

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659107

研究課題名(和文)細胞特異的RNAiコレクションを用いたエストロゲンのシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of estrogen signal pathway with cell specific RNAi collection

研究代表者

坂口 修一 (SAKAGUTI, Syuiti)

山口大学・大学研究推進機構・助教

研究者番号：90363093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：女性ホルモンであるエストロゲンはカルシウム応答やNO産生など早期応答にも関与していることが知られているがその詳細は不明である。GPCRやキナーゼに対するRNAiライブラリーによるアッセイシステムを確立し、そのメカニズム、シグナル経路の解明を行った。

ロボットアッセイシステムを開発し、96wellプレートでの同時大量測定が可能になった。エストロゲンの応答は刺激によって顕著な結果が得られたミトコンドリア膜電位を測定した。その結果、GPCRの一部の遺伝子で細胞応答が抑制される遺伝子群や促進される遺伝子群が検出された。しかし、これらのデータはばらつきがあり、さらに別の方法で検証する必要があるだろう。

研究成果の概要(英文)：Estrogen plays a role for variety of physiological functions such as cell growth and cell differentiation through transcriptional regulation by nuclear estrogen receptors. However, intracellular pathways such as calcium influx and NO production in early responses occurred by estrogen stimulation have been unclear. To elucidate the early responses for the cells by estrogen, we have carried out high-throughput negative screening assay using RNAi library of GPCRs and kinases.

To determine accurately, we developed automation assay by JANUS, robot assay workstation using 96-well plates, and the cell response by estrogen stimulation was measured using mitochondria membrane potential assay in the RNAi-transfected cells. In several GPCR genes, mitochondria activities were significantly inhibited, suggesting the estrogen-dependent cell growth may be regulated by plasma membrane GPCRs. However, the results were further confirmed by the additional experiments.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：RNAiコレクション エストロゲン シグナル伝達経路

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンである E2 は、女性生殖器はもちろん、心血管や脳などに多彩な生理作用を有している。これらの作用は核内受容体であるエストロゲン受容体(ER)がタンパク合成を介して作用している。しかし、E2 は、血管の弛緩作用や細胞内 Ca²⁺の流入など転写が関与しない急性期の反応を引き起こすことも知られている。このため、細胞膜に E2 受容体が存在することが示唆され続けてきた。私たちの研究室では、心筋細胞でストレスに反応する受容体を探索し、GPR30(ratGPR41/GPER-1)がストレスに反応して転写誘導されることを示し、ガン抑制遺伝子を活性化しアポトーシスを誘導することを示した。その後、米国のグループは、GPR30 が小胞体に存在する E2 の受容体であることが発表した。同時期に私たちの研究室では、細胞膜に存在する E2 の受容体であることを初めて証明し、現在では E2 は、細胞膜受容体であることが認知されつつある。しかし、GPR30 は E2 の受容体ではないという論文や生殖器で機能を果たしていないという論文が出され、結論は未だ混乱している。この最大限の原因は、E2 のシグナル経路に対する網羅的な解析が行われていないことにある。その理由は、E2 の作用は多彩であることに加え、細胞毎に生理機能が異なるためシグナル経路も複雑なためである。細胞に存在しない遺伝子の抗体や RNAi は、クロスコンタミを起こし、データに大きなノイズを与えている。

2. 研究の目的

このような問題点を解消するため次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現データを取得し細胞特異的 RNAi コレクションを作製し、生殖細胞に対する E2 シグナル経路を完全に解明する。そこで私たちの研究の目的は、解析モデルとして子宮ガン由来の細胞株である HeLa 細胞に発現している遺伝子を次世代シーケンサーで解析し、発現しているシ

グナル伝達因子を明らかにする。発現しているシグナル伝達因子に対する RNAi コレクションを作製し、細胞インピーダンス法を用いて E2 刺激後の細胞応答を調べる。細胞応答に関連したシグナル伝達因子について IPA パスウェイ解析ソフトを駆使してシグナル経路を明らかにする。正常な子宮平滑筋を用いて HeLa 細胞で解析したシステムと同様の解析を行い、正常細胞におけるエストロゲンシグナル経路の解析を行う。遺伝子解析データをコンピューターシステム上で解析し、正常とガン細胞の応答変化を解明することである。

3. 研究の方法

(細胞培養)ヒト由来の培養細胞として子宮ガン細胞由来の HeLa 細胞をモデル細胞に用いる。正常細胞モデルとして子宮平滑筋細胞を用いる(クラボウ)。細胞培養を指定の増殖培地を用いる。但し、E2 刺激時は、血清はチャコール処理を行い、フェノールレッドを除いた培地を用い E2 の影響を除外する(次世代シーケンサーによる解析)細胞からこれまでに確立した手法で RNA を回収し、純度を確認後、SAGE 解析キットに従って逆転写する。その後、制限酵素で 14bp の断片を作製した後、SAGE ライブラリーを作製する。このライブラリーを次世代シーケンサー SOLiD5500(Life technologies)を用いて解析する。すでに HeLa 細胞の解析は終了し、約 19000 種類の遺伝子の発現データを取得している。

(RNAi コレクションの作成)

シグナル経路を同定するため、全キナーゼ遺伝子約 850 種類中、HeLa 細胞で発現が確認されたキナーゼ 185 種類のレンチベクター shRNA コレクションを外注する(Sigma)。RNAi ベクターは抑制が確認されている配列を優先して用いる。

(RNAi 遺伝子の導入)

導入効率を高めるためポリブレンをウイル

スペクターに加え RNAi ベクターを導入する。これまでに基礎データではポリブレンを加えることでほぼ 100%の HeLa 細胞に導入することが確認できている。

(細胞インピーダンス法および Ca²⁺測定によるアッセイ)

細胞インピーダンス法は細胞増殖や細胞死の微小な変化を精度良く再現できるアッセイである。これまでも E2 の細胞膜への結合活性を測定することに成功している。また、E2 刺激下での細胞インピーダンスは、xCELLigence(ロッシュ)や ECIS(electronic cell impedance sensing)を用いて数多く測定しており E2 のシグナル経路の測定は既に確立されている。

(IPA パスウェイ解析)

複数のシグナル経路の遺伝子から細胞で活性しているパスウェイを IPA ソフトを用いて解析する。IPA は毎週最新のデータに更新されており、高い信頼性を有している。申請者らは、既に脳領域別プロテオーム解析を行い、海馬や前頭葉に特異的に存在するシグナル経路の解明に成功している。E2 シグナル経路についても同様の手法で解析する。

(同定されたシグナル経路の確認)

同定されたシグナル経路について E2 刺激後のリン酸化抗体での IP ウェスタンやリン酸化特異的抗体を用いて活性化経路の確認を行う。また、シグナル経路の下流で活性化される転写活性をルシフェラーゼベクターを用いて測定する。

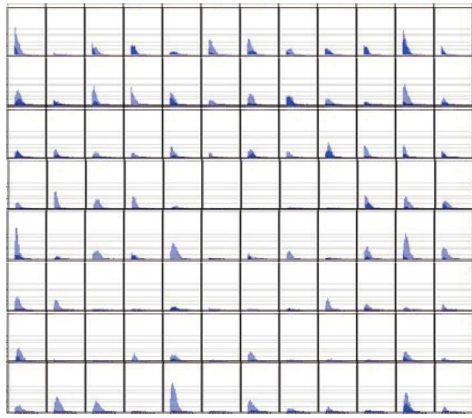
(正常子宮平滑筋での E2 シグナル経路の解明)

ヒト正常子宮平滑筋細胞を購入(クラボウ)し、細胞を増殖させ、HeLa 細胞と同様に RNA を調製する。RNA から逆転写、制限酵素処理を行い、SOLiD5500 で SAGE 解析を行う。この結果をベースにしたシグナル伝達因子の RNAi コレクションを作製し、正常細胞の E2 シグナル伝達経路の解明を行う。実験手技は、

HeLa 細胞で確立した手法を用いる。

4. 研究成果

私たちは、次世代シーケンサー-SOLiD で細胞の全発現遺伝子を確認した。その結果、予想外にキナーゼ遺伝子の発現量は多く、全キナーゼの 95%以上の遺伝子の発現が確認された。このため、全てのキナーゼに対する RNAi コレクションを用いることにした。大量の RNAi を実験に用いるため、RNAi の導入をロボット分注装置で行うことができるように予備試験を実施した。予備試験では、384 プレートでは、各ウエルの面積が小さく、細胞がばらつき、安定した結果を得ることが困難であった。そこで 96 ウエルプレートに変更し、刺激前後で細胞の増殖を確認した結果、安定したデータを得ることができた。また、活性を測定するため、ミトコンドリア膜電位の測定と核 DNA 量を測定する方法で検討した。その結果、ミトコンドリア膜電位はダイナミックレンジが狭く、定量精度に問題がある可能性があり、再度細胞増殖は、生細胞(赤)と死細胞(緑)に染色する蛍光試薬を用いて精度良く活性ミトコンドリア膜電位の測定する手法を確立した。さらにヘキストで核 DNA 量を測定し細胞数を補正することでエストロゲン刺激後、3 日で数倍以上活性に差がある実験条件を確立した。この手法を用いて 96well プレート 16 枚を同時測定しシグナル経路に関与する全 RNAi を細胞に導入し、細胞増殖が抑制されたウエルを測定した。しかし、大量に測定したためタイムラグが生じ、プレート測定に時間がかかり、前半と後半部分でのデータが合わず、データを解析するだけの精度を得ることができなかった。データの精度には多少問題はあったが、細胞に発現している全ての GPCR 及びキナーゼについて RNAi を遺伝子導入し、コントロールおよびエストロゲン刺激における細胞応答の変化を 4 回ずつ測定しエストロゲン刺激に応答する遺伝子群を検討した。



図に示すように遺伝子の欠損によって細胞の増殖を抑制する遺伝子群および増殖を促進する遺伝子群が存在していた。

しかし、これらのデータにはばらつきが大きくデータの信頼性を確保するためには、さらに繰り返し測定する必要がある。今後、データの信頼性を確保するため、ロボットアッセイの効率的な測定と細胞アッセイシステムの改良を行い、精度の高いデータを取れるように実験条件を改善する予定である。

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)

Nakashima, T., Ohkusa T., Yoshida M., Lee J.-K., Mizukami Y., Yano M., Alterations in cardiac β -catenin precede connexin gap junction remodeling in cardiomyocytes exposed to rapid electrical stimulation, *Am. J. Physiol. (Heart and Circulatory Physiology)*, 2014 May, 306 (9) :H1324-33. Epub 2014 Mar 7. doi:

10.1152/ajpheart.00653. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

坂口修一, 吉田貢太, 渡邊健司, 遠山卓, 坂井勇介, 水上洋一, 次世代DNAシーケンサー解析ソフトの違いによるバリアントの検出, 日本分子生物学会総会 2013.12.3-6 神戸(神戸国際展示場)
遠山卓, 宇留島裕, 坂井勇介, 山本初実, 吉田貢太, 山野聖子, 渡邊健司,

濱野公一, 水上洋一, 疾患で同定されたエストロゲン細胞膜受容体

GPER/GPR30 変異タンパク質は蛋白分解を介して細胞増殖を制御している, 日本分子生物学会総会 2013.12.3-6 神戸(神戸国際展示場)

水上洋一, Cancer Panel を用いた遺伝子変異解析, Ion Torrent User Meeting 2013, 大阪(メルパルク大阪)2013.7.10

Yusuke Mimura, Ronan Kelly, Louise

Unwin, Simone Albrecht, Yoichi Mizukami,

Margaret Goodall, Tsuneo Matsumoto, Roy

Jefferis, Pauline M Rudd, Increased

sialylation of a recombinant IgG mutant

produced in human embryonic kidney 293

(HEK293) cells Abstract for 15th ICI Milan

(Italy)22-27Aug 2013

水上洋一, 相原正宗, 遠山卓, 佐藤俊,

井上雄太郎, 山縣芳明, 田村功, 前川亮,

西岡弘子, 緒方勤, 嶋雄一, 諸橋憲一郎,

杉野法広, 子宮筋腫で検出されたエスト

ロゲン細胞膜受容体 GPR30/GPER の新規

SNP は細胞増殖を促進する, 日本分

子生物学会総会 2012.12.11-14 福岡

(マリンメッセ福岡)

狩生徹, 西岡弘子, 畑中千春, 坂口修一,

井上雄太郎, 山本滋, 岡正朗, 水上洋一,

次世代 DNA シーケンサー-SOLiD5500

を用いた乳ガンでのエストロゲン受容

体を誘導する遺伝子変異の探索, 日本分

子生物学会総会 2012.12.11-14 福岡

(マリンメッセ福岡)

井上雄太郎, 遠山卓, 狩生徹, 山縣芳明,

前川亮, 田村功, 山野聖子, 杉野法広,

水上洋一, 次世代シーケンサーを用い

た子宮筋腫におけるガン関連遺伝子の

スクリーニング, 日本分子生物学会総会

2012.12.11-14 福岡(マリンメッセ福岡)

〔図書〕(計 1件)

水上洋一, 渡邊健司, 坂口修一, 一次世

代シーケンサーの現状と問題点について-, 遺伝子・DNA 利用も製品開発におけるガイドラインでは分からない規制・倫理対応と解析、操作技術のトラブル対策、技術情報協会編(印刷中)(2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂口 修一 (SAKAGUTI, Syuiti)
山口大学・大学研究推進機構・助教
研究者番号： 90363093

(2)研究分担者

水上 洋一 (MIZUKAMI, Yoichi)
山口大学・大学研究推進機構・教授
研究者番号： 80274158