

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659030

研究課題名(和文) 細胞極性化は Lyn-ACSL3 システムを介して誘導されるか？

研究課題名(英文) Is the Lyn-ACSL3 system involved in induction of cell polarization ?

研究代表者

山口 直人 (YAMAGUCHI NAOTO)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：00166620

研究成果の概要(和文)：

チロシンキナーゼ c-Src と Lyn を誘導発現できるイヌ腎臓上皮 MDCK II (Madin-Darby canine kidney cell) 細胞株を作製し、極性細胞での c-Src と Lyn の局在を検討した。その結果、c-Src はアピカル膜とバソラテラル膜の両者に存在したが、Lyn の膜局在はバソラテラル膜に偏っていることが分かった。細胞質で生合成された Lyn は c-Src と異なり、ゴルジ領域に集積しゴルジ領域で long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3) と会合により細胞膜へと運ばれるので、Lyn-ACSL3 との会合システムと細胞極性発揮の機構解明が待たれる。

研究成果の概要(英文)：

To examine the localizations of c-Src and Lyn tyrosine kinases in polarized cells, we generated c-Src- or Lyn-inducible Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCK II) lines. Using these inducible cell lines, we revealed that Lyn is largely localized to basolateral membranes but c-Src is present on both apical and basolateral membranes. In non-polarized cells, Lyn but not c-Src is accumulated in the Golgi region after biosynthesis in the cytoplasm and is transported to the plasma membrane through Lyn's association with long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3) on Golgi membranes. Therefore, further elucidation of a role for the Lyn-ACSL3 system in cell polarization is needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞極性, シグナル伝達, 共焦点顕微鏡, 細胞膜, 蛋白質輸送

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼは 90 種類ほど存在するが、細菌や酵母には存在せず、ヒトを含めた高等生物特有のシグナル分子である。プロトがん遺伝子である Src 型チロシンキナーゼは、8 種類のメンバー (c-Src, Lyn, c-Yes, Fyn, Lck, Hck, c-Fgr, Blk) から成り、32 種類

含まれる非受容体型チロシンキナーゼの中でも最大のファミリーである。Src 型チロシンキナーゼは脂質修飾を介して細胞膜の細胞質側に係留され、受容体からのシグナルを細胞内へと伝達することが知られており、ゴルジ体膜やリソソーム膜/後期エンドソーム膜の細胞質側に係留することが分かっていた。Src 型チロシンキナーゼは小胞体で生合

成される分泌蛋白質とは異なり、細胞質で生合成されてそれぞれのオルガネラに何らかの機構により輸送され、場所特異的に役割を持つものと考えられる。

HeLa 細胞や COS 細胞などの非極性培養細胞を用いた私達のこれ迄の研究から、c-Src のトラフィッキングは細胞質での生合成後に細胞膜と後期エンドソーム/リソソームとの間を非常に速い速度で巡回していることが判明した。一方、Lyn は c-Src と異なり、細胞質での生合成後にゴルジ装置膜の細胞質側にアンカーして、分泌経路を経て細胞膜に運ばれる。c-Src はミリスチン酸付加、Lyn はミリスチン酸とパルミチン酸付加をする。そこで、c-Src と Lyn のトラフィッキングの違いに関してパルミチン酸付加に着目して研究したところ、Lyn の N 末端から 3 番目のシステイン残基にパルミチン酸が共有結合することがトラフィッキングの違いを生み出すことが判明した。

glutathione-S-transferase (GST) プルダウン法を用いて Lyn のチロシンキナーゼ領域に会合する分子を精製したところ、long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3) が同定された。そして、ACSL3 は Lyn 分子が open conformation を取った時に Lyn キナーゼ領域の裏側部分に会合することが分かった。更に、ゴルジ体から細胞膜への Lyn の輸送は、ゴルジ体膜表面において、Lyn キナーゼ領域への ACSL3 の一過性会合により、開始されることが分かった。しかし、Lyn キナーゼ酵素活性や ACSL3 酵素活性は必要が無かったことから、Lyn の open conformation 時における Lyn キナーゼ領域と ACSL3 との蛋白質相互作用が重要であることが分かった。さらに、Lyn 含有ポストゴルジ輸送小胞は、水泡性口内炎ウイルス蛋白質 VSV-G の輸送担体やカベオリンの輸送担体などと異なっており、c-Src の輸送小胞とも異なる輸送小胞であった。私達の研究により、Lyn がゴルジ体経由で ACSL3 との会合を経て、細胞膜へ輸送されることが初めて明らかになった。

2. 研究の目的

細胞極性化は、蛋白質などを細胞内の特定位置に非対称かつ秩序をもって分布させ、細胞機能発揮に重要な役割を担うことが知られている。上皮細胞では、細胞膜はアピカル膜とバソラテラル膜に極性が維持されているが、癌細胞では epithelial-mesenchymal transition (EMT: 上皮間葉転換) により極性喪失が起これるので、癌病因論からも極性化機構の解明が待たれる。

私達のこれ迄の非極性細胞を用いた研究から、Lyn がゴルジ体から細胞膜へと輸送

されるためには、Lyn と ACSL3 との会合が必要であることを示した。また、Lyn が運ばれる輸送小胞は、カベオリンや他の分子の輸送小胞とは異なることを見いだしている。上述のように、私達は、非極性細胞における Src 型チロシンキナーゼの細胞内輸送経路と輸送機構を明らかにしてきた。しかしながら、がん細胞の多くが上皮細胞であることが知られており、極性をもつ上皮細胞における細胞内輸送メカニズムは複雑化している。そこで、細胞極性化において、Lyn-ACSL3 システムがアピカル膜とバソラテラル膜の選別機構にどのように関与するかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 極性化細胞として、一般的に使われているイヌ腎臓上皮 MDCK II 細胞 (Madin-Darby canine kidney cell II) を用い、単層培養することにより、MDCK 細胞をタイトジャンクション形成円柱上皮へと分化させて細胞極性化を誘導する。極性化細胞における細胞膜のアピカル膜とバソラテラル膜の形成確認には、それぞれの膜に特異的に発現する蛋白質と共染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Z 軸に対して焦点深度を変えた 30 枚以上の XY 平面のスライス画像を取得後に画像の重ね合わせを行なう。そして、立体的に輪切りにして局在を調べ、極性細胞での Lyn と c-Src の局在様式を比較検討する。

(2) 低温処理やタンニン酸処理や固定前抽出法などの方法を用いて、生合成後の Lyn のトラフィッキングを経時的に調べる。また、Z 軸での重ね合わせ画像を取得すると、レーザースキンの回数が非常に多くなり時間がかかることや、蛍光の消光をもたらすことから、バソラテラル膜を横切る横断面 (bottom) とアピカル膜のみを横切る横断面 (top) の 2 カ所の XY 面画像を取得することで、共焦点レーザー顕微鏡画像取得に関する方法の改善を図った。

4. 研究成果

(1) 極性細胞として汎用される MDCK II 細胞に c-Src と Lyn をそれぞれ一過性に遺伝子導入し共焦点レーザー顕微鏡で観察することを計画した。重要なことは、非極性時での蛋白質局在と区別するために、MDCK 細胞が極性化してから c-Src や Lyn の蛋白質発現が行われることであろう。まず、MDCK 細胞を播種してからコンフルエントになるまで培養し、その後タイトジャンクションが形成されて極性化が起これる頃を見計らって c-Src と

Lyn の一過性遺伝子導入を行った。その結果、遺伝子導入効率が著しく低下していることが分かった。従って、遺伝子導入された c-Src と Lyn の蛋白質発現細胞を顕微鏡下で探すのは、時間がかかり非常に難しく、統計処理出来る程は細胞数の確保ができず、結果の信頼性が得られなかった。

(2) 次に、MDCK 細胞を播種して、極性化を形成する前、すなわち、サブコンフルエントの状態、一過性遺伝子導入を行った。この場合には、遺伝子発現効率も十分高く、統計処理するために十分な蛋白質発現細胞数が得られた。しかしながら、遺伝子導入後に細胞極性が形成される迄に長時間培養する必要があるため、c-Src や Lyn を発現する細胞は、細胞の形が丸くなり極性を失っているものが多く観察された。恐らく、長時間の遺伝子発現により発現蛋白質の蓄積が起ることにより細胞あたりのチロシンキナーゼ活性が亢進して EMT 等が誘導され、本来の極性細胞での局在を示していないのではないかと考えられた。

(3) MDCK 細胞が極性化した後に c-Src や Lyn を短時間発現させ、それらの蛋白質の生合成直後からの局在を解析する方法として、私達が別の細胞種 (HeLa, HeLa S3, HCT116, NIH3T3 など) で既に成功しているテトラサイクリンオペレーター/テトラサイクリンリプレッサーにより制御される遺伝子誘導発現系を用いることを企てた。この誘導発現系を利用すると、MDCK 細胞が極性化する迄は遺伝子発現を抑制出来ており、極性化が形成されてから誘導発現を開始することにより、上述の (1) と (2) で判明した欠陥を克服できるものと考えられる。

市販製品を基に、私達が改良した遺伝子誘導発現系は、発現漏れが低く、誘導剤の濃度依存的に発現させることができる非常に優れたシステムである。そして、このシステムを使うと、一過性遺伝子誘導発現と安定遺伝子誘導発現の 2 通りの方法を取ることができる。安定遺伝子誘導発現系は、細胞株樹立まで時間がかかるが、100%の細胞で誘導発現を観察できるという利点がある。一方、安定遺伝子誘導発現系に比して、一過性遺伝子誘導発現は細胞システム完成までほぼ半分の時間で細胞系ができるが、一過性遺伝子発現の導入効率は 5~20%程度になる。

安定遺伝子誘導発現系と一過性遺伝子誘導発現どちらも、MDCK 細胞の染色体にテトラサイクリンリプレッサー遺伝子 (tetracycline repressor: TR) が組み込まれた細胞株の樹立が必要である。そこでまず、MDCK/TR 細胞株の作製を行ない、単一細胞クローニングを経て細胞株樹立に成功した。

また、c-Src と Lyn cDNA をテトラサイクリンオペレーターで支配されるプロモーターの下流に組み込み、発現ベクターの作製を行った。

(4) 樹立した MDCK/TR 細胞株を用いて、c-Src と Lyn の一過性遺伝子誘導発現を企てた。まず、MDCK/TR 細胞を播種して、サブコンフルエントの状態、一過性遺伝子導入を行った。この時、大多数の遺伝子導入細胞では、導入された遺伝子はテトラサイクリンリプレッサーがテトラサイクリンオペレーター領域に結合することにより、遺伝子発現が抑制されていた。MDCK/TR 細胞の培養を続け、極性化が形成した時に誘導剤を添加し、c-Src と Lyn の一過性遺伝子誘導発現を行った。播種する MDCK/TR 細胞数を調整して、細胞遺伝子発現能がある間に極性化するようにし、さらに、テトラサイクリンリプレッサーで抑制が利くように遺伝子導入する遺伝子量の最適化を行った。

その結果、遺伝子導入された MDCK/TR 細胞では、c-Src は細胞膜全体 (アピカル膜とバソラテラル膜) および細胞質に広く局在することが分かった。一方、Lyn は主にバソラテラル膜に局在する様子が観察された。従って、極性化細胞において、c-Src と Lyn の局在の差異が初めて観察された。

(5) 次に、MDCK/TR 細胞を用いて、c-Src と Lyn のそれぞれ安定遺伝子誘導発現細胞株 (MDCK/TR/c-Src 細胞と MDCK/TR/Lyn 細胞) を作製し、単一細胞クローニングを経て細胞株樹立に成功した。これらの細胞株では、ほぼ 100%の細胞で、c-Src または Lyn の誘導発現を観察できた。そこで、細胞を播種してからコンフルエントになるまで培養し、その後タイトジャンクションが形成されて極性化が起る頃を見計らって誘導剤を添加したところ、誘導後 2 時間から蛋白質発現を観察された。c-Src は細胞膜全体 (アピカル膜とバソラテラル膜) および細胞質に広く局在し、Lyn は主にバソラテラル膜に局在しており、一過性遺伝子誘導の結果と同じであり、ほぼ 100%の細胞で観察されたことから、確定的な結果である。

(6) 非極性化細胞では、c-Src は細胞膜局在の他に、後期エンドソーム/リソソームといった細胞内小器官に局在している。そこで、上述のように、MDCK/TR/c-Src 細胞を用いた c-Src の安定遺伝子誘導発現細胞で、細胞内小器官の膜、すなわち、内膜、の蛋白質を選択的に可溶化し、アピカル膜とバソラテラル膜局在の蛋白質は可溶化され難い条件を見出すことが出来た。そこで、細胞極性形成させ、内膜選択的可溶化の後に細胞固定して、c-Src の局在を調べたところ、c-Src はアピカル膜と

バソラテラル膜の両者に局在していることが判明した。

(7) 私達は、非極性細胞での c-Src と Lyn とのトラフィック経路の差異は、N 末端への脂質修飾の違いで原因となることを明らかにして来た。すなわち、c-Src と Lyn の構造上の違いとして、Lyn はパルミチン酸修飾を受けるが c-Src はパルミチン酸修飾を受けないことが挙げられる。

そこで、Lyn のパルミチン酸修飾を受ける部位である 3 番目の cysteine を serine に置換した変異体 (LynC3S) を用いて、局在の比較を行ったところ、LynC3S は c-Src と似た局在を示すことが判明した。極性細胞においても同様のメカニズムが働いている可能性が考えられる。細胞質で生合成された Lyn は c-Src と異なり、ゴルジ領域に集積しゴルジ領域で long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3) との会合により細胞膜へと運ばれるので、Lyn-ACSL3 との会合システムと細胞極性発揮の機構解明が待たれる。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

(1) 柳瀬さゆり, 岩本 遼, 千代理恵子, 岡本彩, 福本泰典, 中山祐治, 山口直人. 極性細胞における Src 型チロシンキナーゼの局在解析: Lyn の輸送. 第 133 回日本薬学会年会 パシフィコ横浜 (横浜) 2013 年 3 月 28 日.

(2) 柳瀬さゆり, 岩本 遼, 千代理恵子, 岡本彩, 福本泰典, 山口直人. 極性細胞における Src 型チロシンキナーゼの局在解析: c-Src と Lyn の比較検討. 第 56 回日本薬学会関東支部大会 昭和大学薬学部 (東京) 2012 年 10 月 13 日.

(3) 千代理恵子, 岡本 彩, 小幡裕希, 柳瀬さゆり, 福本泰典, 中山祐治, 山口直人. Src 型チロシンキナーゼ Lyn の局在制御: Lyn キナーゼドメイン会合分子の役割. 第 56 回日本薬学会関東支部大会 昭和大学薬学部 (東京) 2012 年 10 月 13 日.

(4) 岡本 彩, 千代理恵子, 岩本 遼, 福本泰典, 中山祐治, 山口直人. Src 型チロシンキナーゼ Lyn のゴルジ領域を介した細胞内輸送経路の解析: caveolin との比較. 第 132 回日本薬学会年会 北海道大学薬学部 (札幌) 2012 年 3 月 30 日.

(5) 岡本 彩, 千代理恵子, 岩本 遼, 福本泰典, 中山祐治, 山口直人. Src 型チロシンキナーゼ Lyn のゴルジを介した細胞内輸送経路の解析. 第 55 回日本薬学会関東支部大会 東邦大学薬学部 (習志野) 2011 年 10 月 8 日.

(6) 岩本 遼, 岡本 彩, 小幡裕希, 千代理恵子, 福本泰典, 中山祐治, 山口直人. 極性細胞における Src 型チロシンキナーゼの局在解析. 第 55 回日本薬学会関東支部大会 東邦大学薬学部 (習志野) 2011 年 10 月 8 日.

[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.p.chiba-u.ac.jp/lab/maku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 直人 (YAMAGUCHI NAOTO)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 00166620

(2) 研究分担者

福本 泰典 (FUKUMOTO YASUNORI)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 10447310

中山 祐治 (NAKAYAMA YUJI)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 10280918

平成 24 年 8 月 22 日に辞退