

# 広橋細胞形象プロジェクトの研究成果

## 目次

1. 走査型光 CT 顕微鏡 —3次元観察のできる顕微鏡— . . . . . 2
2. 高速多検体 in situ hybridization system の構築とその応用 . . . . . 3
3. GFP-fusion cDNA ライブラリーを用いた細胞内局在蛋白質の解析 . . . . . 4
4. 発生過程における細胞の形態変化を引き起こす遺伝子の単離  
および構造・機能の解析 . . . . . 6
5. Differential display 法によるヒト大腸菌由来培養細胞における  
形態・遊走能を規定している遺伝子群の解析 . . . . . 8
6. 異なる細胞形質を示す大腸がん細胞株における発現遺伝子の解析 . . . . . 10
7. 化学架橋剤を用いた in vivo での細胞表面タンパク質相互作用の解析 . . . . . 11
8. 消化管平滑筋の分化を調節する新規分子の単離 . . . . . 12
9. ショウジョウバエ・細胞外マトリックス成分の大量調整法の確立とその細胞  
—マトリックス間相互作用解析への応用— . . . . . 14

## 1. 走査型光 CT 顕微鏡 —3次元観察のできる顕微鏡—

切断せずに生物試料の内部構造を見る

### 研究成果の概要

非蛍光性の顕微試料を光学顕微鏡を用いて3次元観測するために、光CT法を提案し、本手法を走査型顕微鏡において実現した走査型光CT顕微鏡を試作した。

光CT法は、クリアランスに制限を受けるため試料を回転させることが難しい顕微鏡下において、CT計測を行なえるよう工夫した手法である。検出器の位置を変えることで、試料を固定したまま観測角度の異なる投影像が得られる。(図1、2)

複数枚の投影像に逆投影演算処理を施すことにより3次元の再構成像が得られる。観測例としてヒトの肝臓の再構成像をステレオ表示したものを示す。(図3)

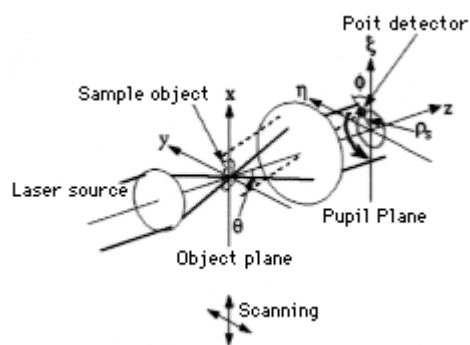


図1 走査型光CT検出法

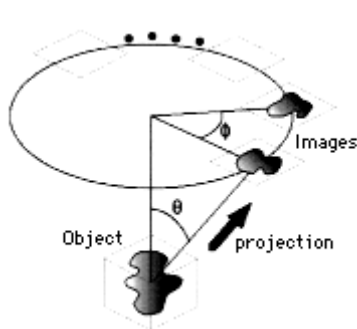


図2 光CTの等価図

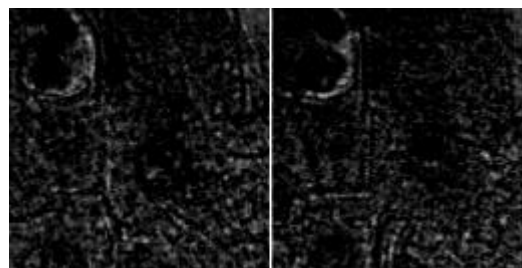


図3 再構成分布のステレオ表示(ヒトの肝臓)

### 研究のニーズ、シーズ、用途など

- 1) 細胞の形態の特徴を利用した自動弁別
- 2) 生体試料の形態変化の時間的観測
- 3) 共焦点走査型顕微鏡との共用化

### 報告書他

- 1) 埜田、広橋、走査型光CT顕微鏡 —原理と装置—、レーザ顕微鏡研究会第18回講演会論文集,15(1996).
- 2) 埜田、広橋、走査型光CT顕微鏡 —再構成手法—、レーザ顕微鏡研究会第20回講演会論文集,54(1997).
- 3) 埜田、広橋、CT顕微鏡、日本光学会光計測研究グループ研究会、会誌No.14,37(1997).
- 4) 埜田、光CT顕微鏡における逆問題、日本学術振興会公開シンポジウム、1998.

〔研究者名〕埜田 友也

## 2. 高速多検体 *in situ* hybridization system の構築とその応用

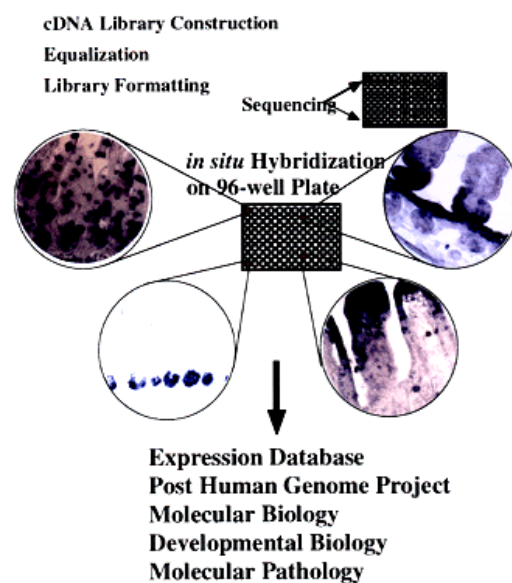
高速多検体 *in situ* hybridization 法を考案した。これにより組織中で部域・細胞特異的に発現している遺伝子を網羅的に単離することが出来るようになった。

### 研究成果の概要

組織切片を 96 穴のプレートに接着することによって高速で多検体の抗体反応や *in situ* hybridization を行うことが出来るようになった。後者においてはプローブのソースとなる cDNA ライブラリーを均一化し重複した遺伝子を除外することによってスクリーニングの効率化を行った。このシステムをマウス小腸に適用し、部域・細胞特異的発現を示す遺伝子を多数単離した。

(図)

### Large-Scale *in situ* Hybridization System



### 成果可能なシーズ、用途等

- 1) 医学、分子病理学、特に癌組織等病理組織における関連遺伝子の単離・同定。
- 2) ポストヒトゲノムプロジェクトの Expression database の構築。

### 特許出願

なし

### 報告書

- 1) Tohru Komiya, Toko Tanigawa, Shohei Oda, and Setsuo Hirohashi. Large-scale immunohistological staining using polyethylene glycol-embedded sections mounted on 96-well plates for monoclonal antibody screening. *Analytical Biochem.*251, 158-162 (1997)
- 2) Tohru Komiya, Yoko Tanigawa and Setsuo Hirohashi. A large-scale *in situ* hybridization system using an equalized cDNA library. *Analytical Biochem.*254, 23-30 (1997)
- 3) Tohru Komiya, Yoko Tanigawa and Setsuo Hirohashi. Cloning of the novel gene *intelectin*, which is expressed in intestinal paneth cells in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press

### 3. GFP-fusion cDNA ライブラリーを用いた細胞内局在蛋白質の解析

自家蛍光性の蛋白質 GFP (Green Fluorescent Protein) を分子タグとして利用した cDNA Library 中の各クローンを独立な状態のまま調整後、遺伝子導入して観察することによって、細胞内で局在する蛋白質を効率良く screening 出来る手法を開発し、細胞内移行シグナル配列の解析、および新規局在蛋白質の探索を行った。

#### 研究成果の概要

GFP との融合蛋白質が形成されるような発現 cDNA ライブラリーを作成し(pCI-GFP ベクター:図 1)、このライブラリー中の各クローンを 96 穴の glass filter microtiter plate と飽和濃度のヨウ化カリウム溶液を利用して高品質・高収量に調整できるような方法を開発した。この方法で調整したプラスミドサンプルは、培養細胞へと遺伝子導入し蛍光観察を行うことで、スクリーニングレベルの局在の検定が効率良く、短期間で実施可能になった。実利的利用例として、移行シグナルの解析や新規局在蛋白質のスクリーニングを高効率で行った (図 2)。

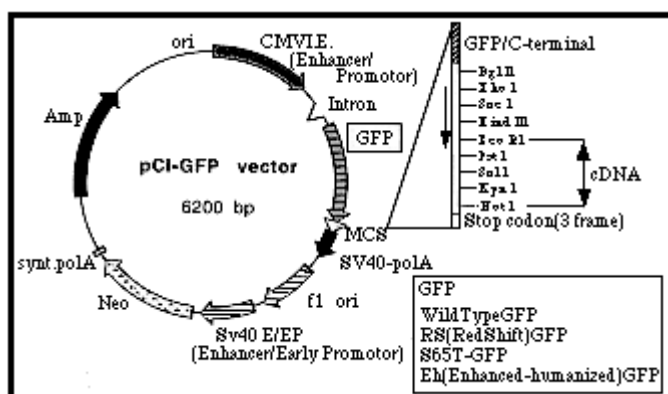


図 1 pCI-GFP ベクター  
各種 GFP を組み込み細胞内での発現を効率よく起こさせるように工夫した遺伝子導入用プラスミドベクター

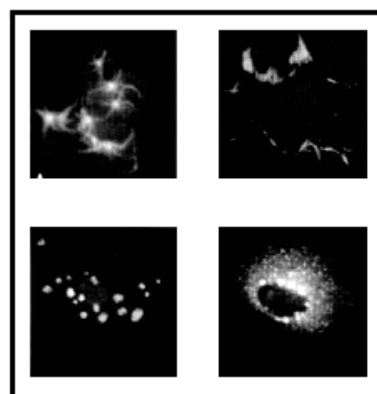


図 2 さまざまな細胞内局在  
GFP によって蛋白質が光っている

#### 成果展開可能なシーズ・用途等

- 1) 細胞内局在シグナル配列の解析/予想
- 2) 新規細胞内局在蛋白質の探索
- 3) 薬剤などの細胞内局在配送 (Micro DDS)
- 4) ポストゲノムプロジェクト

#### 特許出願

なし

## 報告書他

- 1) Gen Fujii, Remi Tsuchiya, Eiri Ezoe, Hiroyuki Komazawa, and Setsuo Hirohashi Rapid extraction of transfection-grade plasmid DNA in a 96-well format using potassium iodide. Biochemical & Biophysical Research Communication, submitted
- 2) Gen Fujii, Remi Tsuchiya, Eiri Ezoe, and Setsuo Hirohashi. Analyses of Nuclear Localization Signals using GFP-fusion protein library. Experimental Cell Research, submitted
- 3) 藤井 元、土屋 礼美、広橋 説雄. GFP 融合 cDNA ライブラリーを用いたタンパク質核局在性の解析. 第 20 回分子生物学会年会講演要旨集、1-510-P-624 (1997)
- 4) 藤井 元、小宮 透、広橋 説雄. 細胞形象の分子生物学的解析. 日本病理学会会誌、Vol.87, pp240 (1998)
- 5) Gen Fujii, Remi Tsuchiya, Eiri Ezoe, Hiroyuki Komazawa, and Setsuo Hirohashi. Screening and characterization of proteins showing specific localization with GFP-fusion library. Cell Structure and Function, Vol.23, Supplement, pp138 (1998)

〔研究者名〕 藤井 元、土屋 礼美

#### 4. 発生過程における細胞の形態変化を引き起こす遺伝子の単離および構造・機能の解析

ショウジョウバエの初期発生過程において細胞の形態変化を引き起こすと考えられる *fog* および *cta* 遺伝子の脊椎動物における相同遺伝子の探索を通じて、細胞形態変化の遺伝的背景を探ろうと試みた。

##### 研究成果の概要

発生過程において細胞の形態変化を引き起こす遺伝子として *fog* (*folded gastrulation*), および *cta* (*concertina*) という 2 つの候補遺伝子がショウジョウバエにおいて単離されていたため、脊椎動物アフリカツメガエルよりこの相同遺伝子の単離を試み、関連遺伝子を複数個単離したので、その構造および機能の解析を行った。

単離遺伝子の一つとして、転写調節アダプター蛋白質 p300/CBP 遺伝子が得られた。この遺伝子の全長を単離し、その構造・発現を解析し(図 1)、発現と細胞形態変化との関連性を示した。さらにこの遺伝子の機能欠陥変異体が初期発生過程において神経幹の不閉・体幹部の収縮という現象を引き起こすことを初めて見いだした(図 2)。

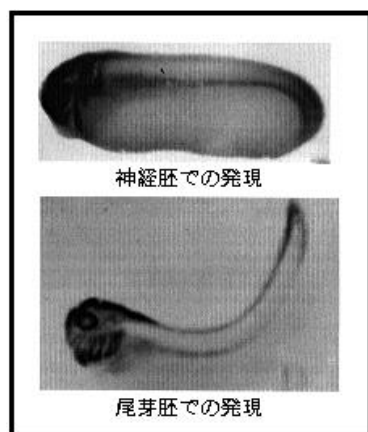


図1 ツメガエル p300/CBP の発現  
この遺伝子の mRNA が初期発生過程において特異的に発現している部位を分子生物学的手法で染め出している。

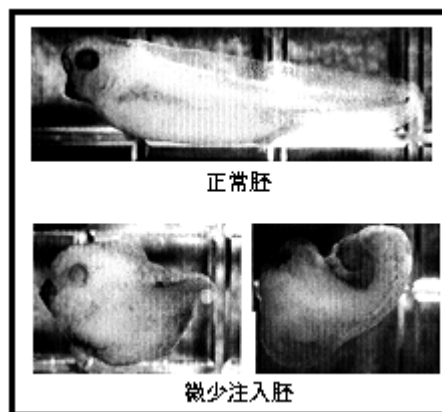


図2 機能欠陥変異体の微少注入  
この遺伝子の機能欠陥変異体を受精卵に微少注入することで胚の形態がおかしくなっている。

##### 成果展開可能なシーズ・用途等

- 1) 細胞形態変化における遺伝的背景と分子的機序の解明
- 2) 細胞形態変疾患(がんなど)における原因の究明と治療・予防

##### 特許出願

なし

## 報告書他

- 1) Gen Fujii, Remi Tsuchiya, Yuzuru Itoh, Kosuke Tashiro, and Setsuo Hirohashi. Molecular cloning and expression of Xenopus p300/CBP. *Biochimica Biophysica Acta*, in press
- 2) 藤井 元、土屋 礼美、広橋 説雄. ツメガエル初期発生期における  $G\alpha i1$  の発現および機能の解析. 第 69 回日本生化学会・第 19 回日本分子生物学会合同年会講演要旨集、pp676 (1996)
- 3) 土屋 礼美、藤井 元、広橋 説雄. ツメガエル Transcriptional adaaptor protein p300 遺伝子の構造と発現. 第 69 回日本生化学会・第 19 回日本分生物学会合同年会講演要旨集、pp676 (1996)

〔研究者名〕 藤井 元、土屋 礼美

## 5. Differential display 法によるヒト大腸癌由来培養細胞における形態・遊走能を規定している遺伝子群の解析

細胞の特性を規定している遺伝子群の探索を行い、遺伝子を多数単離することができた。

### 研究成果の概要

細胞の形態差や遊走能を規定している遺伝子群の探索を目的としてディファレンシャル・ディスプレイ法を行った。群間ごとに差を認める遺伝子断片を多数単離した。その中の幾つかは全長を決定し、C群で発現の減弱する clone80 については、遺伝子導入を行い、局在の確認を行った。(表1、図1、図2)

表1 用いた大腸癌由来細胞株の形質

	細胞株	スフェロイド形成能 (突起形態)	コロニー形状	遊走因子	組織系 (皮下注腫瘍形成時)	肝での 造腫瘍性	肝転移性 同所移植時	肺転移性 同所移植時	腹膜転移 性腹腔内 注入時
A.	HT-29	+	球形	HGF	中分化腺癌	+	++	++	±
	WiDr	+	球形	HGF	中分化腺癌	+	+	+	++
	SW116	+	球形	HGF	高分化腺癌	+	+	-	++
B.	HCT-15	+	多角形	LPA	中分化腺癌	+	±	+	+++
	CO33	+	多角形	LPA	中分化腺癌	+	±	+	+++
	CO34	+	多角形	LPA	中分化腺癌	+	±	+	+++
C.	COLO-201	-	浮遊	-	低分化腺癌	-	-	+	+
	COLO 205	-	浮遊	-	低分化腺癌	-	-	+	++
	CO31	-	多角形	-	低分化腺癌	-	-	+	++
	CO35	-	クラスター形成	-	低分化腺癌	-	-	+	+

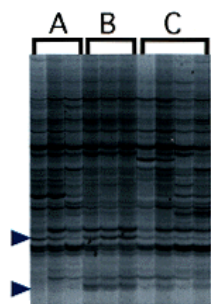


図1 発現の差を認めるディファレンシャル・ディスプレイのバンドの一例

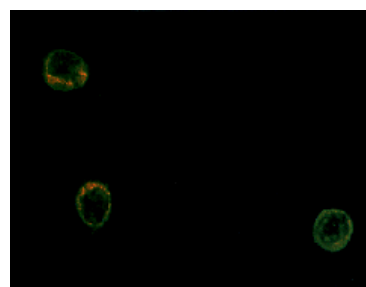


図2 遺伝子導入を行った clone80 の免疫組織化学染色(HA polyclonal 抗体)



### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 遺伝子の発現量による癌の特異性の理解、診断。
- 2) 発現のコントロールによる治療への応用。

### 特許出願

なし

### 報告書他

- 1) 江副 英理, 駒澤 宏幸, 藤井 元, 織笠 敦, 下山 豊, 坂元 亨宇, 落合 淳志, 広橋 説雄.  
(1996) Differential display 法によるヒト大腸癌由来培養細胞における形態・遊走能を規定している遺伝子群の解析. 第 56 回日本癌学会総会
- 2) 江副 英理. (1997) 大腸癌由来培養細胞株で発現の差異を認める遺伝子群の DD 法による解析:腹膜転移性との関連. 第 51 回日本消化器外科学会総会
- 3) 江副 英理. (1997) ヒト大腸癌由来培養細胞における形態・遊走能、転移性を規定している遺伝子群の DD 法による解析. 第 98 日本外科学会総会

## 6. 異なる細胞形質を示す大腸がん細胞株における発現遺伝子の解析

ディファレンシャルディスプレイ法を用い、ヒト大腸がん培養細胞の細胞形態、遊走能に関連する遺伝子の解析を行い多数の遺伝子を単離した。

### 研究成果の概要

ヒト大腸がん培養細胞の細胞形態、遊走能に関連する遺伝子の解析を目的として、ディファレンシャルディスプレイ法を用い、異なる細胞形質を示す細胞群間で発現量の異なる遺伝子を単離した。

特徴の有る cDNA について、全長を決定した。K-43 については、遺伝子導入を行い、局在の確認を行った。(図 1、図 2、図 3)

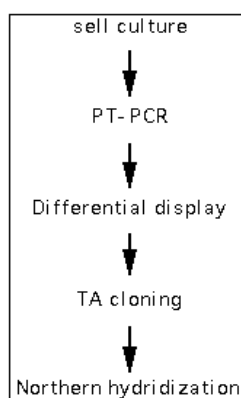


図 1 発現遺伝子の解析手順

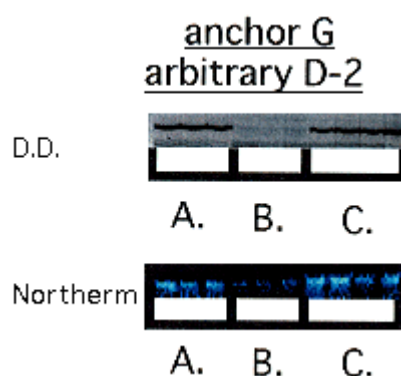


図 2 発現に差のある遺伝子のディファレンシャルディスプレイ (D.D.) およびノーザンハイブリダイゼーションのバンド例

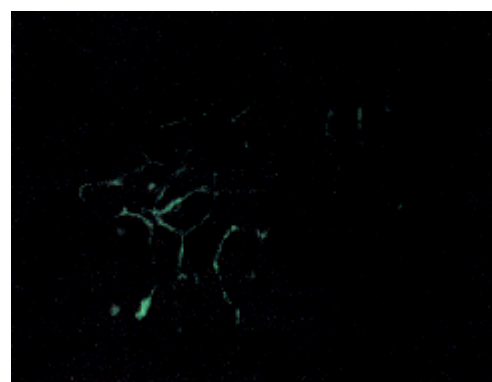


図 3 FLAG 標識した K-43 遺伝子を導入後の免疫組織化学染色

### 成果展開可能なシーズ、用途等

1) がんの発現遺伝子を指標とした分子病理診断や、がん細胞形質の理解。

### 特許出願

なし

### 報告書他

1) 江副 英理, 駒澤 宏幸, 藤井 元, 織笠 敦, 下山 豊, 坂元 亨宇, 落合 淳志, 広橋 説雄. (1996) Differential display 法によるヒト大腸癌由来培養細胞における形態・遊走能を規定している遺伝子群の解析. 第 56 回日本癌学会総会 P.177.

〔研究者名〕 駒澤 宏幸

## 7. 化学架橋剤を用いた in vivo での細胞表面タンパク質相互作用の解析

生細胞表面上での様々なタンパク質間相互作用を簡便に解析する系を確立した。

### 研究成果の概要

実際の細胞表面上での、様々な受容体、接着分子間の相互作用の変化を解析する事を目的として、直接、化学架橋剤を作用させて、相互作用している分子を捕捉して、生化学的な解析を可能にした(図)。この系により、in vitro の実験系や理論的に予想されていた細胞間接着分子カドヘリンの二量体構造が実際に細胞表面上で機能する事を実証した。

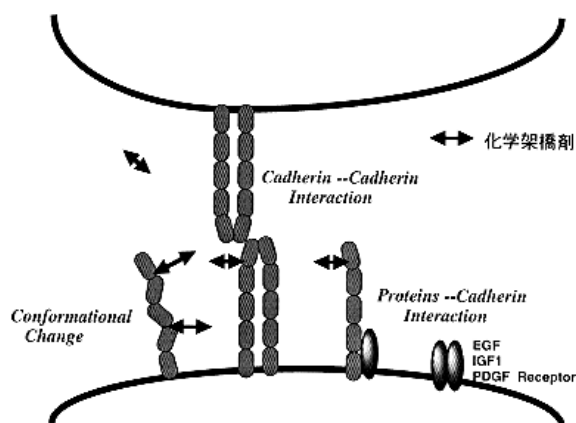


図 化学架橋剤による解析系の概念図

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 生細胞表面で既知の分子と相互作用する未知の分子を捕捉、同定する事が可能である。
- 2) in vitro でしか解析できなかった、タンパク質間相互作用を、細胞全体の生理的变化、時間軸に沿って簡便に解析可能である。

### 特許出願

特になし

### 報告書他

- 1) Hiroshi Takeda, Akira Nagafuchi, Yutaka Shimoyama, Setsuo Hirohashi. Dimeric E-cadherin functions as fundamental unit at cell-cell interface in vivo. Nature Structural Biology (revised)
- 2) 竹田 寛、永渕 昭良、月田 承一郎、広橋 説雄. カドヘリンを介した細胞間接着制御機構の研究. 第 69 回日本生化学会(一般演題) (1996)
- 3) Hiroshi Takeda, Akira Nagafuchi, Yutaka Shimoyama, Setsuo Hirohashi. Dimeric E-cadherin functions as a fundamental unit at the cell-cell adhesive interface in vivo. The 18th International Symposium on Cancer (1998)
- 4) 竹田 寛、下山 豊、永渕 昭良、広橋 説雄. 化学架橋剤を用いた細胞表面でのカドヘリン分子動態の解析. 第 71 回 日本生化学会(シンポジウム) (1998)

〔研究者名〕 竹田 寛

## 8. 消化管平滑筋の分化を調節する新規分子の単離

脊椎動物の消化管平滑筋の分化を調節する新規分子、cFKBP/SMAP をディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて単離した。

### 研究成果の概要

鳥類胚消化管のうち、平滑筋の発達する砂嚢と、発達の悪い前胃という 2 つの隣り合った胃から mRNA を単離し、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、砂嚢に発現する遺伝子を単離した。

このうちの一つは、平滑筋に特異的に発現し(図 1)、全長を単離したところ免疫抑制剤 FK506 結合蛋白質であることがわかったので cFKBP/SMAP(ニワトリ FKBP/平滑筋活性化蛋白質)と名付けた。

cFKBP/SMAP の活性を抑えると平滑筋の分化が抑えられた。(図 2)

cFKBP/SMAP を強制発現すると、その細胞は平滑筋になった(図 3)

以上よりこれまで報告のなかった平滑筋の分化を調節する新規分子の単離に成功した。

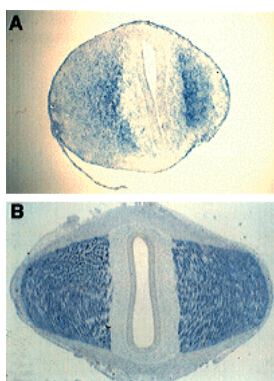


図1 6日胚  
(A)および9日胚  
(B)砂嚢での cFKBP/SMAP の発現

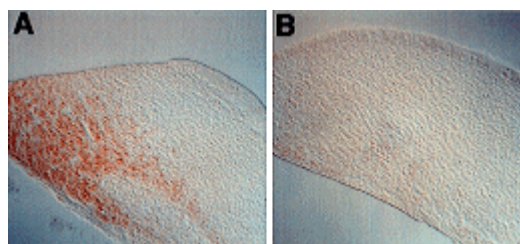


図2 FK506 による平滑筋分化の阻害  
(A)FK506 を添加していないコントロール  
(B)FK506 を添加したもの。平滑筋ができていない

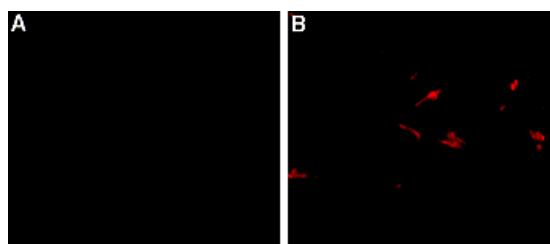


図3 cFKBP/SMAP を強制発現したときの細胞分化  
(A)コントロール遺伝子を発現させても平滑筋の分化は起きないが、  
(B)cFKBP/SMAP を強制発現させると平滑筋の分化が起きる。

### 成果の応用

平滑筋の分化が免疫抑制剤である FK506 によって阻害されることから、消化管の平滑筋由来の腫瘍の治療に対する基礎研究が進むと思われる。

## 特許出願

なし

## 報告書他

口頭

- 1) K. Fukuda, Y. Tanigawa, G. Fujii, S. Yasugi, and S. Hirohashi. Chicken FKBP-65 is involved in smooth muscle differentiation in digestive tract. The 9th International Congress of the International Society of Differentiation October, 1996 Italy
- 2) 福田 公子、谷川 葉子、藤井 元、広橋 説雄、八杉 貞雄. 消化管平滑筋分化因子 cFKBP65 の発現と上皮-間充織相互作用. 日本発生生物学会, 第 30 回大会, 平成 9 年 5 月, 筑波
- 3) 福田 公子、谷川 葉子、藤井 元、広橋 説雄、八杉 貞雄. 上皮-間充織相互作用による消化管平滑筋分化因子 cFKBP65 の発現調節. 器官形成研究会, 第 25 回大会, 平成 9 年 6 月, 大阪
- 4) K. Fukuda, Y. Tanigawa, G. Fujii, S. Yasugi, and S. Hirohashi. The expression of cFKBP65 involved in smooth muscle differentiation in gut is regulated by the epithelial-mesenchymal interaction. The 13th International Congress of the International Society of Developmental Biology July, 1997 USA

論文

- 1) 福田 公子、八杉 貞雄. 消化管の分化と形態形成に関わる因子. 実験医学. 14(8), 200(1192)-206(1198) (1996)
- 2) 福田 公子、八杉 貞雄. 消化管の形態形成と成長因子、転写因子. Molecular Medicine 33(7), 796-804 (1996)
- 3) 福田 公子、八杉 貞雄. 消化管の発生と分化. G. I. Research 6(3), 177-184 (1998)
- 4) K. Fukuda, Y. Tanigawa, G. Fujii, S. Yasugi, S. Hirohashi. cFKBP/SMAP; a novel molecule involved in the regulation of smooth muscle differentiation. Development, in press.

〔研究者名〕 福田 公子

## 9. ショウジョウバエ・細胞外マトリックス成分の大量調整法の確立とその細胞

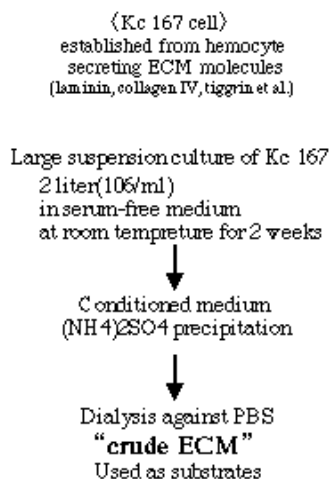
### ーマトリックス間相互作用解析への応用ー

ショウジョウバエ株細胞の培養上清を基質として用いることにより大量培養した細胞を利用して、細胞-マトリックス間相互作用を生化学的に解析できる系を開発した。

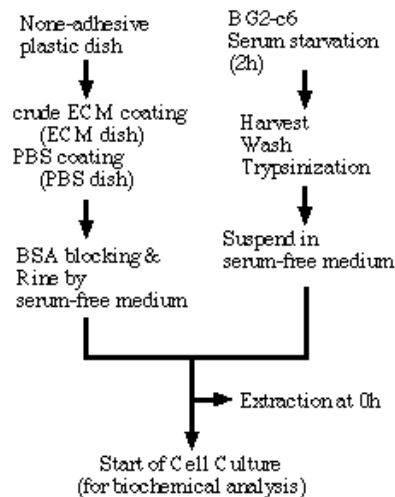
### 研究成果の概要

基底膜と細胞の相互作用を個体レベルで解明するモデル生物としてショウジョウバエが有用であることに着目した。そして、多くの細胞間マトリックス(ECM)成分を認識する受容体であるインテグリンからのシグナルの伝達系に関する研究を目的とした。そのためにショウジョウバエ株細胞を用いて細胞-ECM 間相互作用を再構成し、そこに生化学的解析を加えることを計画した。しかしながら、精製した ECM 成分を基質に用いる系では生化学的研究を行なうのに十分なスケールの培養を行なうことは量的に不可能である。そこで、精製 ECM 成分に代わる基質を用いたシステムの開発を試みた。そもそもショウジョウバエ・ラミニンは生体内より精製されたのではなく、Kc167 という株細胞の培養上清から単離されたものである。そこで、この細胞の大量培養を行ない、得られた conditioned medium を、crudeECM として直接に接着基質として使用できるか否かを検討し、精製 ECM 成分と同様な効果を確認した。そこでこの cECM を用いた大量培養系によりショウジョウバエ細胞と ECM 成分との相互作用による細胞内情報伝達系の生化学的解析が可能となった。(図)

#### Large Scale Preparation of *Drosophila* ECM Molecules



#### Cell Spreading Assay



### 研究成果が可能な用途

- 1) ショウジョウバエ細胞における細胞内情報伝達系の動態解析及び、新規成分の検索・同定。
- 2) ショウジョウバエ細胞が分泌する細胞増殖や生存を制御する液性因子の検索・同定。

## 特許出願

なし

## 報告書

- 1) Takagi, Y., Ui-Tei, K., Tokushige, N., and Hirohashi, S. Tyrosine Phosphorylation of Enabled in Drosophila Neuronal Cell Line Mediated by Integrin-Dependent Cell Spreading on Laminin.(submitted).

〔研究者名〕 高木 康光