein Isoforms, Metabolic Pathways, and Transcription Factors. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 841–853 (2015).
41. Kislinger, T. *et al.* Proteome Dynamics during C2C12 Myoblast Differentiation. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 887–901 (2005).
42. Kishi, K. *et al.* Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes* **47**, 550–8 (1998).
43. Alvim, R. O., Cheuhen, M. R., Machado, S. R., Sousa, A. G. P. & Santos, P. C. J. L. General aspects of muscle glucose uptake. *An. Acad. Bras. Cienc.* **87**, 351–368 (2015).
44. Tippmer, S. *et al.* Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms alpha, epsilon, and zeta. *Eur. J. Biochem.* **225**, 297–304 (1994).
45. Lee, S. D., Lee, B. D., Kim, Y., Suh, P. G. & Ryu, S. H. Bradykinin activates phospholipase D2 via protein kinase cdelta in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* (2000).
46. Puljak, L. *et al.* Inhibition of cellular responses to insulin in a rat liver cell line. A role for PKC in insulin resistance. *J. Physiol.* **563**, 471–482 (2005).
47. Nelson, T. J., Sun, M. K., Hongpaisan, J. & Alkon, D. L. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *European Journal of Pharmacology* (2008). doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.051
48. Li, Y. *et al.* Protein Kinase C θ Inhibits Insulin Signaling by Phosphorylating IRS1 at Ser 1101. *J. Biol. Chem.* **279**, 45304–45307 (2004).
49. Pettus, J., Santos Cavaola, T., Tamborlane, W. V & Edelman, S. The past, present, and future of basal insulins. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **32**, 478–96 (2016).
50. Kuzuya, H., Blix, P. M., Horwitz, D. L., Steiner, D. F. & Rubenstein, A. H. Determination of Free and Total Insulin and C-Peptide in Insulin-treated Diabetics. *Diabetes* **26**, 22–29 (1977).
51. Heding, L. G. Insulin, C-peptide, and Proinsulin in Nondiabetics and Insulin-treated Diabetics: Characterization of the Proinsulin in Insulin-treated Diabetics. *Diabetes* **27**, 178–183 (1978).
52. Nakagawa, S. *et al.* A Simple Method for the Determination of Serum Free Insulin Levels in Insulin-treated Patients. *Diabetes* **22**, 590–600 (1973).
53. Kurtzhals, P. *et al.* Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* **49**, 999–1005 (2000).

謝辞

本研究を進めるにあたり、最後まで多大なご指導・ご鞭撻を賜りました篠原寛明教授に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究論文作成にあたり、副指導教員としてご指導いただくとともに、学位論文審査を快く引き受けていただき、貴重なご意見、ご助言、ご指導をいただいた鈴木正康教授に心より厚く御礼申し上げます。

ならびに、本論文作成にあたり、副指導教員として貴重なご意見、また多くのご助言を賜り、さらに、学位論文審査及び、貴重な研究資材をご提供いただいた森寿教授に心より深く御礼申し上げます。

同じく本論文の審査委員会をお引き受けいただき、貴重な御意見・ご指導を賜りました池田真行教授に心から御礼申し上げます。

同様に本論文の作成にあたり、審査委員会をお引き受けいただき、貴重な御意見・ご指導、また研究資源をご提供いただきました、田端俊英教授に心から御礼申し上げます。

加えて、貴重な研究資材であるインスリンアナログを快くご提供くださいました、富山大学院生命融合科学教育部 磯部正治 教授、黒澤信幸 教授 に心より深く御礼申し上げます。

また、研究を進めるにあたり、終始丁寧なご指導をいただきました須加実助教に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究を進めるにあたり、様々な討議、暖かい励まし、数え切れないサポートをいただいた富山大学工学部生命工学科篠原・須加研究室の皆様心からの感謝と尊敬の意を表します。

H29年 1月 白石 有希