

研 究 報 告 書

「セミンタクト細胞を用いた蛋白質の一生の可視化解析」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：加納 ふみ

1. 研究のねらい

本研究では、次の3つのねらいを持って独自の、汎用性が高いタンパク質の機能解析システムを構築し、その解析システムを利用したタンパク質機能と病態との関連解析システムのプロトタイプを構築することを目的とした。

(1)できるだけ細胞内で機能するタンパク質の環境を重視した解析系を作る：個々のタンパク質には、その機能発現を最適にする「環境」が存在している。その環境にはタンパク質の機能発現を助ける脂質や他のタンパク質が、特定の細胞内スポットへとタイミング良く集積する仕組みがある。よってタンパク質の真の機能解析のため、「オルガネラや細胞骨格が作る細胞のトポロジーが保持された状態での機能解析」を行う。

(2)反応の素過程を解析する：細胞内反応の多くは多数のタンパク質がネットワークを作り協奏的に反応が進む。本研究では協奏的に進む生命反応を「素過程に分割し」、それに関わるタンパク質群の機能発現を「同調させた状態で解析できる」システムを作る。

(3)汎用性の高い解析システムをつくる：個々のタンパク質の機能は千差万別であるため、個々の機能に特化した解析システムはあえて行わない。まず、(A) 全てのタンパク質に共通する「タンパク質の一生」の4段階：全てのタンパク質は次の4段階、すなわち DNA から mRNA への転写段階、タンパク質への翻訳段階、細胞内局在が規定される輸送段階、分解段階、で精密な機能発現制御を受けている。タンパク質の一生のうちどの段階が病態発現時に異常・攪乱を来しているかを明らかにすることは、病態原因・増悪の分子機構説明のみならず、病態改善のための創薬ターゲットスクリーニングのためにも重要であると考え。また、(B) シグナル伝達：細胞の生命機能は細胞外からのシグナルを核内へと伝播させるシグナル伝達過程によって、多大な影響を受けている。そこで病態におけるシグナル伝達過程の以上を検出し解析するためのシステムが、早急に必要とされている。

以上の「ねらい」を満たすタンパク質の機能計測・解析システムとして、細胞型試験管・「セミンタクト細胞系」と可視化技術を最適にカップルさせた「セミンタクト細胞・リシール細胞によるタンパク質機能可視化解析システム」を提案した。

2. 研究成果

(1) 基盤技術セミンタクト細胞解析システムの成熟とリシール細胞技術の確立

セミンタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素であるストレプトリシンO (streptolysin O: SLO)などを形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞(セミンタクト細胞)のことである(図1)。オルガネラや細胞骨格そのものとそのトポロジーは保持したまま、細胞質を流出させることができる。ここ(細胞を一個の試験管に見立てて)に新たに外部より分画した細胞質(又はその成分)とATP再生系などを添加し、細胞質に依存的な細胞内のイベント(細胞内膜動過程、タンパク質間相互作用、タンパク質のターゲティングなど)

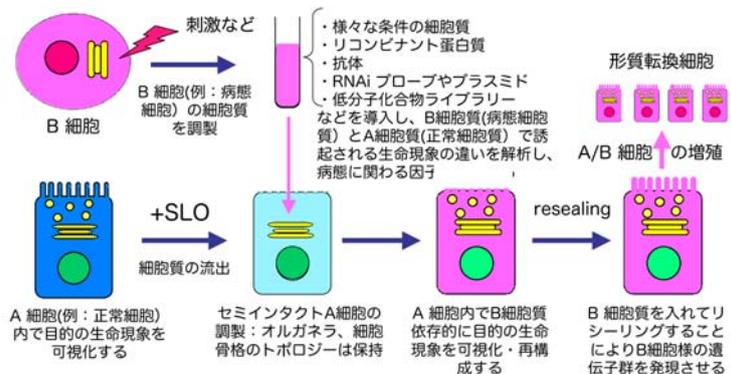


図1 セミンタクト細胞・リシール細胞技術概要

を再構成できれば、生起する生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる(図 1)。例えば、セミインタクト正常細胞に「病態モデルマウス組織より調製した病態細胞質」を導入することにより真の細胞質状態に近い「病態モデル細胞」を作成できる(図2)。この様にセミインタクト細胞を用いることにより、擬似的に細胞形質を病態のものと同調した細胞アッセイ系を構築し、その中で同期して生起する生命現象をS/N比良く検出できることになる。

