

脂味受容体 GPR120 安定的発現培養細胞株の作製について

農学部 溝渕美奈子

【目的】味覚は化学物質を受容することで生じる感覚である。生物は食物を摂取する際、それが有益で摂取すべき物質であるか有害で忌避すべき物質なのかを味覚により判断している。味覚は基本味として甘味・うま味・苦味・酸味・塩味の5種類に分類されるが、近年になり脂味が第6の味覚として提唱された。基本5味のうち甘味、うま味、苦味の受容体はGタンパク質共役型レセプター(GPCR)であり、機能解析には受容体を強制発現させたHEK293T細胞のカルシウムイメージング法¹が広く用いられている。脂味受容体であるGPR120も同様にGPCRの一つで、細胞膜上にあり中・長鎖脂肪酸をリガンドとする。そのため機能解析に上記の方法を用いることができる。受容体を培養細胞に強制発現させるトランスフェクションには一過性の導入と安定的導入がある。前者では解析の都度トランスフェクションが必要となり、手間やコストがかかるといったデメリットがあげられる。そこで今回は長期的に効率よく実験できるよう、脂味受容体GPR120機能解析のための安定的発現培養細胞株の作製を試みた。

【方法】cGPR120/pcDNA3.1 plasmid DNAをトランスフェクションしたHuman embryonic kidney (HEK) 293T細胞を10% fetal bovine serum (FBS)、penicillin-streptomycin (PS)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM 培地)を用いて37°C、5% CO₂条件下、48時間培養した。その後、薬剤耐性マーカーによる選択をするため、予め37°Cに加温した500 µg/ml G-418 硫酸塩溶液含有DMEM (+10%FBS,+PS)培地に置換し、2-3日毎に同様の培地交換を行った。G-418 硫酸塩溶液含有培地で4週間培養したのち、カルシウムイメージング法によってGPR120安定的発現培養細胞株が作製できているか確認をした。

【結果および考察】作製したGPR120発現培養細胞におけるGPR120の作用物質である1µM リノール酸の応答を確認するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた灌流測定により、細胞内のCa²⁺イオン濃度の継時的変化を観察した。その結果、リノール酸投与直後に細胞内Ca²⁺イオン濃度が増加した細胞や増加しなかった細胞等が観察され、応答に差がみられた。この原因はGPR120が欠損している細胞や、リノール酸に対する反応が低い細胞といった様々な株が混在しているからと考えられる。今後は、G418含有培地で培養後、限界希釈法により単クローン性コロニーの単離を試みる予定である。

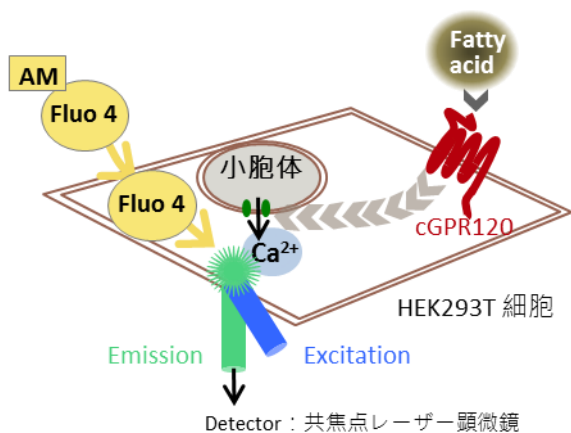


図1.カルシウムイメージングの模式図

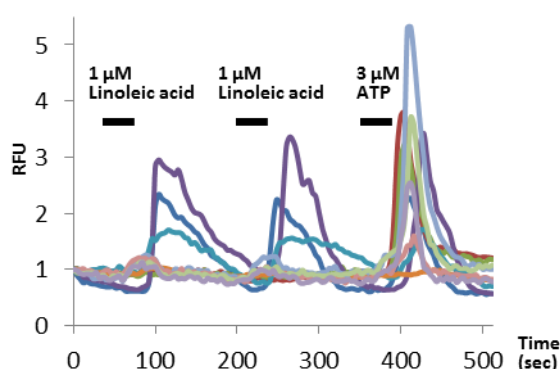


図2.リノール酸投与による個々の細胞内Ca²⁺濃度の継時的変化 (3回分の測定から代表的な応答を示した細胞を表示)

¹ 蛍光カルシウム指示薬を負荷した培養細胞に指示薬固有の励起光を照射し、放出される蛍光をCCDカメラで検出画像化する方法。味物質刺激によりGPCRが活性化されると細胞内Ca²⁺濃度が上昇するため変化を測定する。