

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19507

研究課題名（和文）細胞認証システムの開発に向けた細胞内座標軸の設定

研究課題名（英文）Configuration of cell axes for the development of cell authentication system

研究代表者

大場 雄介（Ohba, Yusuke）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：30333503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞を認証するための「テンプレート」とそれを記述するための「座標軸」を設定するため、各細胞内小器官の配置に関するパラメータを取得した。そのために、各種蛍光タンパク質を用いたオルガネラマーカライブラリを構築した。その結果、蛍光タンパク質のフォールディングの促進が、しばしばオルガネラマーカの局在に負の影響を与えることを見出した。また、構築ライブラリを用いてオルガネラの配置を解析することで、エンドソーム系の重心位置が細胞内で直線上に配置していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、これまで経験則にのみ基づいていた細胞の形態認識に客観的な指標を与え、生物を題材とした研究ゆえのheterogeneityを説明するような知見が提供されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to set a "template" for authenticating cells and a "coordinate axis" for describing it, parameters regarding the arrangement of each organelle were obtained. For this purpose, an organelle marker library was constructed using various fluorescent proteins. It was found that the facilitation of the folding of fluorescent proteins might negatively affect the localization of the organelle markers. In addition, by analyzing the arrangement of organelles using the library, it was found that the centroids of the endosomal system formed a certain line in cells.

研究分野：生理学、細胞生物学

キーワード：細胞形態 細胞内小器官 細胞認証

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我々が日常行っている基礎医学生物学的研究では、培養細胞を使用する頻度が高い。日常細胞を培養・維持する際には、ルーチンにその形態を顕微鏡で観察する。その顕微鏡観察像に基づいて細胞の状態（いわゆる調子が良いかどうか）に関する判定をし、実験に供することができるか、はたまた培地交換やメンテナンスをして培養を継続すべきか、などの判断を下している。ある一定以上の経験を積んだ研究者であれば、ごく当たり前にできる形態の判別であるが、具体的、客観的な判断指標をあげられる人はおそらくほとんど存在しないであろう。このことは細胞レベルでの話に留まるものではない。「最後の診断」と言われる病理組織診断においては、顕微鏡像で観察した組織像から疾患（例えば、がんなどの悪性腫瘍か良性病変か）を同定する。近年は免疫組織化学や遺伝子診断等の補助診断も併用されるが、根本的には組織形態の特徴に基づく「脳内のデータベースとの照合作業」を基盤としており、未だ客観的な数値データが存在しないのが実情である。にもかかわらず病理医は正しい診断を下し、医療を支えている。このような、非定量的ではあるが高い形態識別能力は、例えば人が他人の顔を識別するときにも生かされている。人間の顔は定量的には目が2個、鼻が1個、口が1個、頭部には毛髪（人によっては髭）という情報しか有さないが、ある人物の顔を見るだけで個人を特定することができる。また多くの場合は髪型を変えた程度では、個人を見紛うことはない。このことは、顔の輪郭、目鼻口の位置関係を無意識のうちに計測し、脳内のデータベースと照合することで個人認証を行っているものと考えられる。この顔認識に関しては、現代の技術革新により自動判別が可能になりつつある。それが生体認証（バイオメトリクス, biometrics 認証）である。生体認証は人間の身体的特徴や行動的特徴の情報を用いて行う個人認証技術であり、古くは指紋認証から始まり、現在では虹彩、網膜、静脈、声紋、顔認証が実用化されつつある。認証には「テンプレート」と呼ばれる情報を事前に採取登録し、認証時にセンサで取得した情報と比較することで認証を行う。顔認証の場合には撮影した顔の画像から、傾きや位置を検出して補正し、特徴点（眼の中心、唇の端など）の位置や点同士の距離などを計測しテンプレートとして照合に用いられる。我々は、FRET バイオセンサーを用いて生きた細胞が増殖因子などに応答する様子を顕微鏡で観察してきた。その経験に基づき、増殖因子に反応性が良い細胞を定量的・客観的な指標がないまま選定することができる様になっている。この判定に「テンプレート」との照合ができれば、正しい実験技術・知識の指導、さらに論文の材料と方法にもどのような細胞を選択したかを記載することができるはずである。

## 2. 研究の目的

種々の細胞種や細胞の置かれている状態において、各細胞内小器官の配置に関するパラメータを網羅的に取得する。このパラメータをもとに細胞を認証するための「テンプレート」とそれを記述するための「座標軸」を設定することを目的とする。本研究成果により、これまで経験則にのみ基づいていた細胞の形態認識に客観的な指標を与え、生物を題材とした研究ゆへの heterogeneity を説明するような知見を提供する。

## 3. 研究の方法

### (1) オルガネラマーカーの作製

特定のオルガネラに局在することが知られているタンパク質もしくはその局在化配列と蛍光タンパク質との融合タンパク質をコードする発現ベクターを作製した。例えば、小胞体局在タンパク質として Sec61 を、ミトコンドリア局在配列として cytochrome c oxidase subunit 8A のミトコンドリア移行配列 (mito) 等、12 種類のオルガネラ局在タンパク質もしくは局在配列を用いた。蛍光タンパク質は Sirius (群青色) super enhanced cyan fluorescent protein (SECFP, シアン色) enhanced green fluorescent protein (EGFP, 緑色) Venus (黄色) mCherry (赤色) および infrared fluorescent protein (iRFP, 近赤外色) を用いた。発現ベクターをアフリカミドリザル腎臓由来 Cos-1 細胞に導入し、冷却 charge-coupled device (CCD) 付落射型蛍光顕微鏡もしくは共焦点顕微鏡で観察した。得られた画像の解析には画像解析ソフト MetaMorph® および ImageJ を用いた。各蛍光タンパク質のアミノ酸配列は Clustal W を用いて比較した。作製したミトコンドリアマーカーがミトコンドリアに局在するか評価するために、ミトコンドリア標識色素 Mitotracker Red CMXRos で染色した細胞からマスク画像を作成し、ミトコンドリアと細胞質・核の蛍光強度比を算出した。pH バイオセンサー pHluorin の pH 感受性は、pHluorin 発現細胞から精製した細胞可溶液を種々の pH に調整した緩衝液と混合し、マイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定することで評価した。ミトコンドリア pH センサー mito-pHluorin の性能評価は、ミトコンドリア呼吸鎖の脱共役薬であるプロトンイオノフォア carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) の存在下でライブセルイメージングし、得られた画像から蛍光強度をプロットした。

### (2) 細胞内小器官の位置情報の取得

(1) で作製したオルガネラマーカーを用いて、各細胞内小器官の局在・配置情報を取得した。配置の重心位置や分散度合い等を、画像解析ソフトを用いて抽出し、パラメータとして記録した。

さまざまな状態の細胞を用いて、同様にパラメータを取得した。得られたパラメータにより実際に細胞を認証可能なアルゴリズムと、認証のための「テンプレート」および「座標軸」を決定した。

