

29P-am325

EGF レセプターを過剰に発現している A431 細胞とそのリガンドとの相互作用の表面プラズモン共鳴解析

○水口 貴章¹, 内村 浩正¹, 木曾 良明¹, 齋藤 一樹^{1,2} (¹京都薬大, ²理研SSBC)

【目的】表面プラズモン共鳴 (SPR) は、チップ表面に固定化した生体分子に対して、他の分子や細胞そのものが相互作用する様子をリアルタイムに観測できる手法である。しかし、細胞との相互作用を観測した例は非常に少なく、血球細胞や細菌での実験例に限られていた。そこで、本研究では、抗肺がん薬創製への応用を目指し、A431 細胞を用いて、その細胞表面に過剰に発現している EGF レセプターとリガンド (EGF) との相互作用を解析した。

【方法】EGF 中のアミノ基 (N 末端と 2 つの Lys 残基側鎖) に対して、EDC / NHS を用いた縮合反応により、スペーサー (PEG - 20 atoms) を介したビオチンの付加を行なった。合成したビオチン化 EGF を HPLC で分取し、3 種のモノ-ビオチン化体をそれぞれストレプトアビジンでコートされた SPR チップの表面に固定化した。また、そのチップ表面に A431 細胞を流して、固定化した EGF との相互作用を確認した。さらに、種々の濃度の EGF とともに細胞を流すことにより、チップ表面との相互作用に対する競合的な阻害を検討した。

【結果および考察】合成したビオチン化 EGF の HPLC ピークの中から、MALDI-TOF-MS を用いて、3 種のモノ-ビオチン化 EGF を同定した。A431 細胞はこれらを固定化したもののうちの 1 種と明らかな相互作用を示したが、他の 2 種とはまったく結合しなかった。相互作用を示したモノ-ビオチン化 EGF に対しては、EGF の共存により A431 細胞との相互作用に競合的な阻害が見られた。これらの結果から、A431 細胞そのものを用いて SPR を観測することにより、EGF レセプターと EGF の特異的な相互作用を検出できることがわかった。今後、本手法を創薬研究へと応用展開させて行きたい。