

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0179

研究課題名(和文)細胞の前後極性のリポソーム内再構成

研究課題名(英文) In vitro reconstitution of cellular anterior-posterior polarization in liposomes

研究代表者

松岡 里実 (Matsuoka, Satomi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：00569733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：運動する真核細胞の前後極性形成に関わる細胞内シグナル伝達系が示す自己組織化現象をリポソーム内で再構成する実験系を構築した。この系の必須因子であるイノシトールリン脂質代謝酵素PI3KおよびPTENについて、酵素活性を失わずに精製し人工脂質リポソーム内に封入する技術確立した。このリポソーム膜上でのPI(3,4,5)P3の時空間ダイナミクスを幅広い化学反応条件下でイメージング解析する再構成実験系の構築に成功した。現在までのところ細胞内で見られた自己組織化ダイナミクスの完全な再現には至っていないが、今後、再構成系を用いた必須因子スクリーニングを行うための基盤技術確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の増殖や運動などの生命に本質的な細胞機能は細胞外環境によらずに発現する。これには細胞内部で自発的に生成するシグナルが利用される。こうしたシグナルの起源は分子そのものではなく分子間相互作用にあるため、還元論的実験のみではシグナル生成機構を解明できず、分子を1種類ずつ追加して分子間相互作用を積み重ねることによりシグナルが自発的に生成する過程を再現する構成論的な実験が不可欠となる。したがって、本研究で開発した各種の構成論的実験手法は、細胞内シグナル伝達系における自発的シグナル生成機構を解明するために不可欠な技術的基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We developed an in vitro reconstitution system recapitulating self-organization dynamics of the intracellular signaling system involved in an anterior-posterior polarization in eukaryotic motile cells. At first, we developed a method to purify and include PI3K and PTEN, essential enzymes in this signaling system, in liposomes. Second, we developed a method to visualize the spatiotemporal dynamics of PI(3,4,5)P3 which was reconstituted in the liposomes under fluorescence microscopy. Finally, we developed a method to perform comprehensive screening of essential proteins required for the self-organization, which will enable perfect reconstruction of the dynamics in near future.

研究分野：生物物理学

キーワード：自己組織化 細胞極性 イノシトールリン脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖や運動などの生命に本質的な細胞機能は細胞外環境によらずに発現する。秩序ある機能発現を実現するために、細胞内部で自発的に生成するシグナルが利用される。細胞内シグナル伝達系は、細胞内を拡散運動する多様な分子の分子間相互作用や反応によって構築されるネットワークである。一定の環境で静止状態にある細胞内では、ネットワークを構成する分子の種類やコピー数がほとんど変化しない。つまり、自発的に生成するシグナルの起源は分子そのものではなく分子間相互作用にある。そのため、還元論的手法のみではネットワークがシグナルを生成する機構を解明できない。分子を1種類ずつ追加して分子間相互作用を積み重ねることによりシグナルが自発的に生成する過程を再現する構成論的な実験が不可欠である。

しかしながら、現在までのところ、細胞内シグナル伝達系の試験管内再構成に成功した例はほとんどない。これは、ダイナミクスの最小必要因子を同定することが困難なためだと考えられる。既に試験管内再構成が実現されている例としてモータータンパク質が挙げられるが、運動活性に必要な分子群はタンパク質の複合体として生化学的に精製可能であった。一方、シグナル伝達系では、ネットワークのダイナミクスに特徴的な時間は数秒から数十秒のオーダーであり、これはミリ秒から秒のオーダーで起こる一過的な分子間相互作用によって実現される。このため、生化学的手法では相互作用相手の分子を検出できない場合が多い。細胞内シグナル伝達系の試験管内再構成を可能にするには、最小必要因子を効率良く同定する方法論の確立が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、移動運動する真核細胞の前後極性形成に関わる細胞内シグナル伝達系を対象として、この分子反応ネットワークの自発的なダイナミクスをリボソーム内で再構成する実験系を構築することを目的とする。細胞の前側は、細胞膜上でイノシトールリン脂質 $PI(3,4,5)P_3$ が局所的に蓄積することで決定される。一様・一定の環境で自発的な細胞運動が起こる際には $PI(3,4,5)P_3$ 蓄積領域は細胞内で自発的に発生しており、 $PI(3,4,5)P_3$ を産生するリン酸化酵素と分解する脱リン酸化酵素が協働的に働くことが分かっている。このイノシトールリン脂質代謝系の自己組織化をリボソーム内で再構成し、分子反応ネットワークの数理構造の理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の精製