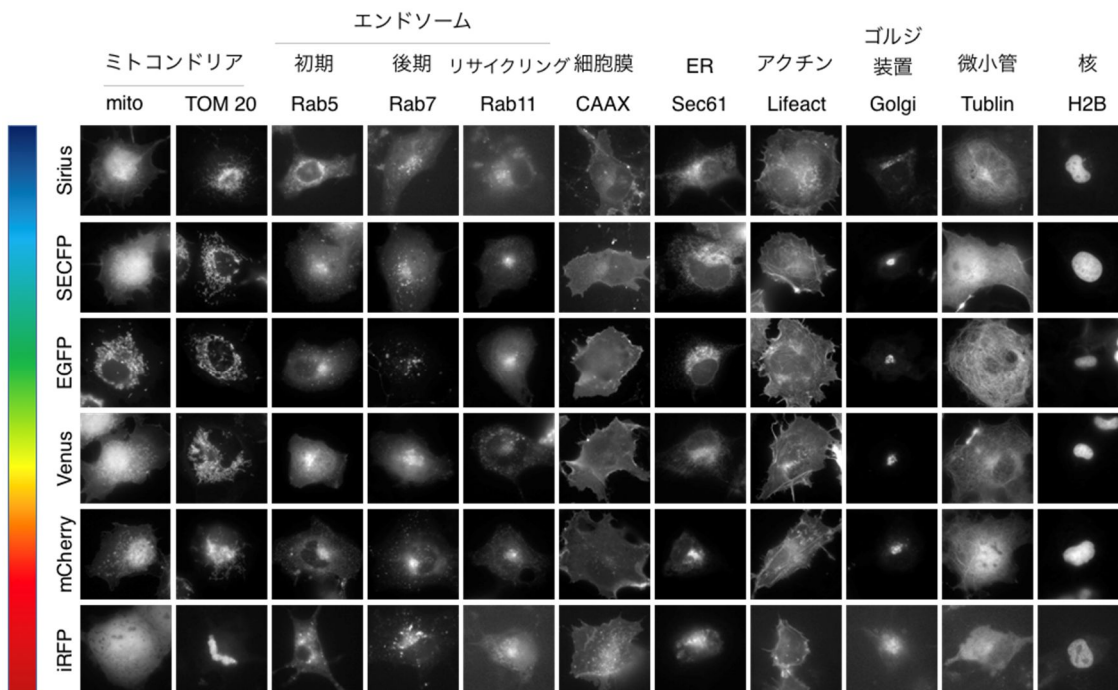


図1 作製した各種オルガネラマーカー

#### 4. 研究成果

##### (1) オルガネラマーカーの作製

作製した 72 種類のオルガネラマーカーを Cos-1 細胞に発現させて観察したところ、一部で目的とするオルガネラ以外に局在するものがあつた (図 1)。特に、ミトコンドリアマーカーでは融合する蛍光タンパク質によりその程度の差が顕著であり、EGFP を融合させた場合はミトコンドリアの蛍光強度に対する細胞質・核の蛍光強度の比率が 0.2 であつたのに対して、Venus や SECFP を融合させた際にはいずれも 0.6 であつた (図 2)。これら蛍光タンパク質のアミノ酸配列比較から、Venus や SECFP 等にはフォールディングを促進する変異が導入されていることが明らかとなつた。そこで、フォールディング促進変異が導入されていない黄色蛍光タンパク質 enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) と mito を融合させたところ、細胞質・核の相対的な蛍光強度が EGFP と同様 0.2 まで減少した (図 3)。以上から、蛍光タンパク質のフォールディング速度とミトコンドリアマーカーの局在とが密接に関わることが明らかとなつた。そこで、フォールディング促進変異をもとに戻す復帰変異を、音楽用語の *allegro* (もとの速さで) に因んで、*at* 復帰変異と命名した。EGFP のバリエーション pHluorin は、生理的な pH 変動範囲内で蛍光強度が変化するため、細胞内 pH センサーとして用いられている。ミトコンドリア内 pH を測定するために mito を融合した pHluorin を作製したところ、ミトコンドリア以外に細胞質と核にも局在した。アミノ酸配列を調べたところ

