

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570244

研究課題名(和文)ホスホリパーゼDの細胞膜上における動態解析と細胞運動における極性維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of polarity mechanism in migrating cells and analysis of molecular dynamics of phospholipase D on the cell membrane

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞運動は様々な生物学的プロセスとガン転移に関与していることが知られている。しかし、細胞運動の制御機構は様々なセルイベント(細胞骨格再構成、極性維持、細胞内膜輸送、細胞接着等)が階層的に関与しているため、その実態は複雑で未だ明らかとはなっていない。そこで、細胞運動の制御機構を明らかにするため細胞運動に関与する遺伝子のスクリーニングを行い、これまでにPLDと32のキナーゼ関連遺伝子を同定した。本研究ではPLDの1分子解析とPLDの生産物であるホスファチジン酸の可視化を試みた。さらに、PLDとキナーゼ関連遺伝子のパスウェイ解析を行い、細胞運動に関わる遺伝子のシグナル伝達経路を作成した。

研究成果の概要(英文)：Cell migration plays a major role in a variety of normal biological processes and metastasis of cancer cells. It is known that cell migration is controlled by several cell events (e.g., regulation of actin-cytoskeleton, substrate adhesion, membrane traffic, and cell polarity). As a consequence, the system regulating cell migration is very complicated, requiring coordinated spatiotemporal control of these cell events during the migration process. Hitherto, we screened genes regulating cell migration by using our screening system, and PLD and 32 kinase-related genes were identified. In this study, I investigated the single molecule dynamics and activation of PLD on cell membrane by visualization of PLD and its products, phosphatidic acid. Furthermore, I performed pathway analysis among identified gene products to construct a comprehensive signal network of cell migration.

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：PLD 細胞運動 全反射顕微鏡 NBT-II

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は発生過程、創傷治癒、神経分化、がん転移など様々な生物学的現象において重要な役割を果たしている。しかし、運動中における各セルイベント間のクロストークに関する包括的な理解は得られていない。一般に、細胞が継続して運動するには、様々なセルイベント（細胞極性の維持、細胞骨格の再構成、細胞接着の制御、細胞内膜輸送等）が協調的に制御される必要があると考えられている。そして、細胞外刺激に応答して細胞が運動するプロセスにおいて、各セルイベントは“適切な場所”、“適切なタイミング”でコントロールされており、この階層的な複数の制御機構による関与が運動制御メカニズムを複雑にさせている。一方、細胞運動時における各々のセルイベントによる制御については分子レベルでの解明が進んでいる。しかし、これら各セルイベントの間を統括制御している機構については明らかになっていない。細胞運動の制御機構を包括的に明らかにするには、細胞運動時に各セルイベント間を同調制御させる因子や経路を明らかにする必要がある。

そこで「各素過程間を統括制御する因子の同定」を進めるため、細胞性粘菌やラット高浸潤性がん細胞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行い、PLDと32のキナーゼ関連遺伝子を同定した。さらに細胞運動時における各セルイベント間のシグナル伝達経路を明らかにするため、同定した遺伝子群のパスウェイ解析を進めるとともに、PLDの1分子解析とPLDの活性化状態の可視化を行うことで、細胞運動時におけるPLDの役割とハブ機能としてのPLDの作用を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

これまでに細胞運動に関与する因子を同定するためにスクリーニングを行い、その結果、phospholipase D (PLD)を同定した。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。また、PLDは様々なタンパク質と結合することから、シグナル伝達のハブとして機能すると考えられてきた。

そこで、細胞運動中におけるPLDの動態を明らかにするため全反射顕微鏡観察を行った。PLDの標的は細胞膜の構成成分であるホ

スファチジルコリンであることから、PLDの活性化は細胞膜上において行われる。PLDの細胞膜上の分布、動作、滞在時間を計測することにより、PLDの細胞運動への関与を分子レベルで明らかにする。

また、PLDの産生物であるPAは様々なタンパク質と結合することが知られている生理活性物質である。そこでPLDの活性化状態を生細胞で検出するために、PAの検出プローブの作成を進める。PAの可視化により、細胞内のPA分布と、運動時におけるPLDの活性化領域を明らかにすることが可能である。

さらに、本研究と並行して細胞運動時における細胞全体で起こるシグナル伝達を明らかにするために、セルチップを用いてキヌーム解析を進めていた。その結果、細胞運動に関与する32遺伝子を同定した。そこで、このキナーゼ関連遺伝子群とPLD1/PLD2の間でパスウェイ解析をおこなうことで、各セルイベント間の情報伝達経路を解明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 細胞

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NBT-11細胞の亜種であるNTB-L2b細胞を用いた。NTB-L2b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。

NTB-L2b細胞は10%牛胎児血清(Biowest)、抗生物質(invitrogen)、1mMピルビン酸ナトリウム(invitrogen)、1%非必須アミノ酸(invitrogen)を含むMEM培地(Sigma)で培養し、蛍光観察時にはフェノーレッドを含まないDMEM/F12Ham培地(Sigma)に交換した。

(2) PLDの動態解析とPAの検出

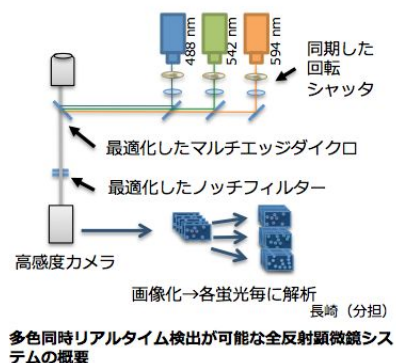
PLDは細胞膜上のホスファチジルコリンを基質とする酵素である。そこでPLDの作用機序を明らかにするために、NBT-L2b細胞に蛍光タンパク〔緑色:EGFP/AcGFP(Clontech)、橙色:mKusabira-orange(MBL)、赤色:mKate2(Evrogen)/mCherry(Clontech)〕をタグとしてつけたPLDの融合タンパク質を発現させ、細胞膜上におけるPLDの分布および動態観察を行った。さらに、運動中のアクチン骨格系の変化をPLDと同時に観察するために、PLDとは異なる蛍光タンパクをつなげた細胞骨格系タンパク質も共発現させた。

本実験に使用したコンストラクトはすべ

で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 (Clontech) 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 (FuGENE; Promega) により行った。細胞を観察する際には 0.001% コラーゲン (機能性ペプチド研究所) 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 (IWAKI/松浪硝子) に播種し、3 時間以上 CO₂ インキュベーター内で静置した後に観察した。

一方、PLD の生産物である PA の検出プローブは既知情報から PA 結合ドメイン (ほ乳類、酵母、シロイヌナズナ由来) を検索し、それぞれの cDNA ライブラリーよりクローニング後、各種蛍光タンパクをタグとする発現プラスミドを構築した。

1 分子計測は高感度 CMOS カメラを (Orca-Flash4.0; Hamamatsu) を設置した全反射顕微鏡 (Olympus) を用い、励起光源としてシャッタ制御装置を付属した 488nm, 542nm, 594nm のレーザを使用した。3 波長蛍光観察のために、上記 3 種の励起光に対応したトリプルエッジのダイクロックミラー (Semrock) と 2 枚のノッチフィルタ (Semrock) の組合せで構成されたフィルタユニットを作成した。2 励起で同時に観察する場合は dual view 2 波長同時観察光学ユニット (Roper) を使用し、3 波長観察は一軸で同期した 3 つのオプティカルチョッパー (LEGO) を自作し、光源切り替えシャッタとして用いた。画像はソフトウェア HC-image (Hamamatsu) で取得し、画像解析には imageJ を用いた。また、PLD の 1 分子解析にはソフトウェア G-Track (G-Angstrom) を使用した。



(3) パスウェイ解析

細胞運動のシグナルパスウェイを明らかにするため、セルチップを用いて同定した 32 の細胞運動関連キナーゼと細胞性粘菌で同定した PLD (ほ乳類では PLD1, PLD2) の間でパスウェイ解析を行った。PLD は細胞運動遺伝子であるとともに、シグナル伝達ハブとして働くため、シグナル伝達経路を描く際に、各遺伝子産物を繋ぐ軸として用いた。解析はゲノムネットワークプラットフォーム上 (<http://genomenetwork.nig.ac.jp>) にある

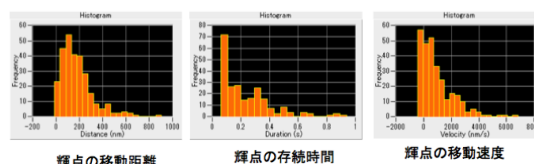
タンパク-タンパク間相互作用 (PPI) データベースを用いた。まずは PLD1 と PLD2 に対して 32 種のキナーゼ関連タンパク質それぞれを 1 対 1 で最短距離経路探索を行い、得られたデータを基に一枚の経路図を新たに作成した。

さらに、スクリーニングにより同定した 32 遺伝子をすべてクローニングし、EGFP をタグとする発現ベクターを構築した。このベクターをそれぞれ NBT-II 細胞で発現させ、得られた細胞内局在の情報を同一マップ上に記した。

