

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871120

研究課題名(和文)細胞極性形成におけるポジティブフィードバック機構の1分子イメージング解析

研究課題名(英文) PtdIns(3,4,5)P3 suppresses PTEN membrane binding in spontaneous formation of cellular polarity

研究代表者

松岡 里実 (Matsuoka, Satomi)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：00569733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の進行方向を決定するシグナル分子であるPtdIns(3,4,5)P3 (PIP3)が、PIP3の脱リン酸化酵素であるPTENの細胞膜への局在化を抑制することを明らかにした。1分子イメージングデータの統計解析から、活性状態のPTENはPIP3が結合すると脱リン酸化に伴い細胞膜から排除されることが分かった。不活性状態のPTENはより安定に細胞膜に結合するが、PIP3レベルが上がると活性状態へ遷移することが分かった。これらのメカニズムによるポジティブフィードバックを介してPIP3とPTENの相互排他的な分布が自己組織的に生じ、細胞の自発運動を実現すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：PtdIns(3,4,5)P3-enriched domain on cell membrane directs cell migration. I have examined single-molecule behaviors of 3-phosphatase, PTEN, in living Dictyostelium discoideum cells. PTEN undergoes transitions among 3 states with different lateral diffusivities. Enzymatically active state is the moderate one. Dephosphorylation accompanies prompt membrane dissociation. An amount of the active state depends on transition from the slowest state. PtdIns(3,4,5)P3 suppresses this state, finally reducing the PTEN amount on the membrane. Thus, PtdIns(3,4,5)P3 excludes PTEN from the membrane, illustrating that the positive feedback causes spontaneous formation of the domain in random cell migration.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞極性 1分子イメージング PTEN PtdIns(3,4,5)P3 自己組織化 細胞性粘菌

1. 研究開始当初の背景

細胞の移動運動には前後極性の形成が伴う。細胞が前進するためにはアクチンの重合が前側で活性化される必要があり、これに先立って活性化に関わるシグナル分子、例えばイノシトールリン脂質 PI(3,4,5)P₃ が細胞膜上で極性を形成する [Swaney et al. 2010]。この極性は、走化性運動においては誘因物質の濃度勾配の方向に従って形成され、自発運動においてはランダムな方向に形成される [Arai et al. 2010]。従って、シグナル分子の極性は、細胞外に空間的に非対称な刺激があつて初めて生じるのではなく、細胞内で起こる分子間相互作用に基づいて自律的に形成される。その過程ではどのような分子機構が働いているのだろうか。ある分子が細胞膜上に存在するとその周囲に同じ分子が存在しやすくなるというポジティブフィードバック機構が働くことが想像される。これにより、その分子は細胞膜平面上で空間的な広がりをもつドメイン状に存在することが可能となり、非対称性を生む、すなわち極性を形成することができると考えられる。しかし、現在までこうしたポジティブフィードバック機構の分子メカニズムが明らかにされた例はほとんどない。これは、通常の顕微鏡法によってシグナル分子の集団的振る舞いを観察するのみでは、極性形成後の動態しか解析できないためだと考えられる。すなわち、シグナル分子が細胞膜上で極性を形成する過程を個々の分子の動態に基づいて明らかにする必要がある。

PI(3,4,5)P₃ のレベルは主にリン酸化酵素 PI3K と脱リン酸化酵素 PTEN によって制御される。PTEN は細胞膜全体に局在化しているが PI(3,4,5)P₃ レベルの高い仮足からは排除される。もし PI(3,4,5)P₃ が PTEN の細胞膜結合を抑制するような制御機構があるとすれば、PI(3,4,5)P₃ の周囲に PI(3,4,5)P₃ が存在しやすくなるというポジティブフィードバックが成り立つだろう。そこで、本研究では、細胞膜上での個々の PTEN 分子の動態を解析することにより、PTEN の細胞膜結合に対する PI(3,4,5)P₃ による抑制作用について検証しメカニズムを明らかにすることを計画した。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の生きた細胞で 1 分子イメージングによって可視化すると、PTEN の細胞膜結合時間は平均 310 msec であり、ダイナミックに細胞膜と細胞質の間を行き来している [Vazquez et al. 2006]。研究開始当初までに、PI(3,4,5)P₃ を基質として結合しない変異型 PTEN (PTEN_{G129E}) の野生型細胞での 1 分子イメージングにより、多状態反応モデルを得ていた [Matsuoka et al. 2013]。すなわち、個々の PTEN_{G129E} 分子は、一過的な細胞膜結合の間に拡散係数の異なる 3 つの細胞膜結合状態 (拡散係数の小さい方から、安定結合状態、初期結合状態、弱結合状態) をとりうる。このモデルにより、PTEN が仮足の細胞膜から排除される過程で

は、仮足で安定結合状態が抑制されるために細胞後部より結合頻度が低く解離速度が速くなることがわかった。一方、ここで用いた PTEN は PI(3,4,5)P₃ を脱リン酸化しないため、PTEN と PI(3,4,5)P₃ との相互作用を介した PI(3,4,5)P₃ に対するポジティブフィードバック機構を理解するためには、野生型 PTEN の動態を説明するモデルへと拡張する必要があり、これを本研究の目標とした。

2. 研究の目的

細胞性粘菌の極性形成に関与する PTEN に着目し、ポジティブフィードバック機構の分子メカニズムを解明する。このために、PTEN の細胞膜上での動態を 1 分子顕微鏡法によって解析し、極性形成過程における細胞膜脂質分子との相互作用を定量的に明らかにする。

3. 研究の方法

PTEN の細胞膜上での 1 分子動態を解析し、PI(3,4,5)P₃ との相互作用に依存した変化を定量的に明らかにすることで、PI(3,4,5)P₃ による抑制作用について検証し分子メカニズムを解明する。このため、(1) 生きた細胞において細胞膜の PI(3,4,5)P₃ レベルを操作できる実験系を構築し、PI(3,4,5)P₃ レベルをモニターしながら PTEN の細胞内局在を解析することで、PI(3,4,5)P₃ が PTEN の細胞膜局在化を抑制する可能性を検証した。(2) PI(3,4,5)P₃ レベルの異なる細胞において、PTEN の 1 分子イメージングと統計解析を行い、細胞膜に結合してから解離するまでの状態変化を説明する数理モデルを構築した。(3) 酵素反応に依存的・非依存的な制御機構を明らかにするため、PI(3,4,5)P₃ を脱リン酸化できない PTEN_{G129E} についても同様の実験・解析を行った。PI(3,4,5)P₃ レベルの高低および脱リン酸化活性の有無の計 4 つのモデルを比較し、PI(3,4,5)P₃ による PTEN の抑制の分子メカニズムを解析した。実験・解析の具体的方法を個別に以下に記す。

細胞性粘菌の培養

細胞性粘菌の増殖期の細胞は HL5 培地を用いて 21 °C において静置で培養した [Matsuoka et al., 2003]。プラスミドを導入した各種遺伝子の恒常的発現細胞は、20 µg/mL Geneticin あるいは 10 µg/mL Blasticidin の存在下で選択シクロン化したものを維持した。

遺伝子発現プラスミドの作製

PI3-kinase 恒常的活性化のために、細胞性粘菌の走化性運動において活性の大部分を担う PI3K2 の N 末端に細胞膜への局在化を促すシグナル配列を付加したコンストラクト (myrPI3K2) を作製した。シグナル配列は、chicken c-Src に由来する 16 アミノ酸 (MGSSKSKPKDPSQRRR) からなり、ミリスチル化シグナルと塩基性アミノ酸のク

ラスターを含む。

PTEN_{WT/G129E}-Halo と PI(3,4,5)P₃ のプローブである PH-GFP の同時発現のためのプラスミドは、2つのプラスミド (pDM344 および pDM181) のマルチクローニングサイトにそれぞれ PTEN_{WT/G129E}-Halo および PH-GFP をクローニングした後、細胞性粘菌の染色体外プラスミドとして機能する pDM181 に pDM344 由来の PTEN_{WT/G129E}-Halo 発現カセットを融合して作製した[Veltman et al., 2009]。

細胞の調整

全ての実験は、細胞性粘菌の飢餓状態にある細胞を用いて行った。培養した細胞をバッファに置換し 21 で 4 時間おくことで飢餓状態の細胞を得た[Matsuoka et al., 2006]。また、アクチン骨格に依存しないダイナミクスを解析するため、5 μM Latrunculin A の存在下で行った。

