

研究終了報告書

「細胞間相互作用の可視化と操作のための技術開発」

研究期間: 2020 年 11 月～2024 年 3 月

研究者: 京 卓志

1. 研究のねらい

細胞間相互作用は多細胞生物を多細胞生物たらしめる根本原理であり、発生における細胞選別や、組織の形成・維持、さらに、高次脳機能の発現に至るまで、様々な生命現象に関与している。細胞間相互作用は主に細胞接着タンパク質によって担われている。これまで遺伝子破壊や過剰発現実験等により様々な細胞接着タンパク質の生理的役割が見出されてきた。しかし、その細胞接着タンパク質の機能であるはずの「接着活性」自体は見過ごされており、いつ・どこで接着活性を示し、どれくらいの長さ接着活性は維持され、そしていつ解離するのかという時間的・空間的情報については全く分かっていない。こうした状況から、本研究では、細胞間相互作用をリアルタイムに可視化できる蛍光プローブを開発し、生命現象における細胞間相互作用の時空間情報を獲得することを目指した。細胞間相互作用の蛍光プローブを開発するために、以下の3つの研究テーマを計画した。

研究テーマ A「特定の細胞接着タンパク質が仲介する特異的な細胞間相互作用を直接的に可視化する蛍光プローブの開発」

研究テーマ B「特定の細胞接着タンパク質に依らない、ユニバーサルな細胞間相互作用を直接的に可視化する蛍光プローブの開発」

研究テーマ C「細胞間相互作用を間接的に可視化する蛍光プローブの開発」

さらに、細胞間相互作用の蛍光プローブによって得られた細胞間相互作用の時空間情報をもとに、その細胞間相互作用を高い時間的・空間的分解能で人為的に改変することで、細胞間相互作用とそれを取り巻く種々のシグナル経路間の関係性を明らかにすることを目指した。このために、近年急速に発展している光操作手法を利用して、細胞間相互作用を人為的に操作可能なツールを開発するために以下の3つの研究テーマを計画した。

研究テーマ D「光による接着・解離が可能な人工細胞接着タンパク質の開発」

研究テーマ E「細胞接着タンパク質の細胞外領域を切断することで細胞間接着を解消させる光活性化プロテアーゼの開発」

研究テーマ F「細胞同士が接触しているにも関わらず、それを細胞に感知させない光応答性転写制御因子の開発」

2. 研究成果

(1) 概要

研究テーマ A では、特定の細胞接着タンパク質として、神経細胞の自己認識に関与するク

クラスター型プロトカドヘリン(Pcdh)及び、発生から高次脳機能にまで関わる N-カドヘリンを対象に、それらの相互作用を可視化する蛍光プローブの開発に成功した(Hoshino, Kanadome et al., 2023 PNAS; Kanadome et al., 2023 iScience; Kanadome et al., 2022 Commun. Biol.)。

研究テーマ B では、細胞同士の接触を可視化する人工的な蛍光プローブを開発した。この蛍光プローブによって、ダイナミックに変化する細胞接触をリアルタイムで可視化することに成功した。

研究テーマ C では、細胞間相互作用によって、活性化される細胞内シグナル経路の活性をモニターすることで、間接的に細胞間相互作用を可視化できる蛍光プローブの作製を行った。その細胞内シグナル経路を構成するリン酸化酵素のキナーゼ活性を可視化する蛍光プローブを獲得することができた。

研究テーマ D では、光応答性の二量体化ドメインである iLID を N-カドヘリンの細胞外領域に融合することで、光依存的に細胞接着を誘導することを目的とした光操作ツールの開発を行った。しかし、作製したコンストラクトは全く細胞膜に局在せず、目的の光照射ツールを獲得することはできなかった。

研究テーマ E では、細胞接着タンパク質を切断する活性があるプロテアーゼである ADAM10 に光応答性を付与することで、光活性化 ADAM10 の開発を目指した。しかし、その開発以前に、ADAM10 は全く細胞膜に局在しないことがわかった。過去の報告を参考に、ADAM10 を細胞膜に効率良く局在させる変異体の作製や、キャリアタンパク質との共発現などを試したが、いずれも効果がなかった。このため、光活性化 ADAM10 を開発することができなかった。

研究テーマ F では、細胞接触によって活性化される細胞内シグナル経路のアウトプットとして、不活性化される転写制御因子を、その細胞内シグナル経路とは独立して、光によって活性化させることで細胞接触を細胞に感知させなくする光活性化ツールの開発を行った。LANS4 と LOVTRAP という 2 種類の光感受性ドメインを使用することで、光照射によって、活性化される転写制御因子の開発に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「特定の細胞接着タンパク質が仲介する特異的な細胞間相互作用を直接的に可視化する蛍光プローブの開発」

特定の細胞接着タンパク質として、クラスター型プロトカドヘリン(Pcdh)のアイソフォームの 1 つである Pcdha4 を選択した。Pcdha4 は最初に同定された Pcdh である。ddGFP という蛍光タンパク質を利用し、Pcdha4 の相互作用によって緑色蛍光を生じる蛍光プローブの開発を目指した。ddGFP は ddGFP-A と ddGFP-B がヘテロ二量体を形成することで、緑色蛍光を生じる蛍光タンパク質である。まず、ddGFP-A と ddGFP-B をそれぞれ Pcdha4 の細胞外領域に挿入したコンストラクトを作製した。これらをそれぞれ発現させた HEK293T 細胞を共培養し、共焦点顕微鏡で観察したところ、細胞接触部位における緑色蛍光を確認することができた。また、神経細胞にこれらのコンストラクトを発現させ、共培養後、共焦点顕微鏡で観察した結果、神経同士が接触する部位で緑色蛍光を確認することができた。

次の展開として、ddGFP-A と ddGFP-B を共に細胞外領域に挿入した Pcdha4 を作製した(図

1)。この蛍光プローブを HEK293T 細胞に発現させ、共焦点顕微鏡で観察したところ、細胞接触部位において緑色蛍光が確認された。さらに、神経細胞

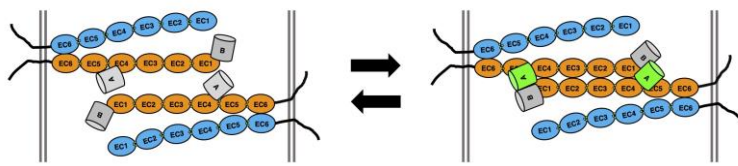


図1. ddGFP を利用した Pcdha4 蛍光プローブの模式

にこの蛍光プローブを導入し、共焦点顕微鏡で観察することで、同一神経細胞に由来する突起間における Pcdha4 間相互作用をリアルタイムで可視化することに成功した。これは、神経細胞の自己認識につながる相互作用を可視化した初めての成果である (Kanadome et al., 2023 iScience)。また、Pcdha4 の蛍光プローブの前身として作製を進めていた、PcdhgB2 アイソフォームの FRET に基づく蛍光プローブの開発にも成功した。この蛍光プローブによって、PcdhgB2 はシナプスでは稀にしか相互作用しないことを明らかにした (Hoshino, Kanadome et al., 2023 PNAS)。

さらに Pcdh 以外の細胞接着タンパク質として N-カドヘリンを対象とした蛍光プローブを開発し、生きた神経細胞における N-カドヘリン間相互作用を初めて可視化することに成功した (Kanadome et al., 2022 Commun. Biol.)。

研究テーマ B「特定の細胞接着タンパク質に依らない、ユニバーサルな細胞間相互作用を直接的に可視化する蛍光プローブの開発」

これまでユニバーサルな細胞接触を可視化する方法として、split-GFP に基づいた蛍光プローブが主流であった。split-GFP に基づいた蛍光プローブは、細胞同士が接触してから蛍光を発するまでに長い時間 (数十分から数時間) を要する点、また、反応が不可逆であるために細胞接触の解離をモニターすることができない点において、ダイナミックに変化する細胞接触をリアルタイムで可視化することができなかつた。この問題を回避するために、応答が速く、可逆的な ddGFP を使用した蛍光プローブの開発を行った。開発した蛍光プローブの模式図を図 2 に示す。この蛍光プローブを HEK293A 細胞に発現させて、タイムラプスイメージングを行った結果、細胞同士が接触し、その後離れていく様子をリアルタイムで観察することができた。さらに、small GTPase の赤色蛍光プローブを開発し、ddGFP を使用した細胞接触の蛍光プローブと、ファイバーアクチンの青色蛍光プローブと同時に使用することで、ダイナミックに変化する細胞接触と、それに伴う small GTPase 活性とファイバーアクチン動態の同時イメージングに成功した。

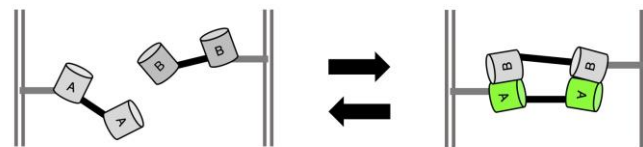


図2. ddGFP を利用したユニバーサルな細胞接触を可視化する蛍光プローブの模式図

この問題を回避するために、応答が速く、可逆的な ddGFP を使用した蛍光プローブの開発を行った。開発した蛍光プローブの模式図を図 2 に示す。この蛍光プローブを HEK293A 細胞に発現させて、タイムラプスイメージングを行った結果、細胞同士が接触し、その後離れていく様子をリアルタイムで観察することができた。さらに、small GTPase の赤色蛍光プローブを開発し、ddGFP を使用した細胞接触の蛍光プローブと、ファイバーアクチンの青色蛍光プローブと同時に使用することで、ダイナミックに変化する細胞接触と、それに伴う small GTPase 活性とファイバーアクチン動態の同時イメージングに成功した。

研究テーマ C「細胞間相互作用を間接的に可視化する蛍光プローブの開発」

ある細胞内シグナル経路は細胞接触を感知し、細胞増殖を制御するコンタクトインヒビションを担っている。この経路の活性を可視化することで間接的に細胞間相互作用を検出することを

目指した。具体的には、この細胞内シグナル経路を構成するリン酸化酵素のキナーゼ活性を可視化する、FRET に基づいた蛍光プローブを開発した。図 3 に作製した蛍光プローブの模式図を示す。リン酸化酵素が不活性化状態

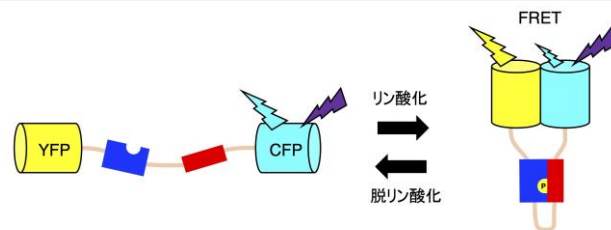


図3. FRETに基づいたLATS1/2の蛍光プローブの模式

のときは、シアン色蛍光タンパク質 (CFP) の蛍光が主に検出されるが、蛍光プローブ (図 3 の赤い部分) がリン酸化酵素によってリン酸化されると、リン酸化ペプチド結合ドメイン (図 3 の青い部分) がリン酸化された部位に結合することで、構造変化が起こる。その結果、FRET が生じ、CFP 蛍光の減少と黄色蛍光タンパク質 (YFP) 蛍光の増加が起こる。この蛍光プローブを培養細胞に発現させて、リン酸化酵素を強烈に活性化させる刺激を行ったところ、FRET シグナルが顕著に観察された。リン酸化酵素を欠損させた培養細胞では、刺激に依らずに、低い FRET シグナルを示した。以上の結果から、対象とするリン酸化酵素の活性を特異的に検出できる蛍光プローブを獲得できたことが確認できた。

研究テーマ D「光による接着・解離が可能な人工細胞接着タンパク質の開発」

光応答性二量体化ツールである iLID の構成要素である LOV2-SsrA と SspB をそれぞれ N-カドヘリンの細胞外領域 (EC3-EC5) に融合したコンストラクトを作製した (図 4)。このコンストラクトをそれぞれ HEK293T 細胞に発現させ、細胞内局在を観察したところ、どちらも全く細胞膜に局在しなかった。結論として、目的の光操作ツールを開発することができなかった。細胞膜への局在効率を向上させることが今後の課題である。

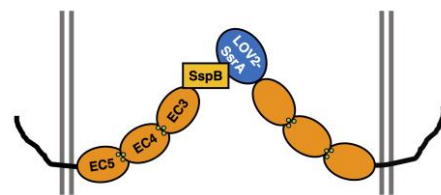


図4. 人工細胞接着タンパク質の模式

研究テーマ E「細胞接着タンパク質の細胞外領域を切断することで細胞間接着を解消させる光活性化プロテアーゼの開発」

N-カドヘリンや Pcdh の細胞外領域を切断する活性があるプロテアーゼである ADAM10 の光活性化ツールの開発を目指した。まず、赤色蛍光タンパク質 mCherry を細胞質領域に融合した ADAM10 (ADAM10-mCherry) を作製し、その細胞内局在を調べた。ADAM10-mCherry を発現させた COS7 細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、mCherry 蛍光はほとんど細胞膜には見られなかった。ADAM10-mCherry は主に小胞体様局在様式を示した。細胞膜への局在を向上させるために、過去の報告を参考にし、ADAM10 の細胞質領域の欠損変異体を作製したが、細胞膜への局在は向上しなかった。また、ADAM10 と相互作用することで細胞膜局在を促進することが報告されている Tspan15 を共発現させて、ADAM10-mCherry の細胞内局在を観察した。その結果、Tspan15 は効率よく細胞膜に局在したが、ADAM10-mCherry は小胞体様の局在様式を示した。結論として、目的の光活性化 ADAM10 を開発することができなかった。ADAM10 は神経細胞では細胞膜に良く局在することが報告されているため、神経細胞

を用いて ADAM10 コンストラクトの動作確認を行うことで、光操作ツール開発に資する知見が得られるかもしれない。

研究テーマ F「細胞同士が接触しているにも関わらず、それを細胞に感知させない光応答性転写制御因子の開発」

細胞接触によって活性化される細胞内シグナル経路のアウトプットとして、不活性化される転写制御因子を、その細胞内シグナル経路とは独立して、光によって活性化させることで細胞接触を細胞に感知させなくする光活性化転写制御因子の開発を目指した。その転写制御因子の活性は核移行の制御によって行われている。光活性化核移行ツールである LANS4 と、光に応答して細胞内区画に捕捉しているタンパク質を解放するツールである LOVTRAP を併用した光活性化転写制御因子コンストラクトを作製し、光による核移行制御を目指した。まず、作製したコンストラクトの光依存性の細胞内局在変化を共焦点顕微鏡により調べた。その結果、暗状態では、光活性化コンストラクトは LOVTRAP の捕捉区画として設定した細胞膜に局在していたが、青色光照射によって、核に移行する様子が観察された。さらに、再び暗状態に戻すことで、細胞膜へと局在することが確認できた。結論として、光活性化転写制御因子を開発することができた。しかし、他の研究グループから、同じようなコンセプトの光活性化転写制御因子が報告されてしまったことから、さらなる性状解析を中止した。

3. 今後の展開

本さがけ研究において、Pcdh や N-カドヘリンの蛍光プローブの開発に成功した。しかし、開発しただけでは生命現象に迫ることはできない。今後は、開発した蛍光プローブを使用して、生命現象における細胞接着タンパク質が仲介する細胞接着の意義を明らかにしたいと考えている。具体例を 1 つ記す。Pcdh は神経細胞の形態形成に関与することが報告されている。その分子基盤は、Pcdh が非受容体型チロシンキナーゼ Pyk2 の活性を抑制することで、樹状突起の枝分かれやスパインの形状(数と長さ)を正に制御するという文脈として記述される。Pcdh の接着活性と Pyk2 活性の相関関係は不明であることから、Pcdh の蛍光プローブと同時に使用できる Pyk2 の蛍光プローブを開発して、神経細胞の形態形成における Pcdh と Pyk2 活性の同時イメージングを行いたいと考えている。Pyk2 の蛍光プローブ開発から、神経細胞における同時イメージングまでを、次の 5 年をかけて行う計画である。

4. 自己評価

本さがけ研究期間において開発した蛍光プローブに関する論文を 4 本発表することができた。論文発表というアウトプットはもちろん重要ではあるが、蛍光プローブ開発だけにとどまっている印象が強く、生命現象にあまり迫れていなかったと感じている。技術開発だけでなく、もっと生命現象に迫るようなイメージングをすべきであった。この反省を今後の研究計画に役立てたい。また、3 種類の光活性化ツールの開発を計画していたが、実際に開発できたのは 1 つのみであった。開発できたツールに関しても、他研究グループが同様のコンセプトのツールを論文として発表してしまったため、中止せざるを得なくなった。計画が凡庸であったのか、研究の進め方が良くなかったのかを、省みる必要がある。3 年半というさがけ研究期間において、筆頭著者論文を 4 本(うち 1

本は責任著者)というのは、客観的に見て悪くはないと感じている。それ故、本さがけ研究における問いの設定や研究遂行方針に関してさらなる省察を加えることで、将来新たな学問を切り拓いていくようなバケモノ級研究者になるのも夢ではないかもしれないと感じている。そうなれるように努力したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. Hoshino, N., Kanadome, T., Takasugi, T., Itoh, M., Kaneko, R., Inoue, YU., Hirabayashi, T., Watanabe, M., Matsuda, T., Nagai, T., Tarusawa, E., and Yagi, T. Visualization of *trans* homophilic interaction of clustered protocadherin in neurons. Proc. Natl. Acad. USA (2023) Vol. 120, No. 38, pp. e2301003120.

細胞接着タンパク質であるクラスター型プロトカドヘリン(Pcdh)は、シナプスに置いては相互作用しないが、シナプス外では相互作用する傾向があることを明らかにした。これまで神経細胞で Pcdh の相互作用を可視化する手法は限られていたが、本研究において、FRET 現象に基づく蛍光プローブを開発することで、神経細胞における Pcdh の相互作用を定量的に評価することが可能になった。

2. Kanadome, T., Hoshino, N., Nagai, T., Yagi, T., and Matsuda, T. Visualization of *trans*-interactions of a protocadherin- α between processes originating from single neurons. iScience (2023) Vol. 26, No. 7, pp. 107238.

細胞接着タンパク質であるクラスター型プロトカドヘリン(Pcdh)は、同一神経細胞から伸展する突起間において相互作用することで、神経細胞の自己認識に関与することが想定されている。本研究では、Pcdh の細胞接着活性を単一色で検出可能な蛍光プローブを開発し、同一神経細胞に由来する神経突起間における Pcdh の相互作用を可視化した。これまで、異なる細胞間の相互作用は可視化されてきたが、同一細胞に由来する突起間の相互作用を可視化する方法がなかった。自己認識の検出につながる蛍光プローブは本研究が初である。

3. Kanadome, T., Hayashi, K., Seto, Y., Eiraku, M., Nakajima, K., Nagai, T., and Matsuda, T. Development of intensimetric indicators for visualizing N-cadherin interaction across cells. Commun. Biol. (2022) Vol. 5, No. 1, pp. 1065.

発生から高次脳機能に関与する細胞接着タンパク質 N-カドヘリンの相互作用を単一色で検出する蛍光プローブを開発した。これまで細胞間相互作用を可視化する蛍光プローブは split-GFP という技術に基づいていた。split-GFP は不可逆であるため、細胞間相互作用の会合は可視化できるが、解離をモニターすることができなかった。本研究では、可逆的な ddGFP という特殊な蛍光タンパク質を利用することで、N-カドヘリンが仲介する細胞間相互作用の会合だけでなく、解離もモニターできるようになった。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

(ポスター発表)京卓志、永井健治、松田知己「N-cadherin 相互作用可視化のためのインジケータ開発」第30回日本バイオイメージング学会学術集会 2022年

【著作物】

京卓志、永井健治、松田知己「蛍光タンパク質プローブによる細胞間相互作用の可視化」(医学のあゆみ 生体イメージングの最前線—絶え間ない技術革新と生命医科学の新展開) 医歯薬出版株式会社 2023年 286巻5号 329-335.

【プレスリリース】

「蛍光センサーIPADを新開発—神経細胞の「自己認識」を世界で初めて可視化—」
2023年7月18日

「蛍光センサーINCIDERを新開発—生きた細胞の細胞接着タンパク質N-cadherin間の相互作用を可視化—」
2022年12月15日