4. 研究成果

(1) PLD の動態解析

NBT-L2b 細胞に蛍光タンパクを融合した PLD2 を発現させ、全反射顕微鏡を用いて 1 分子観察を行った。細胞膜上における PLD2 は非常に速い速度で移動するため、カメラスピードは 30-50 フレーム/秒以上で撮影記録し、輝点追跡ソフトを用いて 1 分子解析を行った。PLD2 の 1 分子解析の結果、細胞膜上の PLD2 分子の挙動 (移動距離、移動速度、細胞膜への局在時間) は、各分子間でばらつきが大きく、各分子が異なる挙動を示す結果が得られた。このことから、細胞膜上に存在する PLD2 分子は、細胞膜上の局所的に異なる周辺環境の影響を受けている可能性が示唆された。

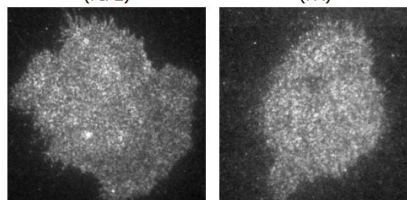


PLD2の1分子観察

(2) PA の検出

細胞膜上における PA の分布を可視化するために、各種タンパク質の PA 結合ドメインを蛍光タンパクに融合させ、NBT-L2b 細胞に発現させた。これまでに 12 種の PA 検出プローブを作成し、全反射顕微鏡観察を行った。酵母由来の Opi1 PA 結合ドメインから構成されるプローブ等いくつかの種類において、プローブの発現量が比較的少ない細胞を選択、観察することで、すでに先行研究がある PIP2 検出プローブと同等の像が得られるようになった。PA の細胞分布は当初の予想と異なり、細胞膜全体に分布していることが明らかとなった。

GFP-Hs PLCd PH Domain (PIP2) GFP-Sc Opi1 Q2 domain (PA)



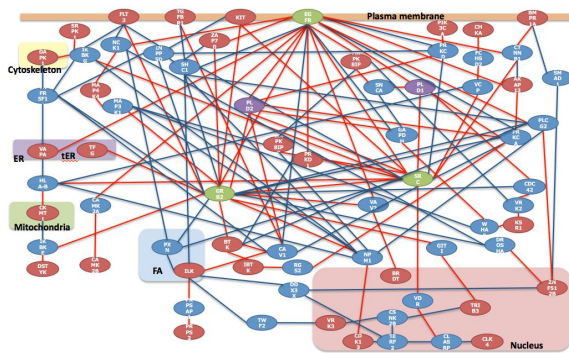
Lipid 結合ドメインの全反射像

(3)パスウェイ解析

PLD1, PLD2と32種のキナーゼ関連遺伝子群のパスウェイ解析を行ったところ、データベースに情報が登録されていなかった2種のキナーゼを除き、すべての遺伝子産物を一枚のシグナル経路地図に書き込むことができた。また、各遺伝子産物を繋ぐ新たな37タンパク質がマップ上に現れ、その結果、作成した経路図は70のタンパク質から構成されている。

特筆すべき事は2点あり、一つはシグナル伝達ハブと思われるEGFR, Src, Grb2の3点が描写したシグナルマップ上に出現した。細胞運動は様々なセルイベントが協調して制御される必要があることから、複数の情報伝達ハブの存在は、細胞外刺激を各セルイベントに伝えるプロセスにおいて情報分岐点として機能すると考えられる。

さらに、このマップの最上流にはEGFR, Bmpr1A, Tfg3, kit, Flt3の5つの受容体型キナーゼが配されている。この結果からNBT-II細胞の場合5つの受容体型キナーゼが細胞運動に関与している可能性が示唆され、複数の細胞外刺激により細胞運動が制御されている可能性が考えられた。



細胞運動に関わる遺伝子のスクリーニングより同定した因子をもとにしたパスウェイ解析

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)

[学会発表](計3件)

長崎 玲子、長崎 晃、上田 太郎、三宅正人、藤田 聡史、高浸潤性NBT-II細胞を用いた細胞運動調整遺伝子のキヌーム解析、第35回日本分子生物学会
長崎 玲子、上田 太郎、藤田 聡史、長崎 晃、細胞運動に関与する遺伝子として同定したホスホリパーゼDとキナーゼ群の細胞生物学的解析およびパスウェイ解析、第65回日本細胞生物学会
長崎 晃、猪爪 貴美子、上田 太郎、細胞性粘菌で同定した細胞運動制御遺伝子ホスホリパーゼDの1分子解析の試み、第3回日本細胞性粘菌学会

6. 研究組織

(1)研究代表者

長崎 晃 (NAGASAKI, Akira)
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