PTEN_{WT/G129E} のイメージングでは、飢餓処理の最後の 30 分間に蛍光標識反応を行った。細胞に発現させた PTEN_{WT/G129E}-Halo を tetramethylrhodamine (TMR) を共有結合した Halo タグリガンドで標識した。共焦点イメージングでは 5 μM、1 分子イメージングでは 10 nM 以下のリガンド濃度で標識反応を行った。

細胞膜の PI(3,4,5)P₃ レベルの操作

高 PI(3,4,5)P₃ 状態の細胞として、飢餓処理を行った myrPI3K2 恒常的発現細胞を静止状態においたものを使用した。この細胞に 40 μM の LY294002 を添加して 30 分以上放置した状態を低 PI(3,4,5)P₃ 状態とした。

マルチカラー共焦点イメージング

生細胞における PTEN_{WT/G129E}-Halo+TMR および PH-GFP のマルチカラー共焦点イメージングは、Nikon A1 システムを用いて行った。飢餓状態の細胞を適当な細胞密度になるよう直径 35 mm のガラスボトムディッシュにまいてバッファで満たし、顕微鏡で観察した。

1 分子イメージング

生細胞を用いた PTEN_{WT/G129E}-Halo+TMR の 1 分子イメージングは、対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡を用いて行った。飢餓状態の細胞を適当な細胞密度になるように直径 25 mm のカバーガラスにまき、厚さ 0.17 mm の 1 cm 角のアガロースシートをかぶせた。これをチャンバーにセットして顕微鏡で観察し、分子が細胞の底面側の細胞膜に結合する様子をビデオレート (毎秒 30 フレーム) で記録した。

1 分子動態の数理モデル構築

1 分子の輝点の空間的な広がりを 2 次元ガウス分布でフィッティングして位置を推定し、分子が細胞膜に現れてから消えるまで

の位置の変化の軌跡を得た。観察された全ての分子の軌跡データを元に、lifetime-diffusion 解析を行った[Matsuoka et al. 2009; Matsuoka 2011]。これにより、固有の拡散係数によって分子の状態を区別することで、細胞膜との間の相互作用の違いによる多状態を統計的に明らかにした。さらに、時系列データが示す複数の統計的特徴に基づいて、多状態の間での遷移反応の有無を判別し、分子反応 (細胞膜結合・解離、多状態間遷移) を記述するスキームを推定した。決定した反応スキームを連立微分方程式によって数学的に記述し、解となる方程式を算出した。この式によって 1 分子時系列データを近似することで、各反応の速度論的パラメータを定量化した。これにより、各反応の速度定数を含めた多状態反応モデルを構築した。

4. 研究成果

(1) PI(3,4,5)P₃ は PTEN の細胞膜局在化を抑制する

PTEN の細胞膜局在量の PI(3,4,5)P₃ レベルに対する依存性を明らかにするため、生きた細胞内で PI(3,4,5)P₃ レベルを変調する系を構築し、PTEN の細胞膜局在量をイメージングにより定量化した。PI(3,4,5)P₃ レベルをモニターするのに用いる PH ドメインは、静止状態にある野生型細胞では細胞質に局在する。しかし、myrPI3K2 を過剰発現させると、細胞膜全体に PH ドメインが局在する様子が観察された。細胞膜での PI3K 活性が上昇したことで、恒常的に PI(3,4,5)P₃ レベルが上昇していることを確認できた。この細胞では PTEN_{WT} は主に細胞質に局在する様子が観察された。PI(3,4,5)P₃ レベルの低い野生型細胞では PTEN_{WT} は細胞膜に局在することから、PI(3,4,5)P₃ が PTEN_{WT} の細胞膜局在化を抑制することが示唆された。実際、myrPI3K2 発現細胞に 40 μM の LY294002 を添加して PI3K 活性を阻害すると、細胞膜上の PI(3,4,5)P₃ レベルは低下し PTEN_{WT} は細胞質から細胞膜へと局在変化を示した。これらの結果から、PI(3,4,5)P₃ が PTEN の細胞膜局在を抑制する負の制御機構が存在することが分かった。PI(3,4,5)P₃ と PTEN の相互排他的な局在を形成する過程でポジティブフィードバックが働く可能性が示唆された。

(2) PTEN は PI(3,4,5)P₃ を脱リン酸化すると速やかに細胞膜から解離する

PI(3,4,5)P₃ が PTEN の細胞膜局在化を抑制する機構を分子レベルで明らかにするために、(1) で用いた PI(3,4,5)P₃ レベルの高低の 2 条件で PTEN_{WT} の 1 分子イメージングを行った。まず、細胞膜結合時間を 1 分子ごとに計測し頻度分布を作成した。最頻値を比較すると、PI(3,4,5)P₃ レベルが低い場合には 100 msec であるのに対し、高い場合には 66 msec であった。つまり、細胞膜に結合してからおよそ 66 msec の間に PI(3,4,5)P₃ を結合して脱

リン酸化し、細胞膜から解離すると言える。平均値を比較すると、PI(3,4,5)P₃ レベルが低いと 440 msec であるのに対し、高いと 340 msec であった。PI(3,4,5)P₃ は、PTEN_{WT} の個々の分子レベルで細胞膜結合時間を短くすることによって、分子集団レベルでの細胞膜局在化を抑制することが分かった。

次に、細胞膜に結合している間にどのように拡散運動するかを解析した。まず、PTEN 分子が 33 msec 間に移動した距離を網羅的に計測して頻度分布を作成し、拡散方程式によって近似した。その結果、PTEN_{WT} は細胞膜上で拡散係数の異なる 3 つの状態をとることが分かった。拡散係数は PI(3,4,5)P₃ レベルの高低によらず 0.01, 0.04~0.05, 0.49~0.51 μm²/sec であった。次に、細胞膜に結合してから任意の時間が経過した分子に注目し、次の 33 msec 間に移動した距離の頻度分布を同様に解析した。細胞膜に結合した瞬間からの 33 msec 間では、PI(3,4,5)P₃ レベルが高い細胞で 91% の分子が拡散係数の中庸な初期結合状態をとることが分かった。したがって、この状態が酵素として活性のある状態であると推測される。一方、時間の経過に伴いこの割合は変化し、結合してから 500 msec 以降は 3 つの状態が同じ割合で存在し続けることが分かった。この結果は、細胞膜に結合した PTEN 分子が 3 つの拡散係数の異なる状態の間を遷移することを示している。

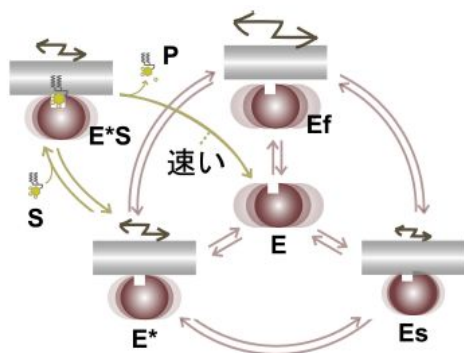


図 PTEN の多状態反応スキーム

これらの結果に基づき、状態間遷移反応、酵素反応、細胞膜解離反応からなる分子反応モデルを構築した(図)。各状態をとる確率の時間変化を説明する連立微分方程式によってモデルを数学的に記述し、解析的にこの解を得た。これを用いて上述の実験・解析結果を近似することで、全反応パラメータを推定することができた。結果として、PTEN は初期結合状態(E*)にあるとき PI(3,4,5)P₃ の脱リン酸化反応を触媒し、これには細胞膜解離速度定数の上昇が伴うことが分かった。反応後は反応前より細胞膜結合が不安定になり、速やかに細胞質へ移行すると考えられる。また、拡散係数の最も小さい安定結合状態(Es)にあるときに細胞膜解離速度定数が最も小さく、安定に細胞膜に結合していた。不活性状態の分子を細胞膜上に保持しておくプー

ルの役割を果たすと考えられる。PI(3,4,5)P₃ レベルが高いとこの状態が抑制されて活性状態へと遷移し、結果として細胞膜から解離しやすくなることが分かった。PTEN は 1 分子の PI(3,4,5)P₃ を脱リン酸化すると細胞質へ移行するため、細胞膜上のプールを使い果たすほどに PI(3,4,5)P₃ レベルが上昇すると細胞膜から PTEN を排除することとなり、PI(3,4,5)P₃ と PTEN の排他的局在が安定に形成されるポジティブフィードバックを生むと考えられる。

