

機関番号：12605

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21860027

研究課題名（和文）プロテオインジェクションを利用した

細胞内プロテオーム解析プラットフォームの構築

研究課題名（英文） Development of a platform for a novel proteome analysis
in a living cell utilizing proteoinjection

研究代表者 舟橋 久景 (FUNABASHI HISAKAGE)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：60552429

研究成果の概要（和文）：

タンパク質を細胞内に直接導入し（プロテオインジェクション）、細胞応答を評価することによりタンパク質の細胞内機能を総合的に解析するという、新規細胞内プロテオーム解析の基盤技術を確立した。まず、タンパク質を機能を保持したまま直接標的単一生 ES 細胞へ導入する技術開発に成功した。また、DNA プローブに転写因子特異的配列を挿入することにより、生細胞内へ導入したプローブのレポーター発現効率が上昇することを明らかにした。この原理を利用した ES 細胞内タンパク質機能を評価する新しい測定法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

We have established basic technology for a novel proteome analysis in which the functional rolls of proteins in a living cell are evaluated by the analysis of cellular response induced by the direct introduction of the proteins into a cell (proteoinjection). We have successfully developed a technology which enables us to introduce proteins with functions into a single-target-living ES cell. Moreover, it has been found that the simple insertion of a transcriptional factor specific sequence into a probe DNA enhances the efficiency of the expression of a reporter in a living ES cell. Therefore it has been suggested a new method to evaluate the functional rolls of transcriptional factors inside living ES cells depending on the enhancement of the probe expression efficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
2010 年度	980,000	294,000	1,274,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,110,000	633,000	2,743,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオテクノロジー、プロテオーム解析、フェムトインジェクション、単一細胞解析、細胞内機能解析

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読が完了した現在、各遺伝子にコードされているタンパク質が、どのように発現しているか？またそれらタンパク

質がどのような役割を演じているのか？ということ解析することが重要である。現在は、細胞を破碎した後、タンパク質を抽出し、SDS-PAGE やクロマトグラフィーなどの手

法を用いて行う分離を利用した発現プロファイルの解析や、その後マスペクトラムなどで質量を同定するということが行われている。また各タンパク質の機能は、分離、精製の後、生体外で構造解析を行ったり、純粋な系で機能を評価することが多い。しかし、タンパク質の生体内における機能はそのような単純なものではなく、様々な因子と複雑に絡み合い制御し合っている。したがって、その機能は、細胞応答として総合的に評価してこそ正しく解析できると考えられるが、未だにそのような機能解析体系はない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ゲノム情報などを元にタンパク質を得て、それらを直接細胞内に定量的に導入し（プロテオインジェクション）、細胞応答を評価することによりタンパク質の機能を総合的に解析するという、新規細胞内プロテオーム解析のプラットフォームを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では胚性幹細胞（Embryonic Stem Cells; ES細胞）内におけるプロテオームタンパク質機能解析法の確立を目指し、大きく以下の二つの研究を展開した。

(1) プロテオインジェクション法の確立

核移行シグナル付き蛍光タンパク質（AcGFP-Nuc）と通常の蛍光タンパク質（AcGFP）をそれぞれグルタチオン S 転スフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として、大腸菌を用いて発現・精製した。このタンパク質を、フェムトインジェクション技術を用いて、ES細胞の細胞質へ導入し、その後の蛍光の動的挙動を観察した。

(2) 転写因子特異的核移行促進配列の開発

ES細胞特異的転写因子である Oct3/4 が特異的に認識し、結合する DNA 配列をプローブプラスミドに挿入した。このプラスミドを ES細胞と、Oct3/4 転写因子を発現しないマウス・インスリノーマ細胞、MIN6 細胞の細胞質へフェムトインジェクション技術を用いて導入し、その後、プローブプラスミドにコードされた蛍光レポータータンパク質の発現効率を評価した。

4. 研究成果

(1) プロテオインジェクション法の確立

プロテオインジェクション後に細胞を蛍光観察し、その蛍光強度を元にプロテオインジェクションの成功率を算出した。サンプル作製条件、インジェクション圧、キャピラリーの形状等を検討することにより、初年度には数%であったタンパク質導入成功率が

23%まで向上した。その際、キャピラリー内のタンパク質濃度を変化させることにより、定量的にタンパク質を標的単一生ES細胞内へ導入する技術を確立した（Fig. 1）。タンパク質のES細胞への定量的インジェクション（プロテオインジェクション）は本研究によって世界で初めて実現したものである。

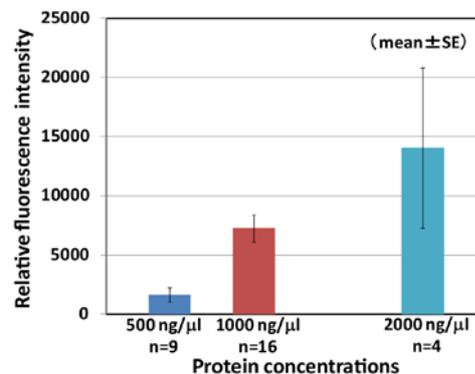


Fig. 1 プロテオインジェクションの定量性

また、GST と核移行シグナル付き蛍光タンパク質の融合タンパク質（GST-AcGFP-Nuc; 59 kDa）を ES 細胞の細胞質にプロテオインジェクションした後、核と思われる部分の蛍光が徐々に強くなっていく様子を動画として撮影することに成功した（Fig. 2）。

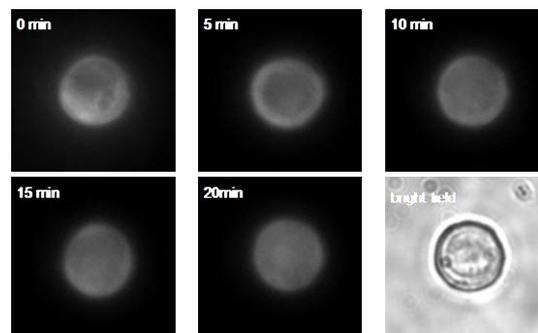


Fig. 2 GST-AcGFP-Nuc プロテオインジェクション後の蛍光観察

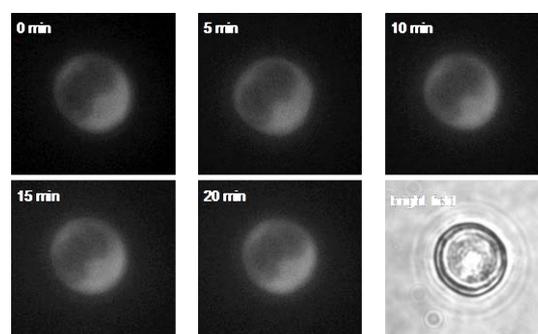


Fig. 3 GST-AcGFP プロテオインジェクション後の蛍光観察

一方、GST と通常の蛍光タンパク質との融合タンパク質（GST-AcGFP; 55 kDa）を細胞質

へプロテオインジェクションしたところそのような挙動は観察されなかった(Fig. 3)。一般に 40 kDa 以上の分子の核内への物質輸送は核膜によって制限されている。細胞質に導入した GST-AcGFP はその大きさゆえに、核内へ分散できなかったと考えられる。一方、GST-AcGFP-Nuc は細胞質に導入された後、核膜上に存在する、核輸送タンパク質によって核移行シグナルが認識され、核内へ能動的に輸送されたものと考えられる。