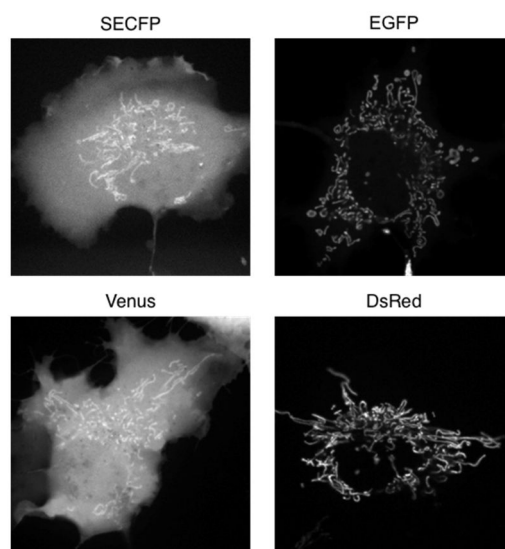


図2 蛍光タンパク質によるミトコンドリアマーカー局在の差異

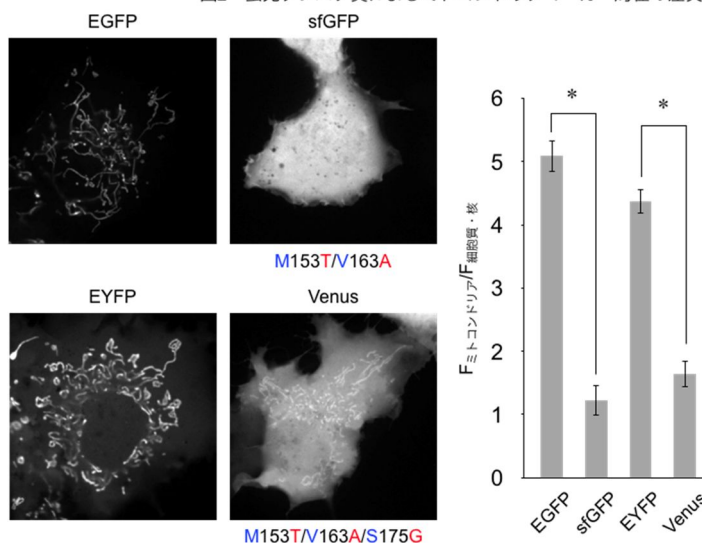


図3 フォールディング効率促進変異の有無とミトコンドリア局在 (\*,  $p < 0.01$ )

pHluorin にもフォールディング促進変異が導入されていたので、*at* pHluorin を作製した。mito-*at* pHluorin は mito-pHluorin と比較して細胞質に局在する割合が減少し、mito-EGFP と同程度までミトコンドリアに局在した (0.37→0.26) (図 4a)。そこで、pHluorin と *at* pHluorin を用いて FCCP による pH 変化を経時的に測定した。薬剤の添加により、mito-pHluorin と mito-*at* pHluorin の蛍光強度はともに減少したが、mito-*at* pHluorin の蛍光強度の減少が mito-pHluorin のそれよりも小さかった (図 4b, c)。FCCP はミトコンドリア膜だけでなく細胞膜にも作用し、濃度依存的に細胞質 pH を低下させる。このことから、mito-pHluorin は細胞質の pH 変化にも応答したが、mito-*at* pHluorin はその影響を受けなかったと考えられる。一般的に、遺伝子導入後の蛍光検出可能な時間が短いため、フォールディングが早い方が望ましい (高性能な蛍光タンパク質) とされているが、オルガネラマーカー作製においてはその限りではないことが明らかとなった。したがって、オルガネラマーカー作製の際には様々な蛍光タンパク質を試し、最適な蛍光タンパク質を選択することが重要であると考えられる。