さらに本研究において、我々はセミインタクト細胞の穴を閉じインタクト細胞へと復帰させる技術「リシール細胞技術」を確立することに成功した。カルシウムイオンと細胞質依存的にセミインタクト細胞の形質膜に形成された穴が閉じ、生細胞に戻ることがわかった。さらに興味深いことに一部のリシール細胞は継代・培養も可能であった。この「リシール細胞技術」は以下の 2 点でセミインタクト細胞の新たな展開技術になり得ると考えられる。まず、(I)リシール細胞では形質膜がインタクトに戻っているため、今までセミインタクト細胞で難しかった形質膜を介した受容体媒介のシグナル伝達過程、物質の取込過程であるエンドサイトーシス過程の再構成・解析が可能となった。またセミインタクト細胞内ではおそらくイオン環境の変化で小胞化していたミトコンドリア形態を、リシール細胞内では正常な形態として観察できたため、近年疾患との関係が急速に注目されつつあるミトコンドリア形態・機能アッセイ系の確立が本技術によって実現できた。(II)リシール細胞技術により、細胞内に導入した標識分子の動態や機能の長時間追跡が可能になった。さらに一部の細胞では継代・培養することが可能となったため、本リシール細胞技術は新規細胞形質転換法、エピジェネティクス改変誘導法としての応用が期待できる。

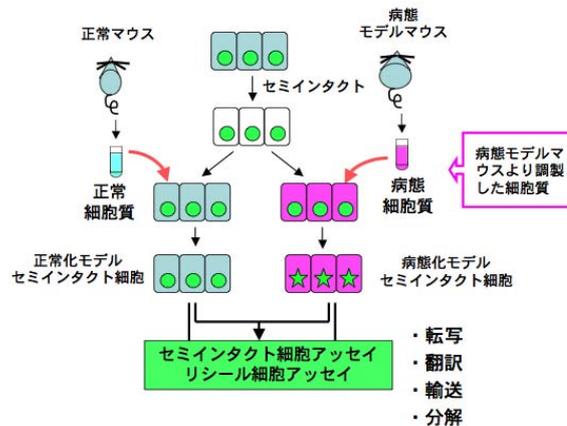


図 2 病態モデル細胞構築スキーム

以上の基盤技術を基に、本さきがけ研究期間中に以下の生命現象に対して可視化再構成系を構築することに成功した。

- ・転写: メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 の局在・動態変化過程
- ・翻訳: 転写因子 ATF4 のストレス依存的な翻訳過程
- ・輸送: 小胞体⇄ゴルジ体間小胞輸送、エンドサイトーシス
- ・シグナル伝達: Ras-MAPK シグナル伝達、PI3 キナーゼ(PI3K)-Akt シグナル伝達
- ・その他: インシュリン分泌、エンドソーム特異的に局在する脂質 (PI3P)の局在変化
ミトコンドリア動態・形態変化解析

(2) 高脂血症モデル細胞を用いたシグナル伝達攪乱とアポトーシス・ミトコンドリア機能低下誘導メカニズムの研究

本項では、高脂血症モデル細胞の構築と、その病態モデル細胞内で PI3K-Akt シグナル伝達破綻によって誘導される抗アポトーシス機能の脆弱化について述べる。

上記方法を用いて高脂血症における病態細胞内環境をセミインタクト細胞内で再現し、「高脂血症モデル細胞」を構築した。具体的には、高脂血症モデルマウスとして汎用される ApoE ノックアウトマウスの肝臓から調製した細胞質「高脂血症細胞質」をセミインタクト HeLa 細胞に添加し、細胞内の環境を高脂血症時のものに改変した。その後形質膜を封入(リシール)し、この細胞を「高脂血症モデル細胞」として解析を進めた。高脂血症環境下におけるシグナル伝達攪乱を検証するために、受容体チロシンキナーゼ下流で駆動される2つのシグナル伝達経路、Ras-MAPK 経路と PI3 キナーゼ(PI3K)-Akt 経路に注目した。これら 2 つの経路は血清あるいは上皮成長因子 EGF 刺激により活性化され、MAPK あるいは Akt のリン酸化がそれぞれの経路の活性化の指標となっている。まず、野生型マウス肝臓から調製した細胞質「正常細胞質」を加えたセミインタクト HeLa 細胞をリシールした(これが「正常モデル細胞」となる)。正常モデル細胞を刺激したところ、インタクト細胞と同様のキネティクスで MAPK や Akt のリン酸化が検出された。ところが、高脂血症モデ

ル細胞においては刺激依存的な MAPK リン酸化は正常モデル細胞と同様に誘導されるが、Akt のリン酸化が阻害されていることが明らかになり(図 3)、高脂血症の細胞内環境では PI3K-Akt シグナルがうまく伝播されていない可能性が示唆された。

以上の結果から高脂血症環境下では PI3K-Akt シグナルによって制御を受ける多くの生命現象がネガティブな作用を受けると予想されるが、その中でも我々は特に PI3K-Akt シグナルによってダイレクトに制御されるアポトーシス過程に注目した。そこで正常/高脂血症細胞質を添加したリシール細胞を UV 照射・血清飢餓環境におきアポトーシスを誘導した。すると、アポトーシスの誘導効率が高脂血症モデル細胞では正常モデル細胞に比べて増大していることが明らかとなり、Akt シグナル伝達経路が阻害されている高脂血症モデル細胞はアポトーシス誘導に対して脆弱性を持つことが確認された。さらに、高脂血症環境下におけるミトコンドリア形態と機能も同時に解析した。ミトコンドリアはアポトーシス誘導に中心的役割を果たすオルガネラであり、Akt シグナル破綻がミトコンドリア形態・機能を阻害し、その結果 Akt 依存的な抗アポトーシス効果が攪乱され、

細胞病態が発現する可能性が大きいと考えた。興味深いことに、高脂血症細胞質を導入したリシール細胞内のミトコンドリア長は全体的に長くなり、ヒストグラムは最少は $0.5 \mu\text{m}$ から最大は $20 \mu\text{m}$ 以上のもので様々な長さに分布した(図 4)。また、長さの変化だけでなく、形態的にも swell(膨潤)した形のものが多くなっているように見えた。さらに正常/高脂血症細胞質環境下におけるリシール細胞内ミトコンドリアの膜電位を tetramethylrhodamine methyl ester(TMRM)を用いて計測したところ、高脂血症モデル細胞ではミトコンドリア膜電位が $\sim 12\%$ 減少しており、高脂血症環境下においてミトコンドリアの機能低下の可能性が示唆された。PI3K-Akt シグナルは抗アポトーシス活性をもつこと、さらに平行して行った網羅的キナーゼ阻害剤スクリーニングの結果 PI3K-Akt シグナル伝達に関わる複数キナーゼの阻害剤がミトコンドリア長を長くすることから、高脂血症環境下における PI3K-Akt シグナル伝達阻害がミトコンドリア機能低下ひいてはアポトーシスを誘導するという分子機構モデルを考えており、生細胞およびリシール細胞系を用いてモデルの検証を進めている。

3. 今後の展開

以上、本研究ではセミンタクト細胞・リシール細胞を用いた疾患モデル細胞構築と病態時に攪乱されるタンパク質機能と病態との関連・分子メカニズム解析システムのプロトタイプ構築を実現した。この系を駆使し、現在我々は高脂血症モデル細胞における PI3K-Akt シグナル伝達破綻の鍵因子同定を進めている。本技術は他の病態におけるタンパク質機能解析への応用、低分子化合物ライブラリースクリーニングへの応用へと展開しようと考えており、汎用性の高いタンパク質機能と病態との関連研究に応用できる解析システムの完成が期待できる。

また、ここで開発したセミンタクト細胞リシール技術は、多様な細胞状態をシステムとして供することができる汎用性の高い計測系であるとともに、タンパク質導入だけによる(ゲノムに傷を付けない安全な)新規細胞形質転換法やエピジェネティクス改変法といった新たな「細胞創成法」としての応用も十分期待できる。今後はリシール細胞技術を基盤とした病態細胞内における生命現象

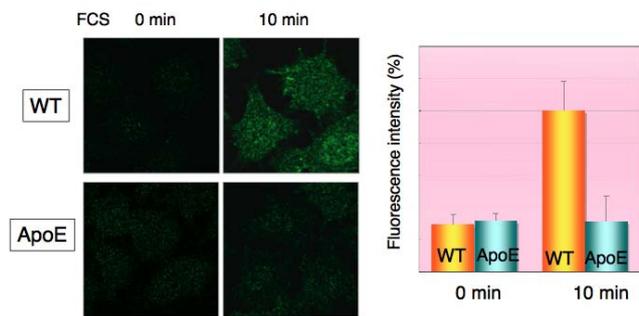


図 3 高脂血症モデル細胞における Akt リン酸化阻害

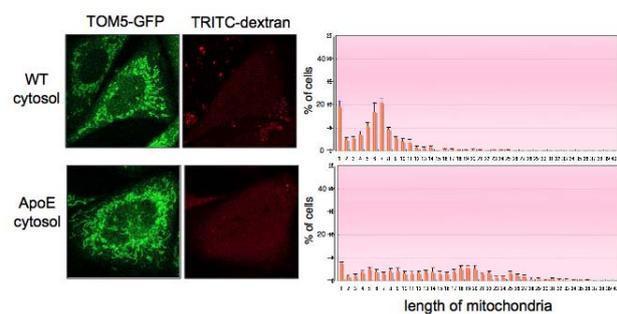


図 4 高脂血症モデル細胞におけるミトコンドリア長の増大

可視化計測システムの構築を通し、生命現象を「見て」「理解して」、その知見を新規細胞を「創る」ことにフィードバックしたいと考えている。

4. 自己評価

私にとって一番大きな成果は、さきがけ研究期間中にセミインタクト細胞をインタクト細胞に戻す「リシール細胞技術」を確立でき、それを用いた「病態モデル細胞」内現象の可視化解析のプロトタイプを構築できたことである。リシール細胞技術によりセミインタクト細胞では再構成が難しかった細胞膜(細胞膜受容体)を介した細胞内のシグナル伝達過程を可視化解析することが可能となり、病態におけるシグナル伝達異常の検出およびその分子メカニズム解明に着手することができるようになった。現在のところ、シグナル伝達の可視化を蛍光抗体法によって行っているが、リシール法を用いた「病態モデル細胞」系を用いた解析の妙味は、まさに病態細胞内で攪乱を受けるシグナル伝達の空間的・時間的変化(動態)解析であるため、現在定量可能なシグナル伝達可視化蛍光プローブの設計と作成に取りかかっているところである。

5. 研究総括の見解

タンパク質をセミインタクト細胞に導入する技術で病気のモデル細胞を実現したばかりか、それをインタクト細胞に戻すリシール細胞技術を完成させた。これを用いて病体変異(高脂血症)モデル細胞のシグナル伝達特性を調べ、アポトーシスが起こり易いこと、ミトコンドリアの形態変異を見出すなど、病体モデル細胞をセミインタクト・リシール細胞によって再構築出来ることが示された。独創的な研究で素晴らしい成果を挙げ高く評価したい。今後当初の目的に向かって可視化と他の病体モデル細胞研究への発展が大いに期待される。これによって病気の要因が細胞レベルで理解され、臨床応用に繋がればなお素晴らしいことであろう。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

<ul style="list-style-type: none"> Adachi A, Kano F, Tsuboi T, Fujita M, Maeda Y, Murata M Golgi-associated GSK3beta regulates the sorting process of post-Golgi membrane trafficking. <i>J. Cell Sci.</i>, 123, 3215-3225, 2010.
<ul style="list-style-type: none"> Kano. F., Yamauchi, S., Yoshida, Y., Watanabe-Takahashi, M., Nishikawa, K., Nakamura, N., and Murata, M. Yip1A regulates the retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. <i>J. Cell Sci.</i>, 122, 2218-2227, 2009
<ul style="list-style-type: none"> Fujiki, K., Kano, F., and Murata, M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. <i>BMC Biology</i>, Jul 10;7:38, 2009
<ul style="list-style-type: none"> Adachi, A., Kano, F., Saido, T.C., and Murata M. Visual screening and analysis for kinase-regulated membrane trafficking pathways that are involved in extensive beta-amyloid secretion. <i>Genes Cells</i>. 14, 355-369, 2009
<ul style="list-style-type: none"> Kano, F., Arai, T., Matsuto, M., Hayashi, H., Sato, M., Murata M. Hydrogen peroxide depletes phosphatidylinositol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependent manner and perturbs endocytosis. <i>BBA - Molecular Cell Research</i>, in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件 (1件は非公開希望)

発 明 者: 村田 昌之、臼井 貴史、加納 ふみ、安達 淳博

発明の名称: 細胞内における生体物質の局在制御関連酵素の特定法
出願人: 東京大学、日京テクノス(株)
出願日: 2008/7/15

(3)学会発表

学会発表(国際)

・Fumi Kano, Shinobu Yamauchi, Yumi Yoshida, Nobuhiro Nakamura, and Masayuki Murata. Reconstitution of anterograde and retrograde transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in semi-intact CHO cells: The role of Yip1A in retrograde transport. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA.

・Masayuki Murata, Atsuhiko Adachi, Katsunori Fujiki, and Fumi Kano. Coupled dynamics of organelle biogenesis and vesicular transport during cell cycle. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA

・Atsuhiko Adachi, Fumi Kano, Masayuki Murata. Visual screening for kinase-regulated membrane trafficking between endosomes and Golgi : Identification of the kinases that involved in extensive β -amyloid secretion. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA.

・Katsunori Fujiki, Fumi Kano, Kunio Shiota, Masayuki Murata. Expression of PPAR γ Gene is Repressed by DNA Methylation in Adipose Tissue of Diabetes Model Mice. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA.

学会発表(国内)

・Fumi Kano, Tamaki Arai, Mariko Matsuto, Masayuki Murata. p38-dependent loss of phosphatidylinositol-3-phosphate at endosomes affects the retrograde transport of cholera toxin from cell surface to the Golgi. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会. 2010年12月8日.

・Fumi Kano, Tamaki Arai, Mariko Matsuto, Masayuki Murata. Establishment of semi-intact cell system and application of its resealing technique: a study of membrane dynamics. 第48回日本生物物理学会年会. 2010年9月21日.

・荒井珠貴、松戸真理子、加納ふみ、村田昌之. セミンタクト細胞を利用した細胞機能改変と細胞創成. 細胞を創る研究会 2.0. 2009年10月2日.

・安達淳博、加納ふみ、村田昌之. セルアレイチップを用いた細胞内キナーゼネットワーク可視化解析システムの構築. 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会. 2008年12月10日.

・加納ふみ、安達淳博、村田昌之. セミンタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間小胞輸送アッセイの構築とその応用. 日本ケミカルバイオロジー学会第三回年会. 2008年5月19・20日. ポスター賞受賞.

(4)招待講演

招待講演(国内)

・細胞を創る研究会 3.0 セッション「うつわを創る」ポスターセレクション セミンタクト細胞

リシール法を用いたシグナル伝達経路解析システムの構築. 2010 年 11 月 12 日.

・日本薬学会第130年会シンポジウム「薬学における生命指向型化学」 セミインタクト細胞を用いたオルガネラダイナミクス of 分子機構解明. 2010 年 3 月 29 日

・日本生物物理学会 第 57 回年会 シンポジウム「メンブレントランスフォーマー!! ~生体膜の形を変えるための合体と解離~」Mechanistic Insights into Membrane Dynamics Using Semi-Intact Cell System 2009 年 11 月 30 日.

・日本化学会 第3回関東支部大会シンポジウム「ケミカルバイオロジーが拓く生命科学研究の新展開」生命現象の可視化解析ツールとしてのセミインタクト細胞系. 2009 年 9 月 4 日.