(3) 脱リン酸化活性に依らず PI(3,4,5)P₃ が PTEN の細胞膜局在化を抑制する経路が存在する

PI(3,4,5)P₃ による PTEN の抑制機構の酵素活性依存性についてさらに検証するために、同様の実験と解析を PI(3,4,5)P₃ を基質として結合できない変異型である PTEN_{G129E} に対しても行った。まず、細胞膜局在量の PI(3,4,5)P₃ レベル依存性を解析した結果、PTEN_{WT} と比べて程度は小さいものの、PI(3,4,5)P₃ レベルが高いと細胞膜局在量が低下することが分かった。次に、1 分子の細胞膜結合時間を計測した結果、PI(3,4,5)P₃ によって短縮されることが分かった。ただし、最頻値および平均値は PI(3,4,5)P₃ レベルの高低によらずそれぞれ 100 msec および 440 msec であり、平均値に表れない程度にわずかに細胞膜から解離しやすくなる程度であった。多状態反応スキームの各反応パラメータを比較すると、PTEN_{G129E} は酵素活性がないため PI(3,4,5)P₃ の脱リン酸化による解離の促進は見られなかったが、細胞膜上のプールに対する抑制が存在することが分かった。これらの結果から、PI(3,4,5)P₃ は、酵素-基質複合体形成に依存して細胞膜結合を不安定化する機構と、酵素-基質複合体形成に関係なく安定結合状態(Es)を抑制する機構の少なくとも 2 通りの機構で PTEN の細胞膜からの解離を促進しており、結果として PI(3,4,5)P₃ 高濃度下で PTEN の細胞膜局在量が減少すると考えられる。

以上により、細胞の極性形成におけるポジティブフィードバックの存在を示すことができ、その分子レベルのメカニズムを明らかにすることができた。ポジティブフィードバックを含むシステムにおいて、分子間で起こる制御の因果関係を明らかにするためには原因となる分子を操作する技術が必要であるが、世界的に見てこうした研究はまだ少ない。さらに、分子メカニズムを解明するために 1 分子イメージングと組み合わせた研究は前例がない。分子反応ネットワークの動態を明らかにするためのポストゲノム研究において先駆的な研究となると予想される。本研究において明らかにした PTEN の多状態に対して、さらに細胞骨格や誘引物質からの制御機構を解明することで、自発運動や走化性運動における PTEN の多状態遷移の役割につ

いての理解を深められるだろう。

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3件)

安井 真人, 松岡 里実, 上田 昌宏, PTEN hopping on the cell membrane is regulated via a positively-charged C2 domain, PLOS Computational Biology, 査読有, Vol.10, 2014, e1003817.

DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003817

松岡 里実, 上田 昌宏, 1分子イメージングによる走化性情報伝達系の動態解析, 生体の科学, 査読無, 65巻, 5号, 2014, pp.394-395.

<http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.2425200006>

柴田 達夫, 西川 正俊, 松岡 里実, 上田 昌宏, Intracellular encoding of spatiotemporal guidance cues in a self-organizing signaling system for eukaryotic chemotaxis, Biophysical Journal, 査読有, Vol.105, No.9, 2013, pp.2199-2209.

DOI:10.1016/j.bpj.2013.09.024

〔学会発表〕(計8件)

松岡 里実, PTEN の1分子イメージングによる細胞極性形成メカニズムの解析, 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 2015年5月15日, 京都国際会館(京都府京都市)

松岡 里実, Single-Molecule Imaging Analysis of PI3K and PTEN in Establishing PIP3 Polarity, Gordon Research Conference: Directed Cell Migration, 2015年1月28日, テキサス(アメリカ合衆国)

松岡 里実, PI(3,4,5)P3-induced PTEN membrane release provides a positive feedback mechanism for cell polarity, 39th Symposium on Hormones and Cell Regulation, 2014年10月10日, アルザス(フランス)

松岡 里実, PTEN Membrane Binding is Destabilized by PI(3,4,5)P3: Positive Feedback Loop in Establishing Cellular Polarity, 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月26日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

松岡 里実, Positive feedback mechanism for PIP3 polarity establishment mediated by PIP3 phosphatase, PTEN, 第51回日本生物物理学会年会, 2013年10月28日, 京都国際会館(京都府京都市)

松岡 里実, PTEN の極性形成メカニズムの1分子イメージング解析, 日本顕微鏡学会第69回学術講演会, 2013年5月21日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田

市)

〔図書〕(計2件)

松岡 里実, 上田 昌宏, 化学同人, 1分子生物学, 2014, pp.133-153.

松岡 里実, 宮永 之寛, 上田 昌宏, Springer, Chemotaxis: Methods and Protocols, 2015, in press.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 里実 (MATSUOKA, Satomi)

理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号: 00569733

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: