

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770223

研究課題名（和文） 生細胞におけるホスホリパーゼDの活性可視化と一分子計測による運動制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms for cell migration by visualization of PLD activity and monitoring of single molecule dynamics in living cells.

研究代表者

長崎 晃 (NAGASAKI AKIRA)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：30392640

研究成果の概要（和文）：ホスホリパーゼ D (PLD) は細胞膜を構成しているホスファチジルコリンを加水分解して、多様な生理活性作用を示すホスファチジン酸 (PA) を産生する酵素である。我々は細胞性粘菌を用いて細胞運動に関与する遺伝子として PLD を同定し、ラット膀胱がん由来細胞においても PLD 活性が細胞運動に必要であることを明らかにした。そこで細胞運動における PLD の役割を明らかにするために、生細胞における PLD 活性検出プローブの開発および全反射顕微鏡を用いた PLD の一分子計測を試みた。

研究成果の概要（英文）：Phospholipase D (PLD) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of a major component of membrane phospholipids, phosphatidylcholine, to generate a second messenger phosphatidic acid (PA). We have already shown that PLD gene is required for cell migration in NBT-II cells and *Dictyostelium* cells. To elucidate the role of PLD in migrating cells, we tried to construct probes for detection of PLD activity and to observe the single molecular dynamics of PLD on cell membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は様々な素過程（細胞極性、細胞骨格、細胞接着、細胞内小胞輸送等）によって高次に制御されていることが示されている。しかし、運動中における各素過程間のクロストークに関する包括的な理解は進んでいない。そこで我々は「各素過程間を統括制御する因子の同定」を進めるため、細胞性粘

菌をモデル生物として細胞運動に関わる遺伝子群のゲノムワイドな探索を試みた。細胞性粘菌の細胞運動亢進型変異体は非常に活発に細胞運動を行うため、ディッシュ上でコロニーを形成することができない。そこで細胞運動関連遺伝子を単離する目的で、この細胞運動亢進型変異体に再度挿入変異をおこさせた変異体ライブラリーを作成し、この変

異体ライブラリーから、細胞運動能が低下したクローン、すなわちコロニー形成能の回復したサブレッサー変異体を 22 クローン単離した。これらのサブレッサーの挿入変異領域を決定したところ、様々なカテゴリーに分類される遺伝子群が同定され、そのうちの一つはホスホリパーゼ D(PLD) 遺伝子に挿入変異が入っていた。PLD は細胞膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンを加水分解し、様々な生理活性を有するホスファチジン酸 (PA) を生産する。近年、多くのヒト由来のガン細胞において PA が細胞運動を亢進させるという報告が相次いでおり、その悪性度と PLD 活性の上昇に相関があることが明らかになっている。こうした理由より PLD のガン転移への関与が疑われているが、その作用機序については未だ不明である。

2. 研究の目的

PLD はホスファチジルコリンから派生する様々なリン脂質の産生経路におけるキーエンザイムである。また、PLD によって産生される PA は PI5-kinase の活性化に必須であることが知られている。一方、PLD の活性化には PI5-kinase の産生物である PIP2 が必須であることから、PLD は 2 つのリン脂質代謝経路 (PC 系列と PIP 系列) の結節点に存在し、この経路においてはポジティブフィードバック機構が形成されていることとなる。さらに PLD による多様なセルイベント制御は PLD が 2 つのリン脂質代謝経路の結節点で作用することからも説明できる。

細胞運動における PLD の役割について明らかにするために、PLD の阻害剤添加実験を行ったところ、添加直後から速やかに細胞は運動を停止した。さらに細胞前端部に形成された葉状仮足の伸展を維持することができなくなり、ランダムに不安定な仮足を形成し始めた。また、細胞に GFP-PLD 融合タンパク質を発現させたところ、GFP-PLD1 と PLD2 は細胞の葉状仮足部に局在した。さらに、GFP-PLD2 については仮足の伸張領域に強く局在を示した。これらの結果から PLD は細胞運動時における葉状仮足の形成・維持に関与している可能性が示唆された。しかし、GFP 融合タンパク質から得られる情報は PLD の細胞内分布のみであり、PLD の活性化情報は得ることができない。そこで細胞内における PLD の役割について明らかにするためには、PLD の活性化状態を検出するためのプローブ開発が必要である。また、PLD は細胞膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンを加水分解するため細胞膜上に接近する必要がある。そこで PLD の細胞膜上における接近および局在化を全反射顕微鏡により観察することで、細胞膜上に分布する PLD の挙動を

一分子で観察し、PLD の細胞運動への関与を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 使用する細胞種

本研究では PLD の細胞運動への関与を検出するために、主にラット膀胱ガン由来の NBT-II 細胞 (理化学研究所より取得) を用いた。NBT-II 細胞は高い転移能を獲得した細胞株であり、ディッシュ上における運動速度は $100 \mu\text{m}/\text{hour}$ と非常に速く、運動アッセイ系としては優れたモデル細胞である。また、コラーゲン基質上における運動形態は非常にユニークで一つの大きな葉状仮足を細胞前端部に形成してケラトサイト様運動を行う。このため、タイムラプス撮影をすることなく細胞形態から細胞の進行方向を推測することが可能である。

NBT-II 細胞は 5% 牛胎児血清、抗生物質、 1mM ピルビン酸ナトリウム、1% 非必須アミノ酸を含む MEM 培地で培養し、観察時にはフェノーレッドを含まない DMEM/F12Ham 培地に交換した。長時間の顕微鏡撮影においては 1mM HEPES (pH7) を培地に加え、ステージと対物レンズを 37°C に加温し、また培地の蒸発を防ぐために加湿した。

(2) 細胞運動時における PLD の動態解析

PLD は細胞膜上のホスファチジルコリンを基質とする酵素である。そこで PLD の作用機序を明らかにするために、NBT-II 細胞に蛍光タグ (GFP や Halo タグ) をつけた PLD の融合タンパク質を発現させ、細胞膜上における PLD の分布および動態観察を行った。さらに、運動中のアクチン骨格系の変化を PLD と同時に観察するために細胞骨格系タンパク質も共発現させた。

本実験に使用したコンストラクトはすべてラットもしくはヒト cDNA ライブラリーから PCR 法により取得し、pEGFP ベクター等の発現ベクターに挿入して得た。また、ベクターの細胞への導入はリポフェクション法により行った。細胞を観察する際には 0.001% コラーゲンでガラス表面をコート処理したガラスボトムディッシュに播種し、3 時間以上 CO_2 インキュベーター内で静置した後観察した。

二蛍光同時観測を行うため GFP (もしくは Halo タグ) と赤色蛍光タンパク質 mCherry をそれぞれ励起する 488nm 、 596nm レーザを全反射顕微鏡に設置し、また、観察時に起こる焦点ずれを防ぐ目的で、ノーズピースステージを使用した。二波長同時観測を行うためのシステムとして、顕微鏡本体のビデオポートにダイクロイックミラーを組み込んだ C マウントミラーキューブを用いて分光した。分光し

たビデオレートの画像は2台のCCDカメラで同時に取得する必要がある。そこで2台のCCDから得られる像はモニター分割器を用いて統合した。CCDカメラにより得られた画像はNIHimageソフトウェアにより記録し、解析をおこなった。

(3) 細胞運動時における PLD の酵素活性の可視化

生細胞における PLD の活性化状態を検出するための FRET ベースのプロープの作成をおこなった。PLD 活性の FRET 型検出センサーは ECFP と EYFP をそれぞれドナーとアクセプターとして用いた。そして N 末には PA 結合ドメイン、C 末には H-Ras のファルネシル化モチーフや PH ドメインを配した。この C 末のファルネシル化モチーフ等によりプロープの C 末は常に細胞膜に補足されている。PA が細胞膜に存在しないときは、PA 結合ドメインが細胞質側にフリーな状態で存在し ECFP-EYFP 間の距離が離れていることから、FRET が起こらない。しかし PLD が活性化されて局所的に細胞膜中の PA 濃度が上昇すると、PA 結合ドメインが膜に移行し ECFP-EYFP 間の距離が近づくことによって FRET 量が増加することを想定した。

本実験でコンストラクトの作成に使用した各ドメインの cDNA はヒト、酵母、細胞性粘菌の cDNA ライブラリーから PCR 法により取得し、発現ベクター pcDNA3 上で構築した。

プロープ評価法については簡易的に行うため、まずはディッシュへの接着性の低い HEK293 細胞にプロープを発現させた。発現を確認後、細胞をディッシュからピペッティングにより剥がし、細胞に膜透過性 PA やグロースファクター等を加えることより刺激し、蛍光分光計を用いて FRET 変化量を測定した。

また、蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察については励起フィルターと蛍光フィルターを切り替えるフィルターホイールとシャッターを同期させ撮影を行った。顕微鏡外部機器のコントロールと画像取得はソフトウェア IPLab を使用し、画像解析は imageJ と Metamorph を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞運動時における PLD の酵素活性の可視化

PLD 活性を検出する FRET 型プロープは当初 protein phosphatase-1 の PA 結合ドメインを用いていた。しかし、PA に対する感度があまりにも低いことから、プロープの再構築を進めた。一般に FRET 型センサーの FRET 効率を反映する因子は以下の 3 点である。

- ・ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの

励起スペクトルの重なり

- ・ドナー・アクセプター間の距離
- ・ドナーの蛍光モーメントとアクセプターの励起モーメントの方向の重なり。

そこでまず、PA 結合ドメインを他のタンパク質 (Raf-1, Opilp, DOCK2 等) に由来するものに交換し、さらに ECFP-EYFP 間のリンカー長を 21 残基から 63 残基までの長さの異なるものを 7 通り、アクセプター側の circularly permuted YFP の 6 通りをそれぞれ組み合わせることで 150 種以上のプロープを作成した。細胞膜中の PA 存在量の増減に反応して FRET のレシオ変化が大きくなるようプロープの最適化を試みたが、細胞内における PA の増減量に伴う FRET 変化量はどれも非常に小さかった。FRET による検出はドナーとアクセプターの蛍光強度の比 (レシオ) の変化による検出となる。PIP3 等と異なり比較的存在量の多い PA の場合は細胞膜上の存在量の変化が小さいため FRET による変化量も小さく検出が困難になったものと考えられる。

そこで、現在は PA の細胞内分布を明らかにするために、すでに報告されている様々なホスファチジン酸結合ドメインと蛍光タンパク質等に融合させたプロープを作成し、細胞膜上におけるホスファチジン酸分布の画像化を行っている。

(2) 細胞運動時における PLD の動態解析

PLD は細胞膜の構成成分であるホスファチジルコリンを加水分解することで PA を産生する酵素である。このことから PLD は細胞膜上に局在化する必要がある。そこで細胞膜上における PLD の挙動を明らかにするために、全反射顕微鏡を用いて細胞膜上の GFP-PLD2 を観察した。GFP-PLD2 は細胞膜上においてドット状の分布を示し、このドット状の蛍光輝点は細胞膜上を非常に速い速度でランダムに移動していた。また、蛍光の軌跡をトラッキングすると長くても数秒以内に蛍光輝点は消滅する。この観察結果から PLD2 は常に細胞膜上に局在化しているわけではなく、細胞質と細胞膜間を行き来していることが考えられる。PLD はその内部に PH ドメイン、PX ドメインを含んでいることから、PLD の細胞膜への補足因子の候補として PIP2 や PIP3 等の脂質が考えられる。また、我々は細胞中心部と仮足部では PLD2 の分布に大きな偏りがあることが明らかになり、各光点の細胞膜上での滞在時間は仮足部と細胞中心部では異なることを見いだした。しかし、現在の顕微鏡システムでは、カメラの撮影速度が遅いため非常に高速で細胞膜上を移動する輝点を追跡することが困難であり、現在取得しているデータは 2 フレーム以上 (約 60 ミリ秒間) 輝点を確認できた軌跡のみであり、今後はハイスピードカメラによる観測が必要である。

PLD の全反射顕微鏡観察により仮足部と細胞中心部間でPLDの分布と細胞膜への滞在時間が異なることが明らかになった。このことから、細胞内における空間的なPLD活性制御が細胞膜への補足により行われている可能性が考えられる。そこで、細胞膜の裏打ちタンパク質である細胞骨格系等とPLDの同時観察を行い、PLDの細胞膜へのトラップと細胞骨格系との関連について検討を行った。全反射顕微鏡による2蛍光同時観察を行うためには、サンプル面において各励起光によるエバネッセント場をそれぞれ最適化する必要がある。そのため、通常の蛍光顕微鏡のように同軸上に光源を設置できない。そこで2分岐投光管よりレーザー光を投入し、それぞれのレーザー照射口に外部より制御可能なシャッターを設置した。PLDは細胞膜上を高速で移動するためビデオレートで撮影する必要がある。一方で細胞骨格は比較的動きが遅いため秒単位の撮影で十分である。細胞へのダメージを極力小さくするために、細胞骨格の撮影は秒単位間隔で行った。この両者を同時に撮影するため外部コントローラからそれぞれのシャッターの開閉を異なるタイミングで制御し、シャッターのタイミングに合わせて画像取得を行うシステムを構築した。すでに、アクチン、アクチン結合タンパク、微小管関連タンパク、細胞接着班構成タンパク質（パキシリン、タリン等）の発現ベクターの構築は終了している。現在、PLDとの同時撮影を行い画像の取得と解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①長崎 晃, 長崎 玲子, 藤田 聡史, 上田 太郎、細胞運動関連遺伝子群のゲノムワイドスクリーニング法の開発、生化学、査読無 Vol. 5、No. 2、2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長崎 晃 (NAGASAKI AKIRA)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：30392640