

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670088

研究課題名(和文)細胞内シグナルの光操作と改良型FRETプローベによる生体内生化学

研究課題名(英文)in vivo biochemistry using optogenetics of cell signaling and FRET probe

## 研究代表者

中田 隆夫 (NAKATA, Takao)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50218004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物のしくみと、試験管内の化学反応の違いは、それぞれの反応が細胞のなかで、きちんと時間空間的に仕切られていることである。細胞運動、細胞の発生成長に大変重要な分子であるactinですら、25年ほどまえの、RAC1、CDC42がそれぞれlamellipodia とfilopodiaをactinを重合する方向に制御されているという結論を超えていない。我々はCDC42、RAC1の光スイッチを用いて、細胞内での蛋白の活性を顕微鏡下で変化させながら、下村博士の研究で有名なGFPを用いた改良型FRETプローベを用い、actin markerのLife-act-mCherryの変化を観察した。

研究成果の概要(英文)：The difference between cells and chemical reaction in test tube was probably each reaction was properly organized in time and space. However, how the chemical reactions propagate in cells were still unknown. Actin is one of the most fundamental protein for cell motility and cytoarchitecture. However, its study on their regulatory mechanisms were not progressed for this 25 years, such as CDC42 and RAC1 polymerize actin filaments of filopodia and lamellipodia. We use photoswitch of CDC42 and RAC1 to regulate spatiotemporal regulation of these proteins, and monitor the cellular phenotypes using the FRET sensor and Life-act mCherry markers,

研究分野：細胞生物学

キーワード：光スイッチ 解剖学 細胞組織 シグナル伝達 神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム科学のデータの蓄積は、バイオインフォマティクスの発展を支えている。それぞれのシグナル分子の構造のみならず、様々なシグナル分子との結合部位、ノックアウトマウスの表現型などの情報が加えられている。網羅型探索のような実験では、研究者があまり接したことの無い蛋白がヒットすることも屢である。このため各タンパクの機能情報は大変重要で、頻りにアップデートされるべきである。しかし、actin 細胞骨格による細胞運動、細胞の発生成長には、大変重要な分子であるにも関わらず、25 年ほど前の、RAC1, CDC42 がそれぞれ lamellipodia と filopodia を actin を重合する方向に作用するという結論を超えていない。これは、過剰発現、ノックアウトとは別の研究方法が無かったからである。

## 2. 研究の目的

これまで 25 年間不変であった、RHO ファミリー蛋白の CDC42, RAC1 の細胞内機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

我々は CDC42, RAC1 の光スイッチを用い、改良型の FRET プロローベおよび actin プロローベの Life-act-mCherry の変化を観察した。FRET プロローベの改良には、主要な構造は保ったまま、蛍光分子を変えることで可能性を探った。

## 4. 研究成果

### (1) 改良型 FRET プロローベの作成

これまでの YFP, CFP を使ったプロローベを、まず mRuby, mClover を使ったプロローベに変換したが、予想ほどの変化はなかった。そこで mClover を YPet に変えた FRET プロローベを作成し、それ以前のものと比較した。すると、少ない励起レーザー (458nm) で十分な FRET 効果が得られたため、さらに細胞を使った実験を行った。培養された COS7 細胞に FRET プロローベおよび CDC42 も発現する細胞を使って実験を行った。図 1 は、

3つの細胞に新しい FRET プロローベが発現しているが CDC42 は右下の細胞にしか発現していない。そのため右下の細胞のみ黄緑色に光って見えており、残りの細胞はダークブルーのままであり、画像上でのコントロールになっている。発現のある細胞を詳しく見ると最も発現が強いのが画像中央の突起の部分である。そこから細胞の上半分の膜部分に蛍光が広がっているのがわかる。これは、これまでの COS7 への CDC42 の作用が強い部分と一致するので、このプロローベは予想通り CDC42 の活性をこの細胞で見ているというように考えられた。この方法の結果、短い波長域で異なる物質の細胞内濃度や活性を測る可能性がますます高まったと言える。これについてはさらにペアとなるもう一つのプロローベとの組み合わせ実験を推進する。

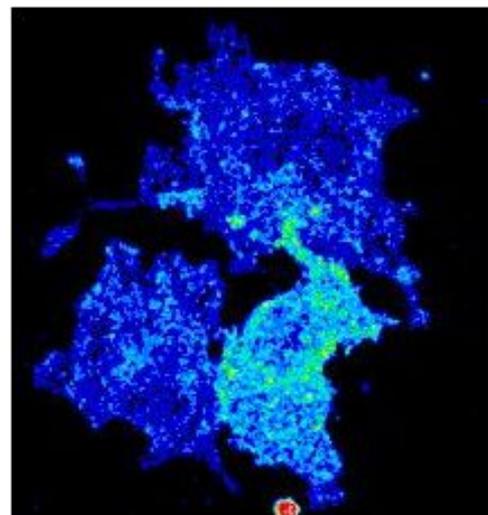
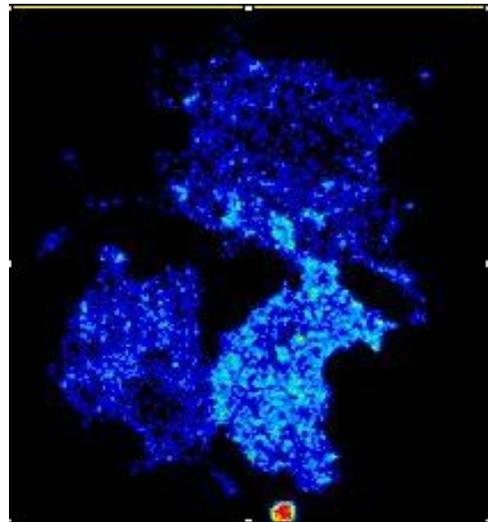


図 1

## (2) CDC42 活性の他の測定について

今回 FRET による活性測定の改良に成功したが、一方ではやはり使える波長域が小さいため十分な光量や高い解像度は得られなかった。これはもちろん予想通りのことではあったが、活性等を比較する場合に、あるいは科学的発見を主張する場合にも高い解像度のデータを得ることは必須である。今回 actin プロローベ、Life-act-mCherry の局在が細胞内の CDC42 の活性を示す良い指標となりさらに低い濃度で良く見えることから、この actin マーカーを活性の指標として用いることで、これまで不明であった CDC42 の様々な機能について知見が得られたのでさらに報告し、このプロローベと他のマーカー (FRET プロローベなど) を用いることで細胞内のいくつものタンパクの機能を見ることができのではないかという説を提唱する。Life-act は F-actin の量に比例して actin に結合する合成ペプチドである。これを細胞にかけると、actin 濃度の高いところでは濃度が高く、F-actin の無いところでは濃度が低くなる。これがよく actin の濃度に正比例するのでこの濃度が actin の濃度の指標となるとされている。我々の実験でも確かに Life-act は COS7 における F-actin の分布と非常によく一致するので、我々の系でも正しいということが分かった。我々は画像処理で Life-act の濃度を7色の疑似カラーに分けて見たところ、その分布に非常に興味深い傾向を見出した。この際 Life-act の濃度が最も高い部分は赤 - 白、やや高い部分は黄 - 緑、そして低い部分は水色 - ダークブルーになるように設定した (図 2)。この設定は細胞や実験によらず、一定にした。すると細胞に PARac1 を作用させると lamellipodia が生成され、それが細胞膜上で丈が伸びることが分かっている。一方、CDC42 を COS7 に作用させると、最も変化が起きるのは細胞の角の部分であり、そこが一旦欠けてひしゃげたようになり、そこからまたいろいろな構造ができてきたりする。これまで似たような G タンパクを作用させてもなぜ細胞の角と辺の違うところに作用するのか、あるいは違った G タンパクだと違った作用が起きるのかということは十分わかっていなかった。一方、actin フィラメン

トは actin の重合でできるタンパク質複合体であり、我々が最もよく研究をし多くの知見を得ているタンパクであるが、その水溶液に3種類の異なる状態があることは一部のモデル生物あるいは生物物理学を研究している研究者しか知らない事実がある。これは actin が繊維状のポリマーを形成していることによるもので、ある濃度以上になって繊維が同じ方向に配向するとそこから1個1個の分子が出るのが難しくなるため、濃度から考えられる粘性よりも実際の粘性がはるかに上がるというものでポリマー一般に起こりうる性質であるが、actin 分子でもそのような変化が起こることが分かっている。しかしその生物学的な意味や応用については分かっていなかった。今回 CDC42 を作用させた COS7 の Life-act 像を見ると、RAC1 で染まる細胞では一般の細胞膜は緑、細胞の中心は青に染まる。一方 lamellipodia の形成される部分はもっと高い濃度に染まるかと思いきや、実際は緑～黄緑とやや上昇というぐらいにしか染まらなかった。一方 CDC42 では核の部分が強い白や赤に染まり、一般膜は緑～青緑の間であった。高い白や赤の部分は隣り合う黄緑の部分と接してはいるが、すぐに混ざり合うということではなかった。そして新たに突起や枝ができるときにはその部分の光り方が弱くなることで突起や枝の形成が行われた。これらの結果から、細胞の RAC1 や CDC42 は actin フィラメントの粘性についての生物学的な特徴を用いて、普通なら拡散によって混じってしまうタンパクをその濃度によって分けて使うという機構が成立しているのではないかと考えられた。これは我々の最初からの疑問である、なぜ細胞内で対称な状態から非対称なタンパクの分布が起きるのか、という最も基本的な問題に対する答えの一つになるかもしれない、さらなる検討を早急に行いたいと考えている。

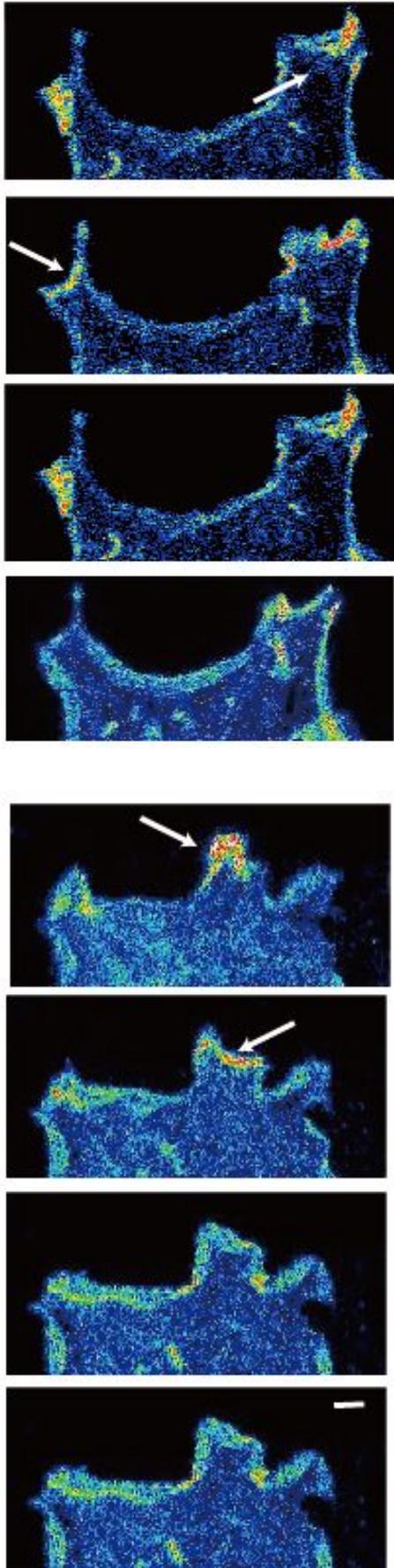


図 2

#### 4. 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)

中田隆夫: 光遺伝学を用いた分泌経路の研究  
第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会  
2015 年 3 月 神戸

#### 5. 研究組織

(1)研究代表者

中田 隆夫 (NAKATA Takao)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授

研究者番号: 50218004