

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 6 月 6 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23750182
 研究課題名（和文）受容体クラスター形成の光制御による細胞への人工的生体シグナル入力法の開発
 研究課題名（英文）Investigation of signal transduction mechanism through developing a photo-control system of receptor cluster formation.
 研究代表者
 吉村 英哲（YOSHIMURA HIDEAKI）
 東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
 研究者番号：90464205

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞内シグナル伝達における受容体クラスター形成の意義の理解を目的とした。この目的のため、シグナル伝達分子 Akt の 1 分子動態観察と、受容体ナノクラスターの人工的成形法の開発を行った。前者では、細胞外からのシグナル入力により、Akt の細胞膜滞在時間が延びることを見出した。この結果は、Akt 動態が細胞表面の受容体クラスターに影響されることを示している。後者では、光感応性タンパク質を融合した受容体および精製タンパク質の構築に成功し、クラスター形成の光制御を実現する道具の準備を整えた。以上のように、本研究では受容体クラスターがシグナル伝達に重要な機能を果たしていることを示し、その重要性を構成的に証明する礎を築いた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to understand importance of receptor cluster formation in physiological signal transduction. For the purpose, I performed (1) single-molecule imaging of signal transduction molecule Akt, and (2) development of photo-controlling system of receptor nano-clusters. As the result of (1), I found out that Akt residency time on plasma membrane is elongated upon external signal input. This result indicates dynamics of Akt is affected by formation of receptor clusters. In the work (2), I succeeded in constructing a fusion protein of light-responsive protein and receptor, in addition to purified light responsive protein; meaning that I completed to prepare tools to produce photo-control system of receptor cluster formation. In conclusion, I showed the importance of receptor cluster to regulate signal transduction, and prepared a basis to prove the importance by a constitutive strategy.

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	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：タンパク質、細胞・組織、生体分子、1 分子計測（SMI）

1. 研究開始当初の背景

細胞表面の受容体は、シグナルを受容する

と直径数 10 nm のクラスターを形成することが知られている。しかし、このクラスター形成が生理的にどのような意義を持っているのかは深く理解されていない。一方で、受容体を、抗体などを使ってクロスリンクすることでクラスターを形成させると、細胞内にシグナルが入力することが知られている。すなわち、受容体クラスター形成は、細胞外からのシグナル垂脂肪内に伝達するための必要十分条件であることがわかる。そこで本研究では、なぜこのクラスター形成が、受容体を介したシグナル入力に必要なのか、という命題に一定の答えを出すことを目指した。

2. 研究の目的

本研究には2つの目的がある。第一に、細胞に対して任意のタイミングかつ任意の場所に生体シグナルを入力する手法を開発することを目指している。申請者は、シグナルを受けている受容体へのシグナル入力法を開発するに当たって、シグナルを受けている受容体は直径数 10 nm のクラスターを形成することに着目した。すなわち、何らかの手法で、狙った場所に、かつ狙ったタイミングで数 10nm のナノクラスターを形成させれば、細胞上の特定の部位から任意の時間に細胞内へと人工的にシグナルが入力できるのではないかと考えた。そこで本研究では、細胞上に光照射をおこない、その光が照射されている領域に受容体ナノクラスターを形成させることで、時空間的に制御された生体シグナルを細胞に導入する手法の開発を目指す。

第二の目的はこの受容体クラスターが細胞へのシグナル入力反応に果たす機能の解明である。この目的のため、本研究では受容体からのシグナルを受けて細胞膜へとリクルートされるシグナル伝達分子 Akt の生細胞内 1 分子観察を行った。得られた結果を基に、受容体クラスターが Akt の動態に与える影響について考察する。

3. 研究の方法

本研究では、光照射によりヘテロ二量化する植物由来の光感応性タンパク質 CIB1 と CRY2 と、ナノビーズを用いて、細胞へのシグナル入力法を構築する。シグナル入力法の概略は以下の通りである。単離精製した CIB1 を、直径 40 nm の蛍光ナノビーズに修飾する。