$PI(3,4,5)P_3$ 脱リン酸化酵素である PTEN (*Dictyostelium discoideum ptenA*) に mRFP および His タグを付加したものを大腸菌に発現させて、His タグを介してアフィニティ精製を行なった。精製した PTEN の酵素活性を EnzChek Phosphate Assay Kit を用いて定量し確認した。また、 $PI(4,5)P_2$ リン酸化酵素である PI3K (*Homo sapiens PIK3CA*) を昆虫細胞に発現させ、His タグを介してアフィニティ精製を行なった。精製した PI3K の酵素活性を ADP-Glo Kinase Assay Kit を用いて定量し確認した。 $PI(3,4,5)P_3$ のレポーターである PHD_{PKB} -eGFP はそれぞれ大腸菌に発現させ His タグを介して精製した。精製したレポータータンパク質のイノシトールリン脂質との結合の活性と特異性を、次項に述べる方法で作製したリボソームを用いて蛍光イメージングにより定量的に確認した。

(2) 人工脂質リボソームの作製

人工脂質 (PC, PS, $PI(4,5)P_2$, $PI(3,4,5)P_3$) を用いて界面通過法により直径 10~20 μm のリボソームを作製した。人工脂質混合液中の $PI(4,5)P_2$ および $PI(3,4,5)P_3$ の濃度を調整し、これらのイノシトールリン脂質をある程度任意の密度で含む脂質 2 重膜からなるリボソームを作製した。また、通過させる液滴中に精製した酵素およびレポータータンパク質を懸濁しておくことで、これらのタンパク質をある程度任意の濃度で内包するリボソームを作製した。

(3) α ヘモリシンを利用した脂質 2 重膜貫通孔の構築

顕微鏡下にて観察中の任意のタイミングにおいてリボソーム内の ATP 濃度の操作を行うために、 α ヘモリシンを用いてリボソームの脂質 2 重膜を貫通する孔を構築した。リボソーム外液に添加した色素分子の拡散により、貫通孔の構築を確認した。また、リボソーム外液の交換に伴ってリボソームが移動するのを抑制するために、ビオチン-アビジンを介してカバーガラス表面へのリボソームの固定化を行なった。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光イメージング

リボソーム内の mRFP および eGFP の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡システム (Nikon, A1) を用いて観察し画像を取得した。蛍光強度の時系列変化および空間分布を ImageJ を用いて解析した。

(5) Ras 活性化・不活性化因子の網羅的スクリーニング系の構築

細胞内で PI3K の活性調節に関わる低分子量 G タンパク質 Ras の活性化・不活性化因子の全ての遺伝子について、1 種ずつ過剰発現させた細胞性粘菌ライブラリを作成した。

4. 研究成果

(1) リン脂質代謝酵素を内包するリボソーム作製法の確立

本研究課題の対象としている自己組織化系の中心的な役割を果たすイノシトールリン脂質代謝酵素 PI3K および PTEN について、酵素活性を失わずに精製し人工脂質リポソーム内に封入する技術を確立した。PC, PS, PI(4,5)P₂ から構成されるリポソームに精製した PI3K および ATP を封入し共焦点レーザー顕微鏡下で観察した結果、PI(3,4,5)P₃ のレポーターである PHD_{PKB}-eGFP がリポソーム膜に結合する様子が観察された。この現象は ATP 依存的に観察されたことから、PI(4,5)P₂ のリン酸化反応が起こって PI(3,4,5)P₃ が産生されたと結論づけた。また、PC, PS, PI(3,4,5)P₃ から構成されるリポソームに精製した PTEN を封入した結果、PHD_{PKB}-eGFP がリポソーム膜には結合せず内腔に留まる様子が観察された。酵素活性のない変異体 PTEN_{G129E} で同じ実験をすると PHD_{PKB}-eGFP がリポソーム膜に結合する様子が観察されたことから、野生型 PTEN 存在下では PI(3,4,5)P₃ の脱リン酸化反応が起こって PI(4,5)P₂ が産生されたと結論づけた。以上により、イノシトールリン脂質代謝反応の人工脂質リポソーム内再構成に成功した。

(2) リポソーム内で起こる酵素反応の時空間ダイナミクス計測系の確立

細胞内で見られる PI(3,4,5)P₃ 蓄積領域の自己組織化現象をリポソーム内で再構成するための実験系を構築した。まず、リポソーム膜上での PI(3,4,5)P₃ 密度の時空間変化を共焦点レーザー顕微鏡観察によって解析するために、観察中の任意のタイミングでリポソーム内の PI3K によるリン酸化反応を開始できるようにした。リポソーム外液に α ヘモリシンを添加するとおよそ 20 分以内に脂質 2 重膜を貫通する孔が形成された。これにより、リポソーム外液の交換などによってリポソーム内の ATP の濃度を操作することを可能にした。次に、外液の交換によって観察中のリポソームの位置が変化することを防ぐために、リポソームをカバーガラス表面に固定化した。低濃度のピオチン化脂質を含む人工脂質混合液を用いてリポソームを作製し、ピオチン化 BSA で表面をコートしたカバーガラス上にアビジンを介して固定化した。これにより、リポソーム外液の対流の影響を受けずに同一リポソーム内の蛍光強度の時空間変化を顕微鏡下で計測することが可能になった。以上により、リポソーム膜上での PI(3,4,5)P₃ の時空間ダイナミクスを幅広い化学反応条件下でイメージング解析する再構成実験系の構築に成功した。実際に PI3K, PTEN, PI(3,4,5)P₃, PI(4,5)P₂, ATP の濃度を様々に変えて実験を行なったが、現在までのところ細胞内で見られた自己組織化ダイナミクスの完全な再現には至っていない。

(3) PI3K の上流で働く Ras の制御因子の網羅的探索

以上の結果より、PI3K, PTEN, PI(3,4,5)P₃, PI(4,5)P₂ 以外に自己組織化に必須の因子が存在するのではないかと考えた。本研究課題と並行して進めていた研究の結果、PI3K の活性を制御する低分子量 G タンパク質である Ras が自己組織化的に振る舞うことを明らかにした (Fukushima et al., 2019)。そこで、Ras の活性化および不活性化に関与する RasGEF および RasGAP を(2)で確立したリポソーム内再構成系にさらに追加することを計画した。本研究課題の対象としている自己組織化反応が見られる細胞性粘菌では、25 個の RasGEF 遺伝子、13 個の RasGAP 遺伝子が全ゲノム塩基配列解析によって見つかっている。そこで、これら全ての遺伝子をクローニングし、一つずつ細胞性粘菌に過剰発現させて自己組織化ダイナミクスを解析した。その結果、いくつかの候補遺伝子を絞り込むことに成功している。今後、これらのタンパク質をリポソーム内に包させる実験につなげていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Fukushima, S., Matsuoka, S. and Ueda, M. (2019). Excitable dynamics of Ras triggers spontaneous symmetry breaking of PIP3 signaling in motile cells. *Journal of Cell Science* 132(5), pii: jcs224121. (doi: 10.1242/jcs.224121). (査読あり)

Matsuoka, S., and Ueda, M. (2018). Mutual inhibition between PTEN and PIP3 generates bistability for polarity in motile cells. *Nature Communications* 9, Article number: 4481 (doi: 10.1038/s41467-018-06856-0). (査読あり)

〔学会発表〕(計 20 件)

Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 generates bistability for polarity in motile cells. Gordon Research Conference: Directed Cell Migration. 2019 年.

Seiya Fukushima, Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Ras excitability governs self-organized localization pattern of signaling molecules for spontaneous migration. Gordon Research Conference: Directed Cell Migration. 2019 年.

松岡里実、高木拓明、宮永之寛、上田昌宏. PI(3,4,5)P₃ 代謝酵素 PI3K および PTEN の超解像イメージング. 第 60 回日本脂質生化学会. 2018 年.

Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 generates bistability for cell motility. Gordon Research Conference: Oscillations and Dynamic Instabilities in Chemical Systems. 2018 年.

Seiya Fukushima, Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Excitable signaling network governs self-organized localization pattern for spontaneous cell migration. Gordon Research Conference: Oscillations and Dynamic Instabilities in Chemical Systems. 2018 年.

Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 generates bistability for cell motility. Gordon Research Conference: Single Molecule Approaches. 2018 年.

Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 generates bistability for cell motility. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Single Biomolecules. 2018 年.

松岡里実、高木拓明、福島誠也、宮永之寛、上田昌宏. イノシトールリン脂質代謝系の細胞内自己組織化現象の超解像イメージングによる解析. 第 56 回日本生物物理学会年会. 2018 年.

松原瞳、松岡里実、上田昌宏. In vitro reconstitution system for traveling waves of PIP3. 第 56 回日本生物物理学会年会. 2018 年.

好岡大輔、小手石泰康、奥野大地、松岡里実、井出徹、上田昌宏. 移動性細胞における PI(3,4,5)P3 の非対称分布を安定化する PTEN-PI(4,5)P2 ポジティブフィードバック機構. 第 56 回日本生物物理学会年会. 2018 年.

福島誠也、松岡里実、上田昌宏. Ras 依存的に作られる PIP3 局在パターン形成の観察とモデル化. 第 56 回日本生物物理学会年会. 2018 年.

Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 regulates excitability for eukaryotic chemotaxis. Gordon Research Conferences: Directed Cell Migration. 2017 年 1 月. Texas, USA.

松岡里実、福島誠也、上田昌宏. 細胞運動における自発的シグナル生成の仕組み. 第 55 回日本生物物理学会年会(招待講演).2017 年.

福島誠也、松岡里実、上田昌宏. PIP3 代謝に関わる分子の包括的な観察による GTP 型 Ras 依存的な局在パターン形成の解明. 第 69 回日本細胞生物学会大会. 2017 年.

出川拓馬、松岡里実、上村陽一郎、上田昌宏. Polarized ArfA activation directs PTEN to posterior plasma membrane for eukaryotic cell migration. 第 55 回日本生物物理学会年会.2017 年.

好岡大輔、福島誠也、奥野大地、松岡里実、井出徹、上田昌宏. In vitro 1 分子イメージングによる PTEN-PI(4,5)P2 相互作用の解析. 第 55 回日本生物物理学会年会.2017 年.

Satomi Matsuoka, Masahiro Ueda. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 regulates excitability for eukaryotic chemotaxis. Single-Cell Biophysics: Measurement, Modulation and Modeling. 2017 年.

好岡大輔、福島誠也、奥野大地、松岡里実、井出徹、上田昌宏. In vitro 1 分子イメージングによる PTEN-PI(4,5)P2 相互作用の解析. 第 69 回日本細胞生物学会大会.2017 年.

出川拓馬、松岡里実、森本雄祐、上村陽一郎、上田昌宏. PTEN を介した ArfGTPase による細胞運動の制御機構. 第 69 回日本細胞生物学会大会.2017 年.

松岡里実、上田昌宏. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 regulates excitability for eukaryotic chemotaxis. 第 6 回日本細胞性粘菌学会例会. 2016 年. 上智大学 (東京).

〔図書〕(計 1 件)

Matsuoka, S., Miyanaga, Y. and Ueda, M. (2016). Multi-state Transition Kinetics of Intracellular Signaling Molecules by Single-Molecule Imaging Analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1407: 361-379 (doi: 10.1007/978-1-4939-3480-5_25).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。