

研究課題別評価

1 研究課題名: 生きたマウスにおけるがん遺伝子産物活性化の観察

2 研究者氏名: 大場 雄介

3 研究の狙い:

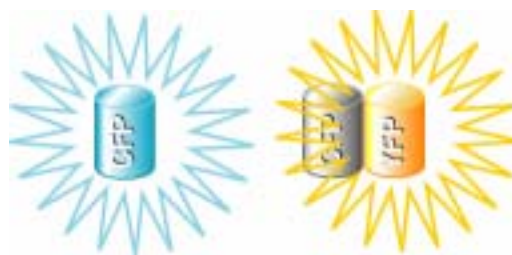
生体内において細胞の増殖、分化、物質の合成や分泌など多くの生理現象は、複雑かつ巧妙なネットワークから形成される「細胞内シグナル伝達」により制御されている。実際その破綻は癌や免疫疾患の原因となる。したがってこの複雑なネットワークは厳密に調整される必要があるが、その制御メカニズムの根幹はシグナル伝達分子の時空間的制御にあると考えられる。本研究では蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) の原理に基づくプローブ分子を用いた可視化技術を利用して、生きた細胞と生きた個体における分子の活性化や分子間相互作用に関する時空間的情報を得る

ことにより、細胞内シグナル伝達の時空間的ダイナミクスを解明する。また、ここから明らかになった事実をもとに、疾患の分子メカニズムと病態生理学的な細胞内シグナル伝達機構の役割についての理解を深め、難治性疾患の予防や治療に応用する未知を切り開きたい。

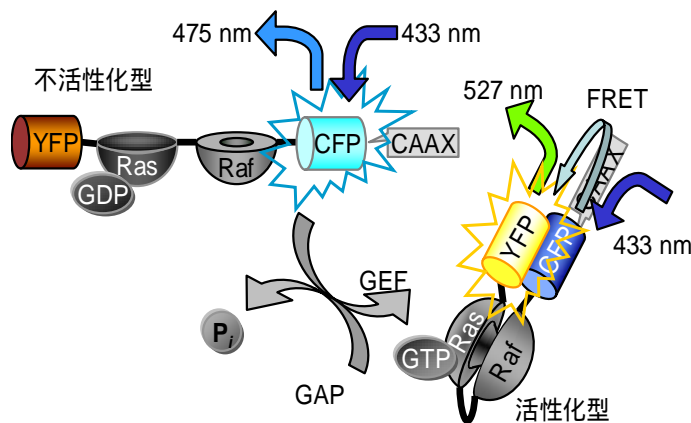
4 研究成果:

Ras 蛋白質活性化の時空間的制御機構の解析

分子内 FRET プローブ分子を利用した Ras と Rap1 の活性化モニター分子を開発・改良し、増殖因子依存性の時空間的活性化機序を解析した。アフリカミドリザル由来の Cos-1 細胞に、Ras と Rap1 の活性化プローブ分子を発現させ、上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor, EGF) で刺激して活性化の局在を経時的に観察した。その結果両者共に EGF で活性化するが、活性化の強さは細胞内で均一ではなく、細胞の辺縁がより強く活性化し、中心部では低いという、勾配が存在することがわかった。そこで、この活性化の勾配の形成機序について研究を進めた。既に報告があるすべての Ras や Rap1 の活性化因子を共発現したところ、いずれの場合にも活性化の局在は変化しなかった。一方、モニター分子に変異を導入し、不活性化因子である GTPase-activating protein, GAP) への感受性を低下させたところ、活性化勾配が Ras も Rap1 ともに野生型の場合とは異なるパターンを示した。したがって、この活性化の勾配は GAP が制御していることが示唆された。実際に細胞内の GAP 活性に勾配が存在することを、画像データと反応速度論



FRET の原理 CFP 単独の時には CFP を励起すると CFP の蛍光が観察される。CFP と YFP が近接する時は CFP の励起エネルギーが YFP に遷移し、CFP の代わりに YFP の蛍光が観察される。

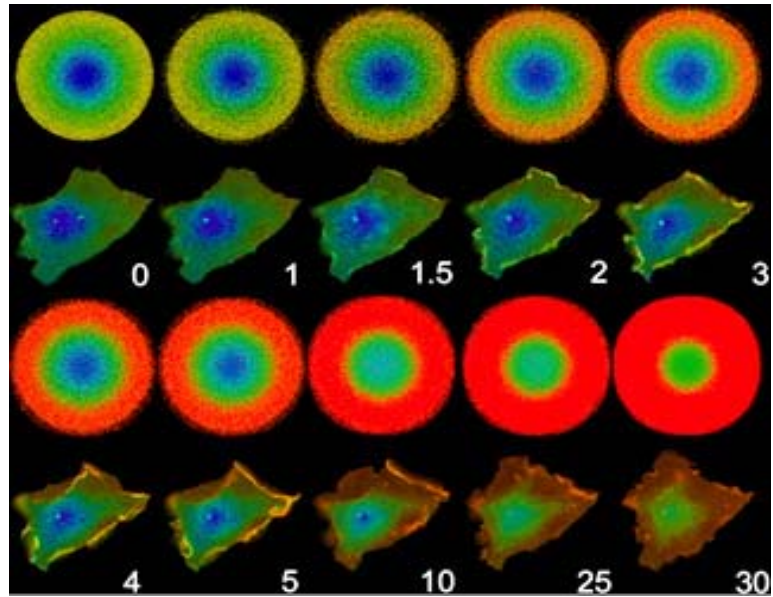


的解析の融合という新しい手法により証明した。またこの解析によって明らかになったパラメータを元に、コンピュータ上に仮想の細胞を再構成した。

生きた個体レベルでのイメージング

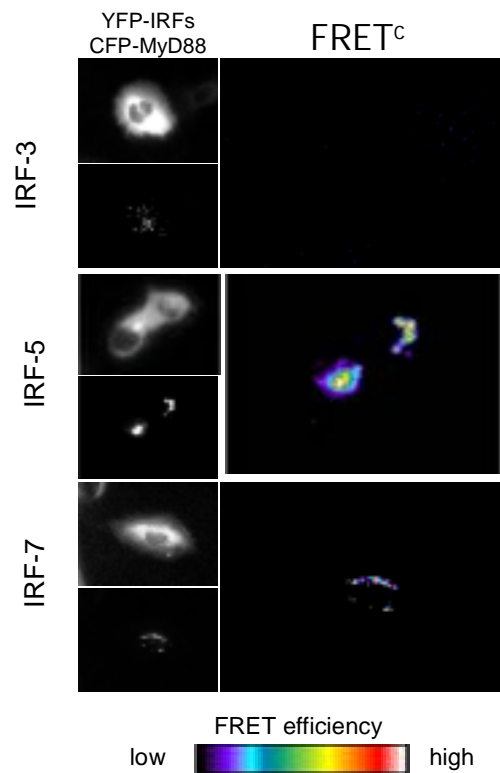
小型魚類であるゼブラフィッシュを用いて、生体内における 1 細胞レベルでのイメージングに成功した。特に原腸陥入時に見られる細胞移動時における Rho ファミリー蛋白質の活性化を観察し、Rho の活性化が発生初期胚での細胞運動に必須であること、活性と移動速度に相関があることを見出した。細胞一つに

注目した場合、Rho の活性は細胞の形態変化に伴い上昇すること、すなわち葉状に細胞膜が伸展する部位で特異的に高いことが明らかとなった。Rac の活性は細胞の進行方向で有意に高かったものの、Cdc42 の活性と細胞の形態の間には相関が認められなかった。



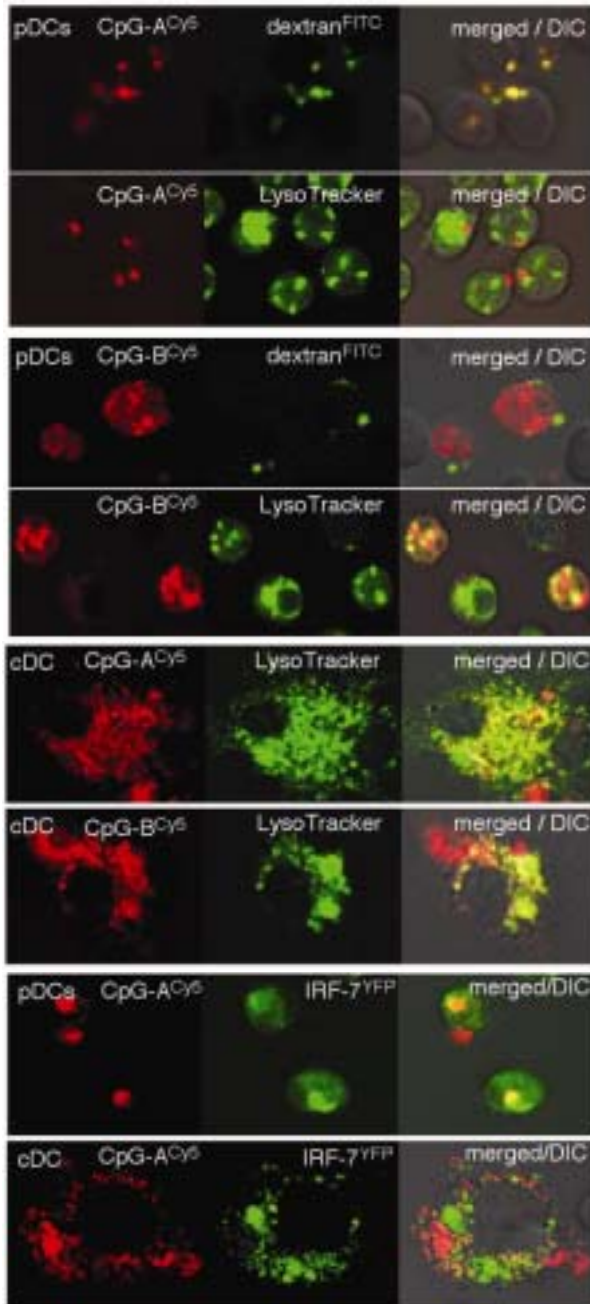
EGF 依存性の Ras 活性化の経時変化とモデル細胞

分子間 FRET を利用した免疫系シグナル伝達の時空間的解析

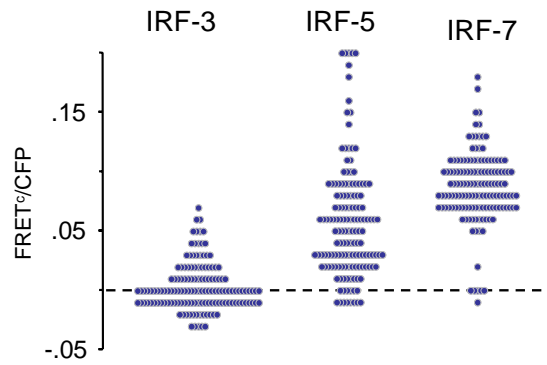


分子間 FRET による MyD88 と IRF ファミリー結合の可視化

分子間 FRET を利用して免疫系シグナル伝達の蛋白質間相互作用の時空間的ダイナミクスの解明を試みた。自然免疫と獲得免疫はインターフェロン (interferon, IFN) を初めとするサイトカイン産生を介してつながっている。そこで自然免疫発動に重要な Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) の下流で働くアダプター分子 MyD88 と、IFN 産生に必須の Interferon regulatory factor (IRF) ファミリーのうち、IRF-3、IRF-5、IRF-7 の相互作用に注目



pDC と cDC における核酸とシグナル分子の局在 Dextran、LysoTracker はそれぞれエンドソームとリソソームのマーカー

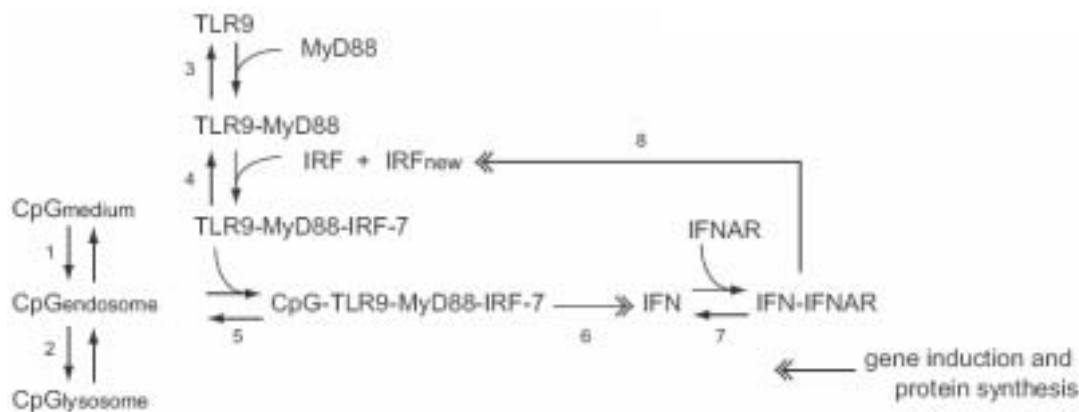


した。両者に蛍光蛋白質タグをつけて培養細胞に発現させると、IRF-5 と IRF-7 のみが細胞質内の顆粒状構造をとる MyD88 と共局在し、分子間 FRET や免疫共沈法により両者の結合が確認された。IRF-5 と IRF-7 は TLR9 のリガンドである非メチル化 DNA の刺激により、MyD88 依存性に核移行し、転写活性が増加した。MyD88 に同じように結合し活性化する IRF-5 と IRF-7 が類似の機能を呈するかどうかを調べるために、IRF-5 と IRF-7 の欠損マウスを作製し、そこから樹状細胞 (dendritic cell, DC) を採取し非メチル化 DNA 刺激によるサイトカイン産生を定量した。

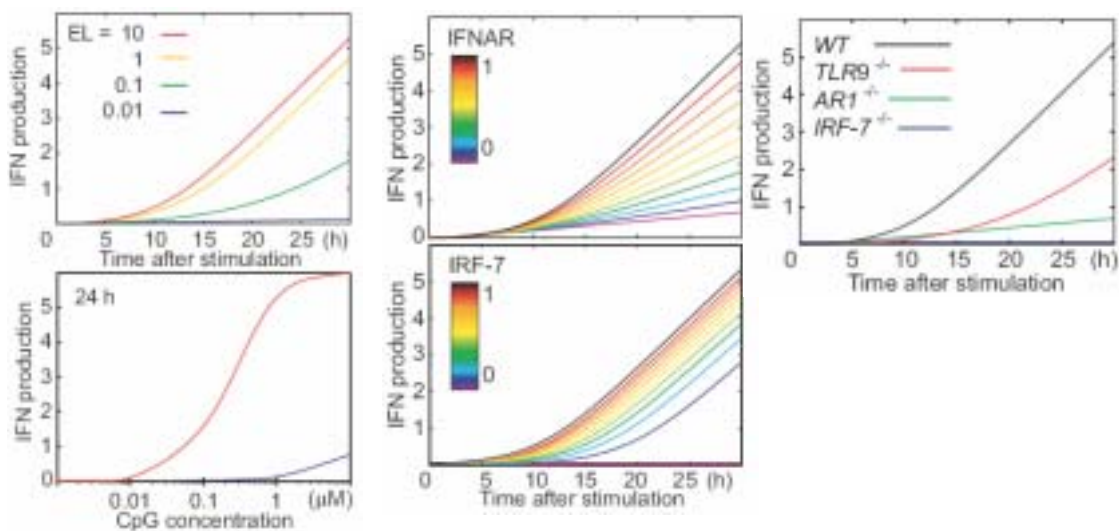
興味深いことに、IRF-5 は炎症性サイトカインの産生に、一方の IRF-7 は IFN の産生に必須であり、互いに他の産生には影響を与えなかった。実際、IRF-7 と IRF-5 は共に MyD88 が形成する顆粒状構造に共局在するものの、両者間に FRET は検出されないために、MyD88-IRF-5、MyD88-IRF-7 は別々の複合体を形成し、効率よく、かつ独立したシグナル伝達経路を担っているものと考えられた。

核酸-シグナル伝達分子の時空間制御による IFN 産生の誘導機構の解析

非メチル化 DNA 刺激した DC による IFN 産生には二つの特徴がある。一つはプラズマ細胞様 DC (plasmacytoid DC, pDC) が多量のインターフェロンを産生



エンドゾームでの DNA 刺激による IFN 産生経路の模式図



IFN 産生のシミュレーション

(左上) 核酸の局在による IFN 産生経時変化の差異 (EL=10 がエンドゾームへの局在を示す)。 (左下) 核酸の局在による濃度依存的な IFN の産生。 (中上) IFN 受容体の発現量によるインターフェロン産生経時変化の差異。 (中下) 定常状態の IRF-7 の発現量による IFN 産生経時変化の差異。 (右) 各分子欠損細胞における IFN 産生の経時変化。

可能であるのに対し、通常の DC (conventional DC, cDC) からの IFN 産生はごく少量である。もう一つは非メチル化 DNA のうち、CpG-A といわれるものは多量の IFN を産生するが CpG-B はごく少量の産生に留まることである。この多量の IFN 産生は、ロックアウト細胞を用いた実験から MyD88-IRF-7 経路に完全に依存することが判明した。そこでこの産生に至る機序を探るために、蛍光分子でラベルした非メチル化 DNA の挙動を観察したところ、pDC における CpG-A のみがエンドゾームに非常に長い時間 (5 時間以上) 局在することがわかった。一方の pDC における CpG-A あるいは cDC における両者の核酸は刺激後速やかにリソソームに輸送される。このことからエンドゾームがシグナル伝達の場合であり、ここに核酸が長時間局在することが多量の IFN を産生する必要条件であることが示唆された。実際に pDC や他の細胞株において、MyD88-IRF-7 複合体もエンドゾームに局在する。そこで、上記の仮説を検証するために、細胞内の核酸輸送に対して人為的に変調することを試みた。ある種のカチオン性脂質は DNA と複合体を形成し、DNA を長時間エンドゾームに貯留させる効果を有することが報告されている。そこで、DNA をカチオン性脂質との複合体を形成させた後細胞に投与させたところ、cDC において CpG-A が長時間エンドゾームに

滞在した。同一条件下で IFN 産生を測定したところ、興味深いことに pDC と同程度の IFN 産生が認められた。また pDC においては CpG-A のみならず CpG-B さえもカチオン性脂質と複合体を形成させることにより、エンドゾームへの局在が観察された。この動態は CpG-B の濃度依存性があり、エンドゾームに長期停滞する場合のみ IFN の産生が認められた。以上の結果より、エンドゾームが多量の IFN 産生に帰着するためのシグナル伝達を行う場であり、そこに核酸が長期にわたって局在することが必要であることが示された。

本研究の結果はこれまで pDC が大量の IFN を産生できる理由、すなわち pDC においては定常状態の IRF-7 の発現量が高いという定説に相反するものであった。実際に定常状態の IRF-7 の発現量の違いによって IFN の大量産生に違いが起らないかどうかを検証するために、今回明らかになった経路に対してシミュレーションを行った。このモデルは得られた結果をよく反映していることを確認してある。その結果、IFN の大量産生には、刺激前の IRF-7 の発現量はあまり関係なく、むしろ IFN 受容体刺激とそれによる IRF-7 の新規産生というポジティブフィードバックが重要であることがわかった。実際に IFN 受容体欠損細胞では初期の少量の IFN 産生は認められるものの、大量産生には至らないことが実験的にも示された。また本シミュレーションの結果を通して、pDC には少なくとも二つの未知の因子が存在することが示された。

5 自己評価:

さきがけ研究期間内で得られた成果は、細胞レベルの解析については当初の目標をある程度達成し、さらに反応速度論を取り入れた解析など、予想を越えた発展をすることができた。これらの結果の一部は実際の個体内での反応を再現するものもあり、今後の発展も期待できる。実際の個体内でのイメージングは魚類ではある程度系に乗ったものの、マウスでは技術的な課題も多く、成果を発表するまでには至らなかった。さきがけ研究で得られた知見を元にさらに発展させて、今後成果として発表できるように努力したい。

6 研究総括の見解:

FRET を原理とするプローブ分子を用いた可視化技術を RAS 蛋白質の活性化の様子を培養細胞で、Rho ファミリー蛋白質の発生過程での活性化をゼブラフィッシュの個体レベルで、また、培養細胞内でのインターフェロンの産生ならびにその制御の様子を可視化する成果を挙げている。当初の目的であった動物個体における分子の動態を可視化するまでには至らなかったが、今後の発展に期待する。

7 主な論文等:

論文

1. Honda, K.^{*}, Ohba, Y.^{*}, Yanai, H.^{*}, Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., Taniguchi, T.: MyD88-IRF-7 signalling pathway for robust type-I interferon induction is contingent on spatiotemporal regulation. *Nature*, in press (2005). [^{*}These authors contributed equally to this work]
2. Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T., Taniguchi, T.: Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434(): 243-249. (2005)
3. Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, X., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., Taniguchi, T.: Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(43): 15416-15421. (2004)
4. Miyagi, C., Yamashita, S., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Matsuda, M., Hirano, T.: STAT3 noncell-autonomously controls planar cell polarity during zebrafish convergence and

- extension. *J. Cell Biol.* 166(7): 975-981. (2004)
5. Yoshizaki, H., Ohba, Y., Parrini, M. C., Dulyaninova, N. G., Bresnick, A. R., Mochizuki, N., Matsuda, M.: Cell Type-specific Regulation of RhoA Activity during Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279(43): 44756-44762. (2004)
 6. Takaya, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M.: RalA Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. *Mol. Biol. Cell* 15(6): 2549-2557. (2004)
 7. Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R. E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K., Matsuda, M.: Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162(2): 223-232. (2003)
 8. Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M.: Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* 22(4): 859-869. (2003)

その他

1. 大場雄介, 松田道行: がん遺伝子産物 Ras の情報伝達とその可視化。生化学 76(1): 16-28. (2004)
2. 大場雄介: FRET イメージングと画像解析による細胞内情報伝達の時空間的解析。第 1 回 Live Cell Imaging 研究会 (2004; 東京)
3. 大場雄介: FRET を用いた細胞内情報伝達のイメージング。第 26 回日本分子生物学会 (2003; 神戸)
4. Y. Ohba, K. Kurokawa and M. Matsuda: Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. Keystone Symposium 2003, Optical Imaging: Applications to Biology and Medicine (2003; Taos, NM, USA)
5. 大場雄介, 松田道行: Ras ファミリー蛋白質の時空間制御機構。第 25 回日本神経科学会 (2002; 東京)