

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390317

研究課題名(和文)細胞情報伝達に関わる蛋白質活性を可視化する発光プローブ分子の開発

研究課題名(英文)Development of bioluminescent probes to visualize protein activity involved in cell signaling

研究代表者

森田 直樹(MORITA, NAOKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：60371085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「ルシフェラーゼ再構成系」技術を用い、Aktの活性化をイメージングする分子プローブ及び小胞体ストレスをイメージングする分子プローブ(CHOP及びPERK機能プローブ)の構築を行った。Akt活性化をイメージングするプローブについては、刺激が入る(Aktが活性化される)と発光するプローブ分子の構築を目指した。また、小胞体ストレスを感知したPERKは二量体化することに着目し、ルシフェラーゼ再構成系技術を用いて、この二量体化をイメージングする発光プローブ分子の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed molecular probes for imaging the activation of Akt (Akt probe) and endoplasmic reticulum (ER) stress (CHOP and PERK probe) by using the "luciferase reconstitution system" technique. For Akt probe, we tried to build bioluminescent probes that emits light when stimulus enters (= when Akt is activated). It is known that PERK molecules dimerize when cells sense ER stress. Therefore, we also constructed bioluminescent PERK probes that detect ER stress by monitoring dimerization of PERK molecules using the "luciferase reconstitution system" technique.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：生体イメージング 発光プローブ 細胞情報伝達

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の生死の制御のバランスが崩れると、必要な細胞が死んだり、死ぬべき細胞（例えば DNA 損傷を受けた細胞、ウイルスに感染した細胞や癌細胞）が生存する。細胞の腫瘍化あるいは腫瘍細胞の増殖能・生存能の獲得もこれにあたると思われる。細胞の生死は、「生存シグナル」と「死シグナル」のバランスによって巧妙に制御されているが、1) 細胞の生死決定に関わるリン酸化を代表とした「可逆のプロセス」である Akt による生存促進メカニズム、2) アポトーシスを誘導する小胞体ストレス及び3) それらの相互の経時的・動的クロストークが絶妙なバランスで細胞の生死をコントロールしている可能性がある。

Akt はプロテインキナーゼ A 及び C に高い相同性をもつセリントレオニン・キナーゼである。Akt は、細胞内において、多くのシグナル経路が集中する所謂“シグナリング・ハブ”として機能している。Akt は様々な下流のシグナル分子、例えば nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、the mammalian target of rapamycin (mTOR)、Forkhead、Bad、glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) のリン酸化を制御している。このようなリン酸化制御は、細胞の成長・増殖、アポトーシスシグナルや血管新生シグナル等の制御に強く関与している。Akt は、oncogenic gene として同定され、また多くの癌組織で Akt の活性化が見られており、癌化との深い関連が示唆されている。Akt は種々の組織において非常に強い生存促進活性を持つことが知られているが、この活性が癌化に重要な働きをしていると考えられている。幾つかの癌で Akt 及びその上流調節因子による機能制御が破綻していることが知られており、それ故これら分子（特に Akt）は創薬のための良いターゲットとなる。

他方、小胞体機能の破綻（小胞体ストレス）に、アルツハイマー病、パーキンソン病、躁うつ病、糖尿病、動脈硬化症、リウマチ、ウイルス感染、癌などの疾患が関連していることが次々と明らかにされている。短期の弱いストレスが小胞体にかかるると、そのストレスから細胞を解放する方向（生存に向けた方向）に様々な反応が起こる。しかし、長期間継続する小胞体ストレスは、結果としてアポトーシスを誘導し細胞死をもたらす。細胞の恒常性を維持するためには、小胞体ストレス経路の下流に存在するアポトーシス抑制とアポトーシス促進の分子群のバランスを保つことが必要である。小胞体ストレス応答（UPR）は小胞体に変性タンパク質が蓄積することによって引き起こされる細胞の協調的適応機構であり、一過性の小胞体ストレスの下では、UPR は細胞の生存を促進する。また、癌細胞において UPR は低酸素状態、低グルコース状態、あるいは発癌性形質転換の状態において活性化され、細胞毒性のある薬

剤に対する抵抗性の原因となっている。in vivo、in vitro の研究から、UPR 経路を構成する 2 つの重要な分子（IRE-1, PERK）が変異あるいは不活性化された癌細胞では、in vitro での低酸素に対する抵抗性が低くなっており、UPR によって正常な細胞に比べて増殖の遅い腫瘍が形成されていることが示されている。これらの知見は UPR の活性化が腫瘍の進行に寄与していることを示唆している。したがって、UPR 阻害の研究は、腫瘍に対するよい治療ターゲットと考えられる。

### 2. 研究の目的

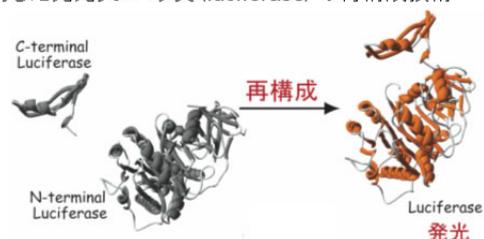
小胞体ストレスは細胞への内的・外的ストレスに対する細胞応答の良いマーカーと考えられる一方、Akt は細胞の生存に深く関与するキー・プレーヤーと考えられる。これら細胞内のストレスと生存シグナルのバランスの乱れが、種々の病態あるいは癌細胞の様々な特性を説明し得ると期待される。特に臓器の低酸素状態（もしくは再酸素化後の再生能）あるいは低酸素状態にある腫瘍細胞の増殖・生存能、薬剤耐性能に関しては、これらの個体レベルでの非侵襲的な解析により病理病態学的な多くの情報をもたらす、最終的に臨床診断と治療、創薬にも大きく貢献すると期待される。

このように、Akt と小胞体ストレスの解析は、各種病態の解明あるいは抗癌剤の開発に繋がるものであるが、これまで各々独立に実施されているのが実状である。本研究では、Akt と小胞体ストレスをイメージングする発光プローブ分子を創製し、各々のシグナルの流れのリアルタイムのモニタリングと同時に複数の分子機能の同時モニタリングを試みることによって、細胞の生死における Akt 及び小胞体ストレスの活性及びそれらのバランスをモニタリングする。それらにより、種々の癌細胞の特性、Akt/小胞体ストレスと癌細胞および抗癌剤への応答性を詳細に解析する。これらを通して、抗癌剤創薬のための基盤的研究を行う。

### 3. 研究の方法

1) 発光プローブ分子の作成；「ルシフェラーゼ再構成系」を用いて①小胞体ストレスをイメージングする分子プローブ、及び②Akt の活性化をイメージングする分子プローブの構築を目指す。小胞体ストレスをイメージングするプローブは、小胞体ストレスのセンサーとして機能する PERK (PKR-like

二分した発光タンパク質 (luciferase) の再構成技術



kinase) の二量体化をモニターできるプローブの構築を目指す。

2) 細胞実験; 1) で作成したプローブを細胞内に導入して、プローブの有効性を確認する。また、①と②の2つのプローブの同時発現及び同時イメージングにより、2つの細胞内機能マーカーのダイナミックな変化を観察する。

3) 小動物実験; 2) で有効性が確認されたプローブをウイルスベクターに組み込み、小動物体内に導入し、その有効性を確認する。2つのプローブの同時発現及び同時イメージングを試みる。

4) 移植実験; 安定導入腫瘍細胞株を作製し、マウスへの移植実験にて、種々の腫瘍細胞の特性の解析 (in vitro および in vivo)、抗癌剤に対する応答性の解析 (創薬のための基盤技術の開発) を行う。

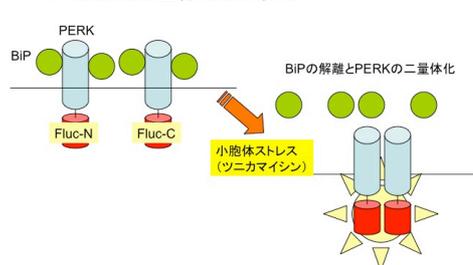
#### 4. 研究成果

##### 1) 発光プローブ分子の作成

##### ①小胞体ストレスをイメージングする分子プローブの構築

小胞体ストレスをイメージングするプローブについては、既に CHOP 遺伝子の発現をモニターするプローブの作成に成功している。また、小胞体ストレスを感知した PERK は二量体になり自己リン酸化を起こすことに着目し、ルシフェラーゼ再構成系技術を用いて、PERK タンパク質のC末端に FLuc-N と FLuc-C を融合したタンパク質を各々作成することで、この二量体化をイメージングする発光プローブ分子の構築を目指した。更に、ポリペプチドのC末端に KDEL 配列を付加し、プローブタンパク質が小胞体膜に留置されるようにした。また、二つのプローブポリペプチドの細胞内での発現に不均衡が起こることをなるべく防ぐために、IRES (Internal Ribosomal Entry Site ; mRNA 内部のリボソーム進入サイト) で PERK-FlucN 遺伝子と PERK-FlucC 遺伝子を連結した発現コンストラクトを作成した。

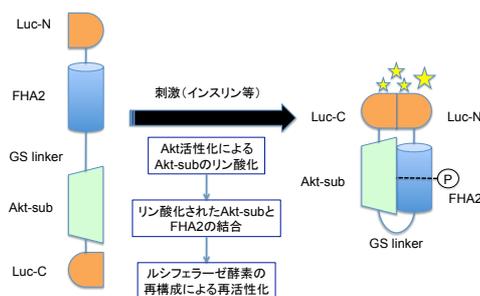
##### 1. PERKの二量体化の可視化



##### ②Akt の活性化をイメージングする分子プローブの構築

Akt 活性化をイメージングするプローブについては、刺激が入る (Akt が活性化される) と発光するプローブ分子の構築を目指した。刺激が入ると発光するプローブ分子の構築のアイデアとして、決定的な方法が存在しないのが現状である。まずはホタルルシフェラーゼ (Fluc) をベースとしたプローブ分子作成を目指した。ホタルルシフェラーゼ N 末端断片 (FLuc-N)、ホタルルシフェラーゼ C 末端断片 (FLuc-C)、リン酸化ペプチド結合ドメイン (mFHA2) 及び Akt リン酸化ペプチド (Akt-sub) の4つのパーツの配置を相互に入れ替えて、複数プローブ候補を構築した。更に、二つのポリペプチドで構成される発光分子プローブ (例えば、CBRLucN+mFHA2 と CBRLucC+Akt-sub への二分割) を構築した。

いのが現状である。まずはホタルルシフェラーゼ (Fluc) をベースとしたプローブ分子作成を目指した。ホタルルシフェラーゼ N 末端断片 (FLuc-N)、ホタルルシフェラーゼ C 末端断片 (FLuc-C)、リン酸化ペプチド結合ドメイン (mFHA2) 及び Akt リン酸化ペプチド (Akt-sub) の4つのパーツの配置を相互に入れ替えて、複数プローブ候補を構築した。更に、二つのポリペプチドで構成される発光分子プローブ (例えば、CBRLucN+mFHA2 と CBRLucC+Akt-sub への二分割) を構築した。



##### 2) 細胞実験

PERK プローブ遺伝子を細胞に導入し、ツニカマイシンで小胞体ストレスを誘導したが、発光は検出できなかった。ウエスタンブロットティングでプローブタンパク質は確かに発現していることは確認できた。

細胞へのプローブ遺伝子導入の際のトランスフェクション自体がストレスとなり、小胞体ストレスを誘発し、バックグラウンドの値が高くなってしまふことが観察されていた。そこで、pEBMulti ベクターを用いて安定発現株の構築することで、バックグラウンドの値を下げることを目指した。小胞体ストレスをイメージングするプローブとして構築できている CHOP 遺伝子の発現をモニターするプローブ (CHOP プローブ) 遺伝子を pEBMulti ベクターに導入した。また、ホタルルシフェラーゼの N 末端ポリペプチドと C 末端ポリペプチドを融合した PERK タンパク質遺伝子を IRES で繋ぎ、そのコンストラクトを pEBMulti へ導入することを試みている。

##### 3) 小動物実験

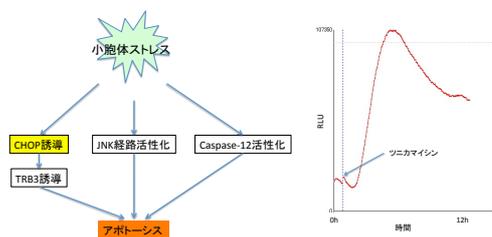
「ルシフェラーゼ再構成系」を用いて、Akt 活性化をイメージングするプローブ及び小胞体ストレスをイメージングする分子プローブ (CHOP/PERK 機能プローブ) の構築を目指したが、CHOP プローブ以外のプローブの構築に大幅な遅れが生じてしまったため、小動物を用いたプローブの有効性の確認まで進むことができなかった。

##### 4) 移植実験

上述の様に、CHOP プローブ以外のプローブの構築に大幅な遅れが生じてしまったた

め、移植実験まで進むことができなかった。

CHOP プロンプ遺伝子を導入した非腫瘍性肝細胞株 (TIB73) を確立した。また、光プロンプ遺伝子を導入した各種癌細胞株の安定発現株の樹立を進める。



#### 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 4 件)

1. Naoki Morita, Sanae Haga, Takeaki Ozawa, James S. Remington, and Michitaka Ozaki. Bio-imaging of surgical stress: Dynamic analysis of liver oxidative stress and damage. *Luminescence* 27, 143-145, 2012.
2. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Naoki Morita, Yoshimi Kaneshima, and James S. Remington. "Bio-imaging of surgical stresses – Dynamic analyses of liver oxidative stress and damage –": 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering (IFMBE) Proceedings, Volume 37, Part 1, Part 10, 1094-1097, 2012.
3. Sanae Haga, Toshiaki Takezawa, Takeaki Ozawa, James S. Remington, Naoki Morita and Michitaka Ozaki. 'Collagen vitrigel sheet' as a novel drug delivery bio-material : 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering (IFMBE) Proceedings, Volume 37, Part 1, Part 14, 1354-1357, 2012.
4. 尾崎 倫孝, 芳賀 早苗, 森田 直樹, 深井原, 藤堂 省, 小澤 岳昌, 近江谷 克裕: 移植臓器の非侵襲的モニタリング法の開発 *Organ Biology* 18, 134-140, 2011.

[学会発表] (計 14 件)

1. 尾崎 倫孝, 芳賀 早苗, 森田 直樹, 野田 なつみ, 山田 勇磨, 小澤 岳昌: 「光学技術を応用した新たな臓器保存法、細胞・臓器移植法の開発」 第 40 回日本臓器保存生物医学会学術集会 東京医科大学病院臨床講堂 2013.11.9~10

2. Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Naoki Morita, Yayoi Seki, Yuma Yamada, Yukari Yasuzaki, Kazuo Umezawa, and Michitaka Ozaki. p62/SQSTM1 plays a protective role from oxidative injury of steatotic liver in mouse hepatectomy model. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, Osaka International Convention Center, Osaka, 2013.9.26~27.
3. 森田 直樹, 芳賀 早苗, 関 弥生, 樋口 美保, 呉 純, 尾崎 倫孝, 近江谷 克裕: 「分泌型ルシフェラーゼを用いた腫瘍細胞進展のモニタリング」 第 86 回日本生化学会大会 パシフィコ横浜 2013.9.11~13
4. 芳賀 早苗, 小澤 岳昌, 森田 直樹, 梅澤 一夫, 藤堂 省, 尾崎 倫孝: 「p62/STSQM1 plays a central role in liver injury in steatotic liver during regeneration.」 第 85 回日本生化学会大会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012.12.14~16
5. 芳賀 早苗, 小澤 岳昌, 森田 直樹, 阿部 理一郎, 藤堂 省, 尾崎 倫孝: 「虚血/再灌流傷害における高血糖および脂肪化病態肝の反応性の相違」 第 19 回肝細胞研究会、札幌医科大学臨床教育研究棟講堂、2012.6.29~30
6. Naoki Morita, Sanae Haga, Takeaki Ozawa, James S. Remington, and Michitaka Ozaki: "Bio-imaging of surgical stress: Dynamic analysis of liver oxidative stress and damage" 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2012) Delta Guelph Hotel & Conference Centre, Guelph, Ontario, Canada 2012.5.28~6.2
7. Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Takako Aoyama, Naoki Morita, James S. Remington, Riichiro Abe, and Michitaka Ozaki: Analysis of different cellular responses of cells in hyperglycemic condition or steatotic hepatocytes – a simulated study of stress response in metabolic syndrome – 第 34 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2011) パシフィコ横浜 2011.12.13~16
8. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Kaikobad Irani, Naoki Morita, Yoshimi Kaneshima, and Takeaki Ozawa: Age-associated p66Shc induced redox-dependent liver damage and impaired regeneration after hepatectomy in aged mice.

- 62th Annual meeting of AASLD, Moscone West Convention Center, San Francisco, USA, 2011.11.4~8
9. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Naoki Morita, Yoshimi Kaneshima, and James S. Remington : Bio-imaging of surgical stresses-dynamic analyses of liver oxidative stress and damage. 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, Budapest Congress & World Trade Center, Budapest, Hungary 2011.9.14~18
  10. 芳賀 早苗、森田 直樹、青山 貴子、小澤 岳昌、James S. Remington、阿部 理一郎、尾崎 倫孝:「脂肪肝における Fas 過剰発現および細胞内酸化的ストレスによる肝再生不全の検討」 第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 2011.9.21~24
  11. Sanae Haga, Toshiaki Takezawa, Takeaki Ozawa, James S. Remington, Naoki Morita and Michitaka Ozaki : 'Collagen vitrigel sheet' as a novel drug delivery bio-material. 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, Budapest Congress & World Trade Center, Budapest, Hungary 2011.9.14~18
  12. 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、森田直樹、金島由実、James S. Remington、小澤 岳昌、井上 啓、松本 道宏:「種々の病態における肝再生の分子制御機構の解析(細胞増殖・細胞成長・細胞死の観点から)」 第 18 回肝細胞研究会 東京ガーデンパレス 2011.6.24~25
  13. 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、森田 直樹、青山 貴子、金島 由実、Kaikobad Irani、James S. Remington:「外科治療による肝細胞ストレスと障害・再生への影響(生体イメージング法をもちいた動的解析)」 第 18 回 細胞研究会 東京ガーデンパレス 2011.6.24~25
  14. 芳賀 早苗、森田 直樹、小澤 岳昌、James S. Remington、尾崎 倫孝:「脂肪肝における肝再生不全機序の解析」 第 18 回肝細胞研究会 東京ガーデンパレス 2011.6.24~25

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森田 直樹 (MORITA NAOKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号 : 60371085

### (2)研究分担者

2013 年度

芳賀 早苗 (HAGA SANAE)

北海道大学・大学院保健科学研究所・博士研究員

研究者番号 : 60706505

2011 年度~2012 年度

尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)

北海道大学・大学院保健科学研究所・教授

研究者番号 : 80256510

### (3)連携研究者

近江谷 克裕 (OHMIYA YOSHIHIRO)

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・研究部門長

研究者番号 : 20223951

小澤 岳昌 (OZAWA TAKEAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号 : 40302806