以上の結果から、蛍光タンパク質の蛍光機能と、核移行シグナル機能を損なわずに ES 細胞内へと定量的に導入することに成功したと結論した。

(2) 転写因子特異的核移行促進配列の開発

DNA nuclear targeting sequence (DTS) と呼ばれる、転写因子が結合する DNA 配列をプローブプラスミドに挿入しておくことにより、細胞質に導入されたプローブプラスミドは転写因子が結合配列を認識して、転写因子、タンパク質複合体を形成する。この複合体は転写因子の核移行シグナルによって効率よく核内へ移行し、その結果、レポータータンパク質の発現効率が向上することが期待される。本研究では Sox2 regulatory region 2 (SRR2) と呼ばれる ES 細胞特異的転写因子 Oct3/4 が認識する配列が、ES 細胞において DTS として機能することを明らかにした(論文①)。

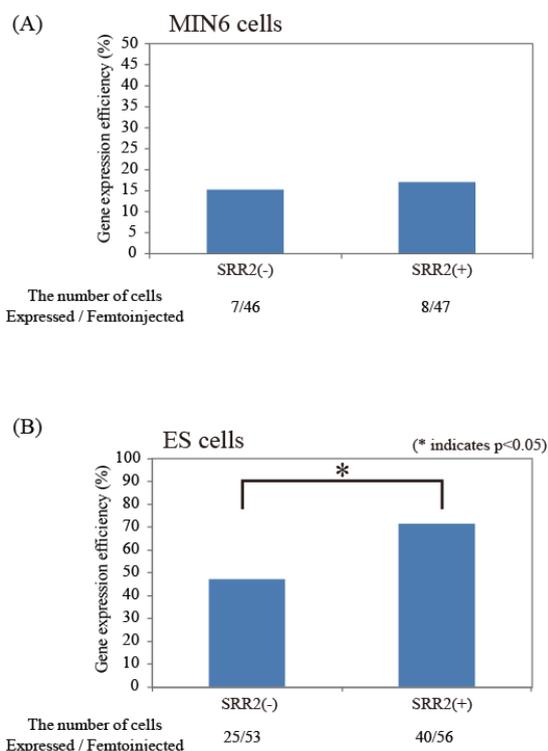


Fig. 4 SRR2 配列の有無による遺伝子発現効率の違い
(A) MIN6 細胞、(B) ES 細胞

MIN6 細胞の場合、SRR2 配列を導入したプローブプラスミドでも、導入していないプローブプラスミドでもレポーター遺伝子の発現効率に差はなかった(Fig. 4(A))。一方、ES 細胞の場合、SRR2 配列の有無によって、レポーター遺伝子の発現効率に明らかな差を生じることが示され(Fig. 4(B))、SRR2 が DTS として機能することが明らかとなった。また、Oct3/4 を発現しない MIN6 細胞では発現効率に差が認められず、Oct3/4 を発現する ES 細胞においては発現効率に差が生じたことから、この発現効率の差を評価することによって、Oct3/4 転写因子の生細胞内の活性評価が行える可能性が示唆された。

以上の結果から、タンパク質を機能を保持したまま直接標的単一生 ES 細胞へ導入する技術開発に成功し、これを利用した細胞内プロテオーム解析のための基礎技術を確立したと結論した。

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)

- ① H. Funabashi, M. Takatsu, M. Saito, H. Matsuoka, “Sox2 regulatory region 2 sequence works as a DNA nuclear targeting sequence enhancing the efficiency of an exogenous gene expression in ES cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 400(4), 554-558 (2010), 査読有
- ② 舟橋 久景, 斉藤 美佳子, 松岡 英明, フェムトインジェクションによる単一生細胞操作, *Electrochemistry*, 78(10), 7-11 (2010), 査読有
- ③ 舟橋 久景, 斉藤 美佳子, 松岡 英明, インジェクションを利用した単一生細胞機能解析, *Chemical Sensors*, 26(3), 120-126 (2010), 査読なし

[学会発表] (計 13 件)

国際学会発表 (4 件)

- ① Hideki Koike, Yuki Sugimoto, Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Dynamic analysis of molecular beacons and functional proteins introduced into target-single ES cells by femtoinjection”, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Mar 3-4 (2011), Tokyo, Japan

- ② Seitaro Oura, Hisakage Funabashi, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Dummy DNA injection for controlling a specific transcription in a target-single ES cell”, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Mar 3-4 (2011), Tokyo, Japan, selected as a “Young Scientists Poster Award”
- ③ Hisakage Funabashi, Makoto Takatsu, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, “Dynamic analysis of gene expression balance in target single-ES cells towards a more clear-cut indicator of differentiation”, Pacificchem 2010, Dec 15-20 (2010), Honolulu, USA
- ④ Mikako Saito, Makoto Takatsu, Tsukasa Kaeriyama, Hisakage Funabashi, Hideaki Matsuoka, “Semi-quantitative expression of target genes in mouse ES single-cells by femto-injection”, The sixth annual meeting of The Asia Reproductive Biotechnology Society, Nov 16 (2009), Siem Reap, Cambodia

国内学会発表 (9 件)

- ⑤ 大浦 誠太郎, 舟橋 久景, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, ダミーDNA 導入による標的単一 ES 細胞の転写調節, 電気化学会 第 78 回大会, 2011 年 3 月 29 日~31 日, 横浜国立大学, 東日本大震災のため実際の大会は中止したが、3 月 29 日の講演要旨集の発行をもって本大会での発表は成立したものととして扱う
- ⑥ 小池 秀樹, 舟橋 久景, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, 単一 ES 細胞内の標的 mRNA 挙動解析のための Molecular Beacon 法の検討, 電気化学会 第 78 回大会, 2011 年 3 月 29 日~31 日, 横浜国立大学, 東日本大震災のため実際の大会は中止したが、3 月 29 日の講演要旨集の発行をもって本大会での発表は成立したものととして扱う
- ⑦ 舟橋 久景, 杉元 侑樹, 小池 秀樹, 大浦 誠太郎, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, 標的 ES 細胞内の転写因子バランスコントロール法開発, 日本化学会 第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26 日~29 日, 神奈川大学横浜キャンパス, 東日本大震災のため実際の大会は中止したが、第 91 春季年会は紙上および Web 上で開催し、本年会での発表が成立したものととして扱う
- ⑧ 佐谷 航, 舟橋 久景, 大浦 誠太郎, 小池 秀樹, 杉元 侑樹, 高津 信, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, Oct3/4 発現制御による標的 ES 細胞の分化誘導法開発, 2010 年電気化学秋季大会, 2010 年 9 月 2 日~3 日, 神奈川工科大学, 厚木

- ⑨ 高津 信, 舟橋 久景, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, 標的単一細胞内の経時的遺伝子発現の解析, 第 57 回日本実験動物学会総会, 2010 年 5 月 12 日~14 日, 京都テルサ
- ⑩ 舟橋 久景, 高津 信, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, ES 細胞内タンパク質のダイナミクスを利用した高効率遺伝子発現, 電気化学会 第 77 回大会, 2010 年 3 月 29 日~31 日, 富山大学五福キャンパス
- ⑪ 舟橋 久景, 佐谷 航, 高津 信, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, ES 細胞内遺伝子発現バランス測定法の開発, 日本化学会 第 90 春季年会, 2010 年 3 月 26 日~29 日, 近畿大学本部キャンパス
- ⑫ 齊藤 美佳子, 高津 信, 舟橋 久景, 松岡 英明, フェムトインジェクションによるマウス ES 細胞への遺伝子導入解析, 電気通信大学・東京農工大学第 6 回合同シンポジウム, 2009 年 12 月 5 日, 東京農工大学小金井キャンパス
- ⑬ 高津 信, 舟橋 久景, 齊藤 美佳子, 松岡 英明, フェムトインジェクションによる導入分子の細胞内挙動のリアルタイム解析, 2009 年電気化学秋季大会, 2009 年 9 月 10 日~11 日, 東京農工大学小金井キャンパス

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
舟橋 久景 (FUNABASHI HISAKAGE)
東京農工大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：60552429

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし