

平成21年度 新基盤生命学特別演習4

「受容体とシグナル伝達入門」

※医学系研究科の授業科目名は『医学集中実習 II』です。

【目的】

細胞膜に存在する受容体は外界の情報を細胞内に伝える重要な役割を果たしている。受容体はタンパク量としてはわずかしがなく、細胞はその量を増減させることで外界からのシグナルの受け取りをコントロールすることがある。したがって、受容体の発現調節は細胞機能の調節に密接な関わりを持つ。一方、細胞に外来から遺伝子を導入（トランスフェクション）して発現させその機能を調べることは、現在の生化学・分子生物学では重要な手段の一つになっている。本実習は受容体の発現調節の機構およびトランスフェクション法の原理を理解する事を目的とし、2つの部分から構成される。一つは、未分化な前骨髄球性細胞（HL-60細胞）が顆粒球へ分化誘導される時のロイコトリエン受容体の mRNA レベルの変化と受容体機能の変化を観察する実験である。もう一つは、ロイコトリエン受容体をコードするプラスミド DNA の大腸菌からの抽出・精製→動物細胞（HEK293細胞）への DNA トランスフェクション→動物細胞内で発現した受容体の機能解析、に至る実験である。

【1日目の集合場所と時間】 2/16(火) 9:00 医学部教育研究棟(新棟)6階 細胞情報学 セミナー室

【実験場所】 細胞情報学教室 一般実験室

【実験日程概略】

		HEK293細胞	HL-60細胞
1日目	午前	EGFPのDNAを遺伝子導入 (トランスフェクション)	レチノイン酸刺激
	午後	前日より培養しておいた"イ"と"ロ" を持つ大腸菌からプラスミド DNAを抽出・精製 ↓ "イ"と"ロ"のDNAを遺伝子導入	
2日目	午前	細胞破砕 ↓ EGFPをドット プロットで検出	EGFPを蛍光顕 微鏡で観察
	午後		
3日目	午前	CAF (LTB ₄ , LTD ₄)	
	午後	Total RNAの抽出 RT-PCR (BLT ₁ , CysLT ₁)	
4日目	午前	RT-PCR反応液の電気泳動	
	午後	分化・未分化細胞で BLT ₁ 発現を観察	

<略語>

HEK293: ヒト胎児腎臓由来細胞株,
HL-60: ヒト急性前骨髄球性細胞株,
CAF: 細胞内カルシウム解析装置,
ドットプロット: タンパク質や核酸をメンブレン上に
固定して検出・定量する方法,
RT-PCR: Reverse-Transcribed
Polymerase Chain Reaction
(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応),
LTB₄: ロイコトリエンB₄ (アラキドン酸
5-リポキシゲナーゼの代謝産物、生理活性脂質),
LTD₄: ロイコトリエンD₄ (同上),
EGFP: オワンクラゲの蛍光蛋白質の人工変異体,
BLT₁: 第一LTB₄受容体,
CysLT₁: 第一システイニルロイコトリエン受容体

【実習内容】...全4日間の実習(2010/2/16(火曜日)~2/19(金曜日))

1. 細胞分化に伴う遺伝子発現

HL-60細胞はレチノイン酸により顆粒球様に分化することが知られている。この分化誘導に伴うLTB₄受容体1(BLT₁)およびLTD₄受容体1(CysLT₁)の発現変化をRT-PCR、及び、細胞内カルシウム上昇レスポンスで観察する。

2. 外来遺伝子導入

HEK293細胞にリポフェクション法によって、外来遺伝子の導入を行う。外来遺伝子としてはpEGFP(蛍光タンパク質EGFPをコードするDNA)、pBLT₁(LTB₄受容体をコードするDNAを発現ベクターpCXN2.1に組み込んだもの)、pCysLT₁(LTD₄受容体をコードするDNAを発現ベクターpCXN2.1に組み込んだもの)を用いる。EGFPの発現は蛍光顕微鏡、及び、抗原抗体反応で観察する。BLT₁およびCysLT₁の発現は、それぞれのリガンドに対する細胞内カルシウム上昇レスポンスで観察する。

本演習受講希望者は担当者(医学系研究科細胞情報学・中村元直(moto-nakamura@umin.net)又は浜野文三江(fhamano-tky@umin.ac.jp))までご連絡下さい。なお、定員は6名とします。募集は先着順とし、定員に達したところで締め切らせていただきます。