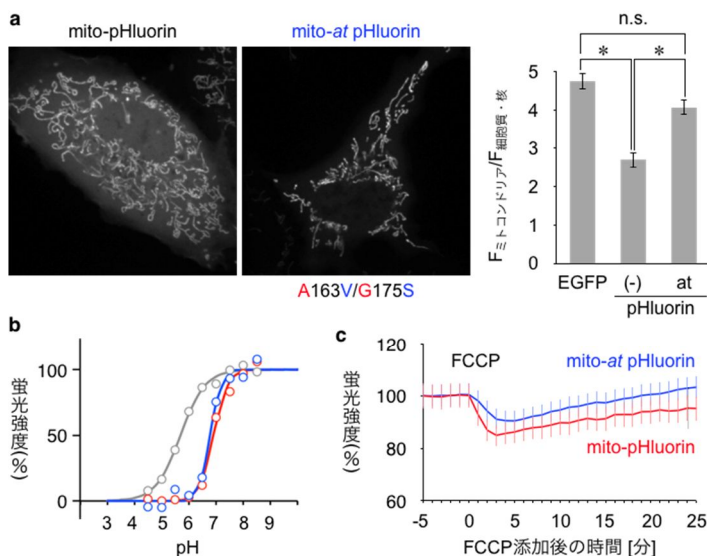


図4 mito-*at* pHluorinはミトコンドリアにのみ局在した  
(a) mito-pHluorinとmito-*at* pHluorinの局在とミトコンドリア局在比率  
(b) mito-pHluorinとmito-*at* pHluorinのpH応答性  
(c) mito-pHluorinとmito-*at* pHluorinによるFCCP依存性pH変化のモニタリング

(2) 細胞内小器官の位置情報の取得  
培養細胞の早期エンドソームと核を蛍光ラベルした。得られた顕微鏡画像のうち微分干渉画像から細胞全体の形態を、エンドソームと核はそれぞれの蛍光画像に基づき、画像解析ソフトを用いて重心を算出した (図 5)。

次に、重心位置について回帰直線を作成し、相関係数を算出した。その結果これら3つ構造体の重心は非常に高い確率で直線状に配置されることが明らかになった (図 5)。この3つの重心座標に対する回帰直線に対する相関係数は大多数の細胞で非常に高く、観察した17個中12の細胞で0.7以上の値を示した。この数値は通常生き物を対象とする生物学研究においては、驚愕に値する数値である。他の傾向として、細胞質とエンドソームの重心は核の重心と比べると近い位置にあり、核膜周囲から核内にかけて存在した。回帰直線は細胞の長軸方向あるいは核の長軸方向とは一致しない。相関係数と細胞の大きさあるいは核の大きさとは無関係であった。以上の結果は、細胞内小器官の配置にはある一定の法則が存在すると予測され、細胞認証の「テンプレート」の候補となる情報である。

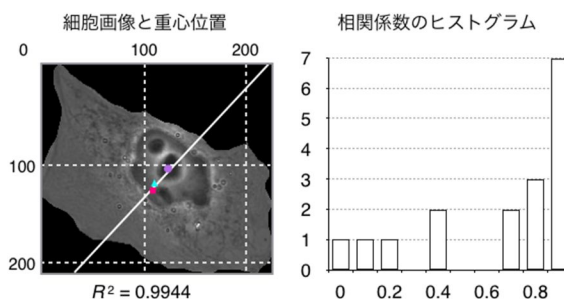


図5 オルガネラ配置の重心位置の定量解析  
Cos-1細胞を固定後エンドソームをRab5、核をヘキストで染色した。得られた画像から細胞膜 ( $\Delta$ )、エンドソーム ( $\square$ )、核 ( $\circ$ ) の重心を算出しプロットした。白線はその回帰直線。右は回帰直線の相関係数のヒストグラム

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件) 全て査読有り

1. A peptide derived from phosphoinositide 3-kinase inhibits endocytosis and influenza virus infection. Y. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, M. Fujioka, K. Tsutsumi, J. Sasaki, P. Nepal, S. Kashiwagi, S. Paudel, S. Nishide, A. Nanbo, T. Sasaki and Y. Ohba. **Cell Struct. Funct.**, in press
2. Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway. A. Nanbo and Y. Ohba. **J. Infect. Dis.** 218(suppl\_5): S388–S396, 2018
3. Infection of Epstein-Barr virus in type III latency modulates biogenesis of exosomes and the expression profile of exosomal miRNAs in the Burkitt lymphoma Mutu cell lines. A. Nanbo, H. Katano, M. Kataoka, S. Hoshina, T. Sekizuka, M. Kuroda and Y. Ohba. **Cancers** 10(7): 237, 2018
4. A sialylated voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel binds hemagglutinin and mediates influenza A virus

- entry into mammalian cells. Y. Fujioka, S. Nishide, T. Ose, T. Suzuki, I. Kato, H. Fukuhara, M. Fujioka, K. Horiuchi, A. O. Satoh, P. Nepal, S. Kashiwagi, J. Wang, M. Horiguchi, Y. Sato, S. Paudel, A. Nanbo, T. Miyazaki, H. Hasegawa, K. Maenaka and Y. Ohba. **Cell Host Microbe** 23(6): 809-818, 2018
5. The role of transforming growth factor  $\beta$  in cell-to-cell contact-mediated Epstein-Barr virus transmission. A. Nanbo, M. Ohashi, H. Yoshiyama and Y. Ohba. **Front. Microbiol.** 9: 984, 2018
  6. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. S. Kon, K. Ishibashi, H. Katoh, S. Kitamoto, T. Shirai, S. Tanaka, M. Kajita, S. Ishikawa, H. Yamauchi, Y. Yako, T. Kamasaki, T. Matsumoto, H. Watanabe, R. Egami, A. Sasaki, A. Nishikawa, I. Kameda, T. Maruyama, R. Narumi, T. Morita, Y. Sasaki, R. Enoki, S. Honma, H. Imamura, M. Oshima, T. Soga, J.I. Miyazaki, M.R. Duchon, J.M. Nam, Y. Onodera, S. Yoshioka, J. Kikuta, M. Ishii, M. Imajo, E. Nishida, Y. Fujioka, Y. Ohba, T. Sato and Y. Fujita. **Nat. Cell Biol.** 9(5): 530-541, 2017
  7. Improved FRET biosensor for the measurement of BCR-ABL activity in chronic myeloid leukemia cells. M. Horiguchi, M. Fujioka, T. Kondo, Y. Fujioka, X. Li, K. Horiuchi, A.O. Satoh, P. Nepal, S. Nishide, A. Nanbo, T. Teshima and Y. Ohba. **Cell. Struct. Funct.** 42(1): 15-26, 2017
  8. Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. S. Saitoh, T. Maruyama, Y. Yako, M. Kajita, Y. Fujioka, Y. Ohba, N. Kasai, N. Sugama, S. Kon, S. Ishikawa, T. Hayashi, T. Yamazaki, M. Tada and Y. Fujita. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 114(12): E2327-E2336, 2017
  9. A leukemogenic kinase, FIP1L1-PDGFR $\alpha$ , and a SUMO E3 ligase, PIAS1, form a positive crosstalk via their enzymatic activities. M. Ibata, J. Iwasaki, Y. Fujioka, K. Nakagawa, S. Darmanin, M. Onozawa, D. Hashimoto, Y. Ohba, S. Hatakeyama, T. Teshima and T. Kondo. **Cancer Sci.** 108(2): 200-207, 2017

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Yusuke Ohba, Fluorescence Imaging of membrane dynamics and intracellular signaling, The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019 年、神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)
2. 大場 雄介, 細胞内シグナル伝達とエンドサイトーシスの光による可視化と制御、第 36 回日本骨代謝学会学術集会、2018 年、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)
3. Mari Fujioka, Yoichiro Fujioka, Aya O Satoh, Prabha Nepal, Sayaka Kashiwagi, Aiko Yoshida, Sarad Paudel, Asuka Nanbo, Yusuke Ohba, Development of FRET-based biosensors for measuring tyrosine kinase activity in living cells, 第 70 回日本細胞生物学会、2018 年、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
4. Prabha Nepal, Yoichiro Fujioka, Aya O. Satoh, Kosui Horiuchi, Sarad Paudel, Sayaka Kashiwagi, Aiko Yoshida, Mari Fujioka, Asuka Nanbo, Yusuke Ohba, Role of inner mitochondrial membrane proteins in the regulation of endocytosis mediated by Ras-PI3K signaling, 第 70 回日本細胞生物学会、2018 年、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
5. Sarad Paudel, Yoichiro Fujioka, Aya O. Satoh, Mari Fujioka, Kosui Horiuchi, Prabha Nepal, Sayaka Kashiwagi, Aiko Yoshida, Asuka Nanbo, Yusuke Ohba, The Role of tubulin in the regulation of endocytosis mediated by Ras-PI3K signaling, 第 70 回日本細胞生物学会、2018 年、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
6. Sayaka Kashiwagi, Yoichiro Fujioka, Kosui Horiuchi, Aya O Satoh, Prabha Nepal, Aiko Yoshida, Sarad Paudel, Asuka Nanbo, Yusuke Ohba, The role of an Na,K-ATPase in spatiotemporal regulation of Ras- PI3K signaling and endocytosis, 第 70 回日本細胞生物学会、2018 年、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
7. Aya O Satoh, Yoichiro Fujioka, Kosui Horiuchi, Prabha Nepal, Sayaka Kashiwagi, Aiko Yoshida, Mari Fujioka, Sarad Paudel, Asuka Nanbo, Yusuke Ohba, A mitochondrial outer membrane protein is involved in the regulation of Ras-PI3K signaling-mediated endocytosis, 第 70 回日本細胞生物学会、2018 年、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
8. Yoichiro Fujioka, Aya O Satoh, Kosui Horiuchi, Mari Fujioka, Sarad Paudel, Asuka Nanbo, Yusuke Ohba, A PI3K-derived peptide inhibits clathrin-independent endocytosis and influenza virus infection, 第 70 回日本細胞生物学会、2018 年、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

9. Aiko Yoshida, Nobuaki Sakai, Yoshitsugu Uekusa, Shige H Yoshimura, Yusuke Ohba, Involvement of actin dynamics in the endocytic process revealed by fast-scanning atomic force microscopy, 第 70 回日本細胞生物学会, 2018 年、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
10. 藤岡 容一郎、西出 真也、尾瀬 農之、加藤 いづみ、福原 秀雄、藤岡 真理、堀内 浩水、佐藤 絢、Prabha Nepal、柏木 彩花、Jing Wang、堀口 美香、Sarad Paudel、南保 明日香、宮崎 忠昭、前仲 勝実、大場 雄介、インフルエンザウイルス細胞侵入において鍵となる宿主タンパク質の同定、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年、仙台国際センター(宮城県仙台市)
11. 佐藤 絢、藤岡 容一郎、堀内 浩水、藤岡 真理、パウテデル サラド、西出 真也、南保 明日香、大場 雄介、PI3K 由来ペプチドによるインフルエンザウイルス感染の抑制、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年、仙台国際センター(宮城県仙台市)
12. 堀内 浩水、藤岡 容一郎、佐藤 絢、Prabha Nepal、Jing Wang、堀口 美香、Sarad Paudel、西出 真也、南保 明日香、小布施 力史、大場 雄介、Ras-PI3K 複合体によるエンドサイトーシスの制御因子の探索と機能解析、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年、仙台国際センター(宮城県仙台市)
13. 大場 雄介、藤岡 容一郎、蛍光イメージングを用いた細胞内シグナル伝達によるエンドサイトーシスの制御機構の解析、第 122 回解剖学会、2017 年、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)招待

〔図書〕(計 1 件)

1. Fujioka M, Asano Y, Nakada S and Ohba Y. SH2 domain-based FRET biosensor for measuring BCR-ABL activity in living CML cells. **Methods in Molecular Biology. SH2 domains** Kazuya Machida K and Liu BA (ed.) Springer, New York, (p513-534), 2017 (ISBN: 978-1-4939-6760-5 [Print] 978-1-4939-6762-9 [Online])

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。