同時に、ターゲットとする受容体に CRY2 を付加し、哺乳類培養細胞上に発現させる。ターゲットとする受容体としては、補体受容体 CD59 を用いる。CD59 は抗体を用いてクラスター形成させることで、シグナル入力することが報告されており、本手法を開発するに当たって適した対象となる。培養液に CIB1 修飾ナノビーズを加え、光照射を行うことで、CIB1-CRY2 がダイマー化を起し、CD59 がビーズの下に集まる。その結果、シグナルが入力される。

また、Akt の生細胞内 1 分子観察実験では、Akt および Akt の細胞膜結合ドメインである PH ドメインに緑色蛍光タンパク質

(EGFP) を付加したものを作成した。作成した Akt-EGFP または PH-EGFP を細胞内に発現させ、自作の光路を備えた全反射蛍光顕微鏡を用いて Akt の 1 分子動態を観察した。

4. 研究成果

まず、CRY2 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加した CD59 を作製し、培養細胞中における発現と細胞膜局在を評価した。特に、GPI アンカー型受容体である CD59 に、分子量約 70 kDa の CRY2 および 27 kDa の蛍光タンパク質を付加することで、CD59 が正しく細胞膜上に輸送されなくなる可能性がある。そこで、強力な細胞膜輸送シグナル配列である、ラクターゼ・フロリジンヒドロラーゼ (LPH) 由来の細胞膜貫通シグナル配列 (ss(LPH)) を CRY2-CD59 融合タンパク質の N 末端に付加するように設計した。上記のように設計した融合受容体 ss(LPH)-CRY2-RFP-CD59 の遺伝子を構築し、HeLa 細胞および CHO 細胞に導入した。導入後 24 時間の時点で、全反射蛍光顕微鏡を用いて観察を行ったところ、細胞膜上に GFP 由来の蛍光輝点が多数拡散している様子を観察することができた。この結果から、CRY2 を付加した CD59 を細胞膜上に正しく発現させることに成功したことがわかった。

続いて、蛍光ナノビーズ表面に修飾する CIB1 中の CRY2 結合ドメインである CIBN を作製した。CIBN のナノビーズ表面への修飾は、以下の原理に基づいて行った。本研究で用いる蛍光ナノビーズとして、ストレプトアビジンで表面修飾されているものを用意した。一方 CIBN には、エピトープタグの一種である V5 タグを付加した。CIBN-V5 をビオチン化抗 V5 抗体と反応させることで、CIBN-抗 V5 抗

体コンジュゲートを構築する。得られた CIBN-抗 V5 抗体コンジュゲートをストレプトアビジン修飾蛍光ナノビーズと反応させることで、抗 V5 抗体を介して蛍光ナノビーズ表面に CIBN を修飾することができる。

上記原理に基づき、CIBN タンパク質を取得するために、His タグと V5 タグを付加した CIBN (His-CIBN-V5) の大腸菌用発現ベクターを構築した。このベクターを大腸菌 BL21 株に導入し、液体 TB 培地中で大量発現させた。得られた大腸菌を回収し、超音波破碎を行った後、遠心分離した。得られた可溶性画分を、ニッケルキレートカラムに結合させ、イミダゾールを含む Tris-HCl バッファで溶出することで、精製 CIBN を得ることを試みた。具体的には、バッファ中のイミダゾール濃度を段階的に増加させ、得られた溶出液の SDS-PAGE を行い、CBB を用いて染色した。その結果、150 mM のイミダゾールを含むバッファで溶出された画分から、CIBN の分子量と一致する位置にバンドが検出され、かつ他の分子量の位置にはバンドは検出されなかった。さらにウェスタンブロッティングを行った結果、CBB 染色で検出されたバンドは抗 V5 抗体による染色で強く検出された。以上の結果から、大腸菌を用いた CIBN の大量発現系を構築し、さらに単離精製法を確立することに成功したと言える。

以上のように、本研究は光刺激により細胞表面の受容体分子にシグナルを入力する手法を、光受容体タンパク質とナノ粒子とのコンジュゲートにより構築することを目指した。ここまでの研究で、本手法の構築の肝となる CRY2 融合受容体を生細胞中で正常に発現させることに成功した。また、もう一つの重要な構成要素である、蛍光ナノビーズの表面に修飾させる CIBN の大量発現系を構築し、単離精製法を確立した。従って、本研究が目指す、光刺激によるシグナル入力法構築の礎を築くことに成功したといえる。

並行して、Akt の 1 分子動態解析実験を行った。まず緑色蛍光タンパク質を融合した Akt (Akt-EGFP) を発現した培養細胞を準備した。その細胞を飢餓状態に置いた後、PDGF で刺激し、刺激前後における細胞膜近辺における Akt の動態を全反射蛍光顕微鏡で観察した。その結果、細胞質全体が蛍光を示し、その中で明瞭かつ 2 次元拡散運動を示す蛍光輝点が頻繁に現われた。これは、Akt-EGFP が細

胞質から細胞膜上にリクルートされ、一定時間細胞膜上に滞在していることを示している。次に、刺激前後において、個々の蛍光輝点の存在時間、すなわち Akt-EGFP の細胞膜滞在時間を計測した。その結果、PDGF 刺激前における Akt-EGFP の細胞膜からの脱離反応速度は 17 s^{-1} であったのに対し、刺激後は 6.2 s^{-1} となった。また、10 秒間あたりで細胞膜に現われる輝点数は、刺激前は 631 個であったのに対し、刺激後は 1259 個に増大した。すなわち、血清刺激により Akt の細胞膜滞在時間は約 3 倍長くなり、リクルートされる分子数は 2 倍に増大することが明らかとなった。一方、PH-EGFP の場合、PDGF 刺激前における細胞膜からの脱離反応速度は 8.2 s^{-1} 、刺激後は 8.0 s^{-1} となり、刺激前後で大きな変化は見られなかった。また、10 秒間あたりに細胞膜にリクルートされる輝点数についても、刺激前は 717 個、刺激後は 845 となり、増大してはいるが、Akt-EGFP と比較すると増加率は有意に低いことが明らかとなった。このように、Akt の細胞膜滞在時間は、外部刺激の有無により変化する、しかし PH ドメインのみでは細胞膜滞在時間は刺激の影響を受けない、という結果が得られた(表 1)。

表 1: Akt および PH ドメインの細胞膜にリクルートされる分子数と細胞膜解離速度定数

観察分子		輝点数	$k_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$
Akt-EGFP	刺激前	631	17
Akt-EGFP	刺激 5 分後	1259	6.2
PH-EGFP	刺激前	717	8.2
PH-EGFP	刺激 5 分後	845	8.0

本来、Akt と細胞膜の間に生じる分子間相互作用の性質は、外部刺激の影響で変化するものではない。従って本研究の結果は、Akt は細胞膜上で本来の結合相手である PIP_3 以外の分子とも相互作用することで、刺激の前後の動態が異なっていることを示唆している。また、刺激前後における動態変化は PH ドメインのみでは著しく小さくなったことから、Akt は PH ドメインだけでなく、もう一つのキナーゼドメインも細胞膜へのリクルートおよび細胞膜上での滞在に重要な役割を果たしていると考えられる。これらの結果を説明しうる、かつ有力な可能性として、Akt

は細胞膜上で、受容体クラスターとも相互作用し、特定のシグナルを伝達する「反応場」となる複合体を形成しているという仮説が成立する。今後さらに Akt の細胞膜上動態と受容体との相関などについても検討し、Akt を介したシグナル伝達機構の理解を目指す。

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 1 件)

吉村英哲、小澤岳昌

「生体シグナル伝達分子 Akt の生細胞内
1 分子動態解析」

日本化学会 第 93 春季年会

平成 25 年 3 月 26 日

立命館大学びわこ草津キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 英哲 (YOSHIMURA HIDEAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：9 0 4 6 4 2 0 5

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし