

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0297

研究課題名（和文）哺乳類細胞における浸透圧ストレス受容・応答機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Analysis of sensing and responding mechanisms for osmotic stress in mammalian cells(Fostering Joint International Research)

研究代表者

名黒 功 (NAGURO, ISAO)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：80401222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では研究代表者がこれまで進めてきた浸透圧ストレス応答に関与する分子について、タンパク質を対象とした新しいシングルセル解析法の一つであるシングルセルウェスタンブロット法を習得して解析を行った。その結果、高浸透圧で発現誘導されるタンパク質の中にほとんどの細胞で一様に発現上昇するものもあれば、細胞によって全く発現しないものと非常に強く発現するものが混在するタンパク質もあることが明らかになった。また、シングルセルウェスタンブロット法をリン酸化などの検出にも使用できるように方法論の改善を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで通常のウェスタンブロット法など細胞集団の平均値を対象にした解析では見逃されてきた個々の細胞の応答を区別してストレス応答を検出する方法としてシングルセルウェスタンブロット法の有用性について確認することができた。本研究で明らかにした浸透圧ストレス応答の細胞間バリエーションの知見とその分子メカニズムの解明は、今後、浸透圧環境で活性化する免疫細胞の多様性の理解や制御などに役立つと考えられる。また、本研究により洗い出されたシングルセルウェスタンブロット法の問題点は、将来的にこの技術を改善していく重要なポイントとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I learned and adopted the single cell western blot (scWB) technique to investigate cellular variation of osmotic stress-related proteins that we have been studying. I found some proteins were uniformly expressed among cells, but others showed wide cell-to-cell variation in induction upon hyper-osmotic stress. I also took part in a development of new scWB method by which we can investigate quick and fragile post-translational modifications of proteins, such as phosphorylation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シングルセル解析 浸透圧ストレス 細胞応答 免疫細胞 シグナル伝達 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで基課題(基盤B)を中心に解析を進めてきた細胞の浸透圧応答に関して研究を遂行する過程で、浸透圧などのストレスに反応して細胞集団は全体の平均値としてある方向に反応するが、個々の細胞間を比較すると、その中にも個性と呼べる程度の反応のばらつきが観察されることに気づいた。近年、個々の細胞の持つ分子生物学的個性を解析し、細胞の反応と対応づけるシングルセル解析という分野が発展していることからわかるように、細胞のストレス反応とその内部のシグナル伝達を密接にリンクさせて理解する上では細胞間のバリエーションを区別して解析することは重要である。しかし、このような解析は従来のウェスタンブロット法など細胞集団を対象とする手法では不可能なものであり、個々の細胞を独立に、しかもタンパク質の量や翻訳後修飾について解析可能な新たな実験手法が必要であった。

そこで、個々の細胞のタンパク質を対象に解析ができる手法を探したところ、University of California, Berkeley の Herr 教授がシングルセルウェスタンブロット法という解析手法[Hughes *et al. Nat. Methods*, 2014; Kang *et al., Nat. Protocol*, 2016]を開発していたため、この解析手法を用いて研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が見出した浸透圧ストレス反応に対する細胞間バリエーションの存在について客観的・定量的な視点で確認すると共に、そのバリエーションの原因について、これまでの研究で明らかにしてきた浸透圧ストレス反応に関わる分子の挙動との相関を細胞単位で検討し、細胞の浸透圧ストレス反応を決定する分子基盤についてより深いレベルで理解することとした。

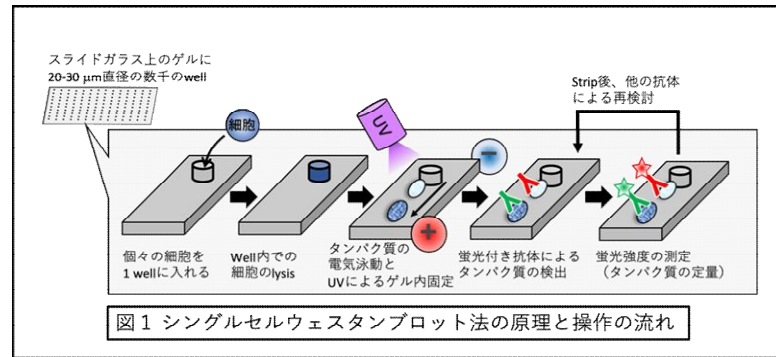
その過程において、シングルセルウェスタンブロット法という新しい技術の習得と応用を海外の研究協力者と共に行い、日本とアメリカ、薬学部と工学部という異文化の交流による新たな研究課題の掘り出しも試みた。

3. 研究の方法

研究代表者は、浸透圧ストレス反応に対する個々の細胞反応のばらつきは、細胞間における浸透圧反応関連分子の量的・質的な個性に依存するのではないかと考えた。本研究では、これまで siRNA スクリーニングなどで同定した浸透圧ストレス反応に関わる遺伝子群のタンパク質レベルの量的・質的違いが細胞間で異なっているかを確かめ、もし違うならばその差が個々の細胞の浸透圧反応にどのような違いを与えるかについてシングルセル解析を行うこととした。そのために、シングルセルウェスタン法を開発した University of California, Berkeley の Herr 教授の研究室に滞在し、シングルセルウェスタン法を利用して、浸透圧ストレスを負荷した個々の細胞からのタンパク質抽出・分離、抗体による注目タンパク質の量・翻訳後修飾(リン酸化等)の定量的検出を行った。この解析により、研究代表者が解明を目指している浸透圧シグナル伝達分子と細胞反応のつながりについて、既存の解析技術では到達できない深さで実証できると考えた。

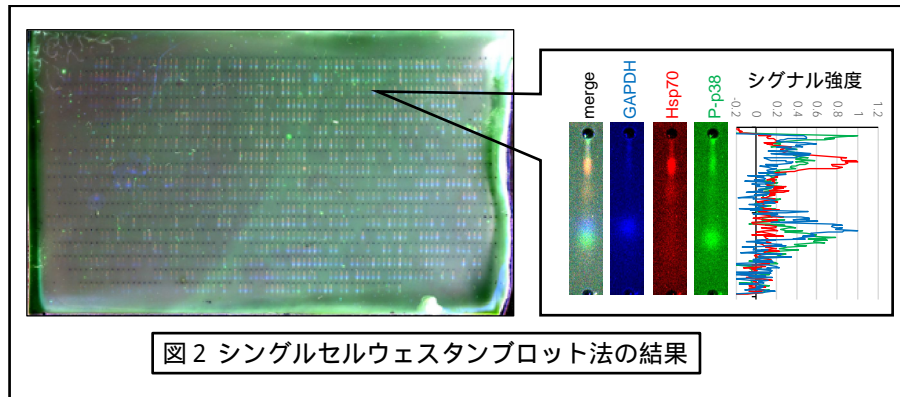
シングルセルウェスタンブロット法の原理(図1)は、スライドガラス上に細胞と同程度の大きさの穴を持つアクリルアミドゲルを貼り付け、そこに1細胞ずつ入るように細胞を播種する。ウェル内で細胞を溶解させ直ちに10秒程度の電気泳動(約1mm)を行う。直後にUVを照射することで、アクリルアミドに混合されたベンゾフェノンによりタンパク質がクロスリンクされゲル内に固定化される。このタンパク質を通常のウェスタンブロット法と同様に1次抗体と

蛍光付きの2次抗体で順次プロービングし、タンパク質量(またはリン酸化などの修飾)をスポットの強度としてマイクロアレイ用スキャナーなどで検出する。細胞免疫染色や flow cytometry と異なり、タンパク質が分子量サイズで分かれること、抗体の除去、当て直しが可能なことから、1細胞からより多くの種類のタンパク質情報を取得できる。



4. 研究成果

(1) シングルセルウェスタンブロット法の習得: 2018年3月に University California, Berkeley に渡航し先方の研究室で実験を開始した。まず、目的として設定した浸透圧ストレス応答における細胞間のバリエーションを検出するために利用するシングルセルウェスタンブロット法 [Hughes *et al. Nat. Methods*, 2014; Kang *et al., Nat. Protocol*, 2016]の習得を行った。この方法に必要である微小な穴 (~30 μm 径)を数千個持つアクリルアミドゲルの鋳型を作成するために、SU-8 を利用したフォトリソグラフィーの技術を学び、自分の実験で用いる細胞に適した鋳型を作成した。最初に研究協力者の研究室でスタンダードに行われていた U251 細胞を用いたシングルセルウェスタン法を練習台としてシングルセルウェスタンブロット法の一連の操作を習得・最適化したのち、本研究のテーマとして設定した、モノサイトの細胞株 (Raw264.7 細胞) における高浸透圧誘導性の NFAT5 依存的遺伝子発現の細胞間バリエーションの解析と、HeLa 細胞における高浸透圧ストレス依存的な MAPK (ERK および p38)のリン酸化の変化のシングルセル解析を試みた(図2)



(2) モノサイトにおける高浸透圧誘導性遺伝子のバリエーション解析: Raw264.7 細胞の遺伝子発現については、高浸透圧刺激において誘導されると報告されていた遺伝子として Hsp70、Bgt1、TNFα、Cox2 に加えて、研究代表者が独自に見出していた Hes1 を加えてシングルセルウェスタンブロット法による解析を試みた。この解析では各タンパク質に対する感度の良い抗体が必須となるが、検討を行った遺伝子のうち明確なシグナルを検出できたのは Hsp70 と Cox2 にとどまった。個々の細胞におけるこれらのタンパク質発現を内在性コントロールとして β-tubulin で規格化して解析を行ったところ、Hsp70 については高浸透圧刺激依存的に細胞集団に含まれるほとんどの細胞で一様に発現増加が見られたのに対して、Cox2 では、予想したように細胞によって発現に全か無かに近い大きなバリエーションが観察されることが明らかになった。これらの遺伝子は両方とも同じ NFAT5 という転写因子に制御され高浸透圧ストレスで誘導されると報告されていたが、本研究により、そのような遺伝子でも異なるメカニズムにより制

御され、細胞間にバリエーションが出るものと出ないものが存在することが示唆された。このような制御の違いは通常のウェスタンブロット法による区別は不可能で、今回の国際共同研究により初めて明らかにすることができた現象である。また、本研究で用いた Cox2 と β -tubulin の抗体はどちらもウサギ由来の抗体であるため、通常の細胞免疫染色や flow cytometry では原理的に区別して検出することができない。シングルセルウェスタンブロット法ではタンパク質のサイズで分離されること(図2)に加えて、抗体の除去、当て直しが可能なこと(図1)から、適切な内部標準を置いた正確な検出系を構築することができた。

(3) HeLa 細胞における高浸透圧ストレス依存的な MAPK のリン酸化の変化に関するシングルセル解析: Mitogen-activated protein kinase (MAPK)は様々なストレスによりリン酸化され、活性化することでシグナル伝達に働く。高浸透圧ストレスに対しても MAPK である ERK や p38 のリン酸化がよく知られており、このストレス依存的な翻訳後修飾についてシングルセルウェスタンブロット法により解析を試みた。まず、リン酸化型の ERK および、p38 (P-ERK、P-p38) の抗体がシングルセルウェスタンブロット法で十分に機能することは確かめることができた(図2)。しかしながら、この解析法の過程で必須となるプレートからの細胞の剥離が刺激となり、浸透圧ストレス依存的なリン酸化が解析の時点では保存されていないという問題が起き、今回の渡航期間においては MAPK のリン酸化について細胞間バリエーションを正確に検証することができなかった。一方、この問題点を研究協力者と議論した結果、細胞の剥離を必要としない新たなシングルセルウェスタンブロット法の開発について具体的な道筋が立ち、その方法論の開発と検証について帰国後も渡航先の研究室と共同研究を行っている。今後、リン酸化など応答が可逆的で変化の早い翻訳後修飾にも対応できる新しいシングルセルウェスタンブロット法のデバイスの開発につながるものと期待される。

<引用文献>

- Hughes *et al.*, Single-cell western blotting, *Nat. Methods*, 2014, 11, 749-55.
Kang *et al.*, Single cell-resolution western blotting, *Nat. Protocol*, 2016, 11, 1508-30.

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

名黒 功、立野 浩輝、一條 秀憲、NFAT5の高浸透圧応答性を促進するHes1の同定、第71回日本細胞生物学会大会、2019

名黒 功、立野 浩輝、シングルセルウェスタン法を用いた細胞の浸透圧ストレス応答の解析、第4回メカノバイオロジー学会、2019

立野 浩輝、名黒 功、一條 秀憲、新規NFAT5核内移行制御因子HES1の同定と高浸透圧環境における機能、第91回日本生化学会大会、2018

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Amy E. Herr

ローマ字氏名：Amy E. Herr

所属研究機関名：University of California, Berkeley

部局名：Department of Bioengineering

職名：Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：Yizhe Zhang

ローマ字氏名：Yizhe Zhang

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。