生きたマウスにおけるがん遺伝子産物活性化の観察

大場 雄介

研究のねらい

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



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。

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。ここから明らかになった事実を元にして、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。

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。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GTP 水解促進因子(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¹⁰⁾。



生きた個体レベルで

イメージング

小型魚類であるゼブラフィッ シュ用いて、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た⁵⁾。 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。



EGF 依存性の Ras 活性化の経時変化とモデル細胞

Rac の活性は細胞の進行方向で有意に高く、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。

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 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^{3、4)}。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



分子間 FRET による MyD88 と IRF ファミリー結合の解析

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^{2、3)}。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。



分子間 FRET による MyD88 と IRF ファミリー結合の可視化

核酸ー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とどまることである。この多量の IFN 産生は、ノック 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²⁾。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¹⁾。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、上記の仮説を検討するために、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¹⁾。

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 量産生に違いが起こ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。



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





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。

今後の展開

ー連の研究から、細胞内局所での分子の活性化が生理的な応答に重要であること、すなわち時空間 的制御機構が細胞応答を既定することが明らかになりつつある。また、簡単なシミュレーションを併用す ることにより、実験結果の定量的な解析や新規経路・因子の同定への道も開けてきたと考えられる。本 さきがけ研究では多くのことを学び、新たなことも発見した。またその発見を新たな方法で行えたことが 大きいと思う。しかしながら、まだまだごく一部のシグナル伝達にメスを入れ始めたに過ぎない。今後もさ きがけ研究での成果を別の研究で発展させ、シグナル伝達の全貌の理解と、疾患治療への道を目指し たい。 7. 研究成果リスト

(1)原著論文

1. K. Honda^{*}, <u>Y. Ohba^{*}</u>, H. Yanai^{*}, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, and T. Taniguchi:

MyD88-IRF-7 signalling pathway for robust type-I interferon induction is contingent on spatiotemporal regulation. *Nature* 434(7034): 1035-1040. (2005)

- K. Honda, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, M. Asagiri, M. Sato, N. Shimada, <u>Y. Ohba</u>, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi: IRF-7 is the master regulator of type-1 interferon-dependent immune responses. *Nature* 434(7034): 772-777. (2005)
- A. Takaoka, H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, <u>Y.</u> <u>Ohba</u>, T. Mak and T. Taniguchi: Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434(7030): 243-249. (2005)
- K. Honda, H. Yanai, T. Mizutani, Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, <u>Y. Ohba</u>, A. Takaoka, W. C. Yeh and T. Taniguchi: 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)
- 5. C. Miyagi, S. Yamashita, <u>Y. Ohba</u>, H. Yoshizaki, M. Matsuda and T. Hirano: STAT3 noncell-autonomously controls planar cell polarity during zebrafish convergence and extension. *J. Cell Biol.* 166(7): 975-981. (2004)
- H. Yoshizaki, <u>Y. Ohba</u>, M. C. Parrini, N. G. Dulyaninova, A. R. Bresnick, N. Mochizuki and M. Matsuda: Cell Type-specific Regulation of RhoA Activity during Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279(43): 44756-44762. (2004)
- A. Takaya, <u>Y. Ohba</u>, K. Kurokawa and M. Matsuda: RalA Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. *Mol. Biol. Cell* 15(6): 2549-2557. (2004)
- K. Kurokawa, R. E. Itoh, H. Yoshizaki, <u>Y. Ohba</u>, T. Nakamura and M. Matsuda: Co-activation of Rac1 and Cdc42 at Lamellipodia and Membrane Ruffles Induced by Epidermal Growth Factor. *Mol. Biol. Cell* 15(3): 1003-1010. (2004)
- 9. H. Yoshizaki, <u>Y. Ohba</u>, K. Kurokawa, R. E. Itoh, T. Nakamura, N. Mochizuki, K. Nagashima and M. Matsuda: Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162(2): 223-232. (2003)
- 10. <u>Y. Ohba</u>, K. Kurokawa and M. Matsuda: Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* 22(4): 859-869. (2003)
- A. Sakakibara, <u>Y. Ohba</u>, K. Kurokawa, M. Matsuda and S. Hattori: Novel function of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway-mediated Rap1 activation. *J. Cell Sci.* 115(Pt 24): 4915-4924. (2002)
- R. E. Itoh, K. Kurokawa, <u>Y. Ohba</u>, H. Yoshizaki, N. Mochizuki and M. Matsuda: Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22(18): 6582-6591. (2002)

(2)特許出願

なし。

(3)その他の成果

総説等

- 13. 大場雄介、松田道行:細胞増殖と細胞死。病理と臨床【臨時増刊号】 22: 75-80. (2004)
- 14. <u>大場雄介</u>、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)
- 15. <u>大場雄介</u>: 生きた細胞を使った癌遺伝子研究-その新しい動き-。 医学のあゆみ 203(4): 248-250 (2002)

学会発表等

- <u>大場雄介</u>: 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)
- 17. 大場雄介: Ras の時空間的活性制御機構の解析。 第 93 回日本病理学会 (2004; 札幌)
- 大場雄介、沢野朝子、宮脇敦史、松田道行: Ras 活性化の時空間的解析。第26回日本分子 生物学会 (2003;神戸)
- 19. <u>大場雄介</u>: 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)
- 20. <u>Y. Ohba</u>, A. Sawano, A. Miyawaki, M. Matsuda : Spatio-temporal activation of Ras. Nineteenth Annual Meeting on Oncogene. (2003; Frederick, MD, USA)
- <u>Y. Ohba</u>, 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)
- 22. <u>大場雄介</u>、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)
- 23. <u>大場雄介</u>、望月直樹、長嶋和郎、松田道行: RasとRap1の時空間活性化の観察とその制御機構の解析。第 91回日本病理学会(2002;横浜)