

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592754

研究課題名(和文)革新的な生物発光イメージング法によるMMP-2関連タンパク質の分泌動態解析

研究課題名(英文)Bioluminescence imaging of MMP-2 and its related proteins secretion

研究代表者

鈴木 崇弘 (Suzuki, Takahiro)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：70298545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)は細胞外基質を分解する酵素であり、癌の浸潤転移において重要な役割を果たしている。MMP-2は不活性型(プロ型)で細胞から分泌された後に、細胞表面に結合して活性型となる。生細胞の全細胞表面におけるタンパク質分泌動態の可視的定量という特長を有する「分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法」を開発し、MMP-2分泌動態を解析した結果、遊走がん細胞の進行方向先端側における積極的な分泌動態が示された。また、構成性分泌における連続的な開口分泌機構の存在、細胞底面の特定箇所における分泌部位と細胞表面結合部位の形成が示唆された。

研究成果の概要(英文)：MMP-2 is one of the enzymes in degradation of basement membrane collagen and has a major role in cancer cell invasion. MMP-2 is secreted as the inactive pro-form, and the inactive pro-form of MMP-2 binds on the cell surface, and then active MMP-2 is produced. We have established a method of video-rate bioluminescence imaging to visualize exocytotic protein secretion from a single living cell. This bioluminescence method has advantages for estimation of time-dependent changes of the amount of secreted protein and or visualization of protein secretion over the whole surface of a cell. As a result, we demonstrated that the repeated secretion of MMP-2 from specific sites at the leading edge of the cell. The analyses of bioluminescence video images of MMP2-Glase showed repeated secretion of MMP-2 from specific sites at the leading edge and bottom side of the cell, suggesting that the sites of MMP-2 secretion differ from the MMP-2 binding sites.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：生物発光イメージング MMP-2 開口分泌 タンパク質分泌 がん細胞 遊走細胞

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の浸潤転移抑制は、癌治療における重要な課題である。MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)は基底膜のIV型コラーゲンを分解する主要な酵素である。多くの癌細胞において、MMP-2は移動方向の先端で高いプロテアーゼ活性を示し、基底膜を破壊して転移する上で重要な役割を果たしている。MMP-2はプロ型(不活性型)として分泌され、TIMP-2との結合を介して細胞表在プロテアーゼMT1-MMP(MMP-14)により活性化される。これまでに、MMP-2およびMT1-MMP、TIMP-2の分泌機構はほとんど不明なままである。MMP-2に依存した癌細胞の遊走・浸潤機構を理解し、創薬の可能性を広げる上では、MMP-2関連タンパク質の分泌機構を解明することは重要と考えられる。

MMP-2、TIMP-2を含めたシグナルペプチドを有する分泌型タンパク質は、小胞体内腔で合成されて小胞輸送によりゴルジ装置を経て細胞膜へと運ばれ、開口分泌(エキソサイトーシス)により細胞外へ放出される(MT1-MMPなどの細胞膜貫通型タンパク質は細胞表面に提示される)。癌細胞の遊走・浸潤におけるタンパク質の極性輸送と開口分泌を解析するためには、単一生細胞の全細胞表面におけるタンパク質分泌動態を解析する手法が必要である。

我々は、分泌型ルシフェラーゼをレポーターとして、動物培養細胞のタンパク質分泌動態を発光により可視化する“生物発光イメージング法”を独自に開発してきた。本手法の原理は、生細胞から開口分泌によりルシフェラーゼ(発光酵素)が分泌された瞬間、細胞培養液に添加してあるルシフェリン(発光基質)と反応して生ずる微弱な発光を、高感度カメラを備えた顕微鏡システムで検出するものである。この可視化法は、細胞表面に開口分泌されたタンパク質分子のみを発光シグナルとして検出することから発光強度によるタンパク質分泌量の定量解析が可能であり、また単一生細胞の細胞表面全体を解析できる利点がある。

我々は、タンパク質分泌動態を可視化する上での最大の課題となっていた、生物発光画像取得における時空間分解能を向上させることに取り組んできた。その過程で、分子量最小(シグナルペプチドを除いて16.8kDa)かつ高い発光活性を示す分泌型ルシフェラーゼである*Gussia* Luciferase (GLase)が有用なレポータータンパク質であることを示し(Suzuki et al, FEBS Lett. 581: 4551-4556, 2007)、MMP-2を含めた多種のタンパク質の分泌動態解析に広く適用して、創薬研究に応用できる可能性を見出した。

2. 研究の目的

生細胞の全細胞表面におけるタンパク質分泌動態の可視的定量という特長を有する、独自に開発した「タンパク質分泌の生物発光

イメージング法」をさらに改良しながら、遊走癌細胞におけるMMP-2とその活性化関連タンパク質の分泌動態、開口分泌から活性化複合体形成に至る局在性、およびその制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

GLaseをレポーターとしてEM-CCDカメラで発光シグナルを検出することで、開口分泌により細胞外に放出されるGLaseの発光シグナルを0.03-0.5秒/フレームのビデオ画像として可視化できた。この「分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング」により、MMP-2関連タンパク質の分泌動態を解析した。

具体的には、MMP-2を内因性に発現するHeLa細胞にGLase(K17-D185)融合MMP-2(MMP2-GLase)を発現させて解析した。同様に、MT1-MMP、TIMP-2についてもGLase融合タンパク質を発現させて解析した。発現させたGLase融合タンパク質の性質については、ウェスタンブロット、蛍光抗体染色、およびルミノメーターによる発光酵素活性の測定による解析を行った。

生物発光イメージングでタンパク質分泌動態を検出するために、以下の条件で実験を行った。EM-CCDカメラ(浜松ホトニクス製)は、水冷モードでCCDの-80℃冷却を行い、フォトンイメージングモード(=1)で撮影することにより、高解像度条件下(ピニング: 1x1; 1 pixel=16 μm)の生物発光観察としては速いフレームレート(1フレームあたり0.5秒以内の露光時間)で、微弱発光シグナルを可視化した。また、電動顕微鏡(オリンパス製)は、電動制御のための顕微鏡内部の赤外光を遮断するフィルターをカメラ接続部に備えたものを使用し、高い開口数(NA1.30-1.49)の40-100倍対物レンズ(オリンパス製)を使用した。また、室内光やPCモニターなどの外部光を遮断して細胞の微弱発光のみを検出するために、顕微鏡本体は簡易暗箱の中に設置した。

4. 研究成果

最初に、GLaseおよびMMP2-GLaseの生化学的な解析を行った。ウェスタンブロット解析の結果から、MMP2-GLaseは、内因性MMP-2および過剰発現MMP-2、FLAGタグ融合MMP-2(MMP2-FLAG)と同様に、プロ型で分泌され、プロセッシングを受けた活性化型として細胞表面に結合していることが示唆された。また、蛍光抗体染色解析によりMMP2-GLaseとMMP2-FLAGは小胞体-ゴルジ装置の小胞輸送経路に共同在することが示唆された。これにより、HeLa細胞において、MMP-2のC末端にGLaseを融合させたタンパク質プローブ(MMP2-GLase)は、内因性および強制発現させた野生型MMP-2やMMP2-FLAGと同様に、プロ型で分泌され、正しくプロセッシングされると考えられた。以上から、MMP2-GLaseはMMP-2分泌の適切なレポータータンパク質である

と考えられた。

ルミノメーターを用いた MMP2-GLase の発光解析では、GLase 単体と同様に、発光基質であるセレンテラジン添加直後に高い発光活性を示し、経時的に徐々に発光活性が低下した。セレンテラジンの濃度が低いとき(1 $\mu\text{g/ml}$ 以下)では最大発光活性が低いものの、発光活性の低下が遅かった。これらの結果に基づくと、生物発光イメージングにおいて、一過性に出現して数秒以内に拡散する開口分泌を観察する上では、3-5 $\mu\text{g/ml}$ 程度のセレンテラジン濃度で比較的速いフレームレートが適していると考えられた。また細胞表面結合タンパク質を持続的に観察する上では、低濃度のセレンテラジンで比較的遅いフレームレート(フレームあたりの露光時間が長い)の条件が適していると考えられた。このように、GLase をプローブとして開口分泌と細胞表面結合のタンパク質を可視化するための、生物発光イメージングに適した発光基質セレンテラジンの濃度を決定した。

次に、HeLa 細胞に発現させた MMP2-GLase のビデオレート生物発光イメージングを行った(開口数 1.3 の 40 倍油浸対物レンズを使用)、セレンテラジンを培養液に加えて 20 秒後から露光時間 0.5 秒/フレームの発光ビデオ画像を取得したところ、画像取得直後から定常的に存在して徐々に消光する発光スポットと、一過性に出現し数秒以内に拡散する発光スポットの 2 種類が観察された。定常的な発光スポットの経時的な発光量の低下は、ルミノメーターで測定した発光活性低下曲線に一致することから、細胞表面に結合した MMP2-GLase が集積する微小領域(直径約 3 μm) の発光シグナルと考えられた。その一方で、一過性の発光スポットは開口分泌中の MMP2-GLase の発光シグナルと考えられた。このように、細胞表面に結合した MMP-2 と分泌された MMP-2 という 2 つの異なるタイプの MMP-2 分子をリアルタイムに可視化することができた。

細胞表面に結合した MMP2-GLase が消光した後の発光画像を用いて、MMP2-GLase の開口分泌シグナルを解析した。遊走 HeLa 細胞は、先端ラッフル膜からの積極的な開口分泌を示した。特に、先端に沿う一過性の連続性の開口分泌を示す頻度が高いことから、脱分極刺激非依存性の、構成性分泌における連続的な開口分泌機構の存在が示唆された。また、遊走細胞の先端と退縮端における特定の領域から繰り返し開口分泌が観察されたことから、細胞表面には MMP-2 開口分泌のホットスポット(直径約 2.5 μm) が多数形成されることが示唆された。また、100 倍対物レンズ(開口数 1.45)を用いて 0.5 秒の露光時間で発光ビデオ画像を取得し、開口分泌の頻度を解析した結果、先端周辺では 1 分間に数十回程度の開口分泌が起こっていた。

さらに、細胞の底面から上方まで焦点面を移動しながら解析した結果(60 倍対物レンズ、

開口数 1.35 を使用)単体の GLase を発現させた場合は、細胞上方に向けて迅速に拡散されるのに対して、MMP2-GLase は細胞基底側から徐々に拡散された。MMP-2 が繰り返し分泌される部位と、分泌された MMP-2 が細胞表面に結合する部位は、基底側の特定箇所に形成され、両者の分布は異なることが示唆された。

MMP-2 活性化タンパク質である MT1-MMP (MMP-14) について、GLase 融合 MMP-14 (MMP14-GLase) を作出した。また、MMP-2 と MMP-14 の結合に必要な分泌タンパク質 TIMP-2 についても GLase 融合タンパク質を作出した (TIMP2-GLase)。MMP14-GLase または TIMP2-GLase を発現させた HeLa 細胞において生物発光イメージングを行った結果、両者共に、MMP2-GLase と同様、遊走細胞の先端端から分泌される様子が可視化された。また、野生型 MMP-14 と MMP2-GLase を共発現させた HeLa 細胞と MMP-14 の発現量が高い HT1080 細胞に MMP2-GLase を発現させた場合、細胞表面に結合した MMP2-GLase がほとんど観察されなかった。1 分子の MMP-2 を活性化するには MMP-14 が 2 分子必要とされており、細胞表面に結合した MMP2-GLase が集積する微小領域の発光シグナルは、MMP-2 活性化部位であることが示唆された。

本研究により、我々は、「分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法」を確立し、MMP-2 の分泌動態を明らかにした。生細胞の細胞膜近傍におけるタンパク質動態を可視化する上では、全反射蛍光 (TIRF) イメージング法が主流であり、ガラスボトムディッシュのガラス面に接着した細胞膜において、開口分泌に至る前の小胞分泌動態を観察できる。また、2 光子励起蛍光イメージング法も開口分泌動態の可視化に応用されており、細胞間隙への蛍光物質の流入を利用して開口分泌中の小胞形態を観察できる。このような蛍光イメージング法に対して、我々の確立した生物発光イメージング法は、開口分泌現象を解析する上で同等の時空間分解能を得ることができ、全細胞表面の解析と、経時的な発光強度変化に基づく分泌量の変動解析という、蛍光法とは異なる利点がある。この利点を生かして、MMP-2 極性分泌部位の局在性を可視化することに成功した。細胞内のタンパク質分子を検出すること無く、細胞表面外側のタンパク質分子(開口分泌と細胞表面結合したタンパク質分子)を生細胞でリアルタイムに検出できるイメージング法は他に例が無い。このような特長から、我々の開発した生物発光イメージング法は、有用性と波及効果の高い手法として期待できる。

本研究は、MMP-2 の分泌局在や分泌制御について、新たな知見と示唆を提供した。今回の MMP-2 分泌動態についての研究成果は、今後の MMP-2 関連タンパク質の分泌機構の基礎的研究と、分泌機構を標的とした癌治療の創薬研究において、有効に活用することができると考えられる。

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 5件)

鈴木崇弘、井上敏：ビデオレート生物発光イメージング法によるタンパク質分泌動態の可視化. 生化学 86 (2): p281-285, 2014. (査読無)

Suzuki T and Inouye S: Video-rate bioluminescence imaging of protein secretion from a living cell. Methods in Molecular Biology, 1098: 71-83, 2014. (査読有)

Kitai Y, Fukuda H, Enomoto T, Asakawa Y, Suzuki T, Inouye S, Handa H: Cell selective targeting of a simian virus 40 virus-like particle conjugated to epidermal growth factor. Journal of Biotechnology, 155: 251-256, 2011. (査読有)

Suzuki T, Kondo C, Kanamori T, Inouye S: Video-rate bioluminescence imaging of matrix metalloproteinase-2 secreted from a migrating cell. PLoS One, 6: e25243, 2011. (査読有)

Suzuki T, Kondo C, Kanamori T, Inouye S: Video rate bioluminescence imaging of secretory proteins in living cells: localization, secretory frequency, and quantification. Analytical Biochemistry, 415: 182-189, 2011. (査読有)

[学会発表](計 5件)

鈴木崇弘、近藤千裕、金森孝雄、井上敏：ビデオレート生物発光イメージング法による分泌型および細胞表面結合型 MMP-2 の可視化. 第 21 回日本バイオイメーキング学会学術集会(京都), 2012. 8. 27.

鈴木崇弘、近藤千裕、金森孝雄、井上敏：ガウシアルシフェラーゼを用いた生物発光イメージング法による MMP-2 分泌の可視化. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会(岐阜), 2011. 10. 1.

鈴木崇弘、近藤千裕、金森孝雄、井上敏：ビデオレート生物発光イメージング：遊走細胞における MMP-2 分泌動態の可視化. 第 84 回日本生化学会大会(京都), 2011. 9. 23.

鈴木崇弘、近藤千裕、金森孝雄、井上敏：生細胞におけるタンパク質分泌のビデオレート生物発光イメージング. 第 20 回記念バイオイメーキング学会学術集会(千歳), 2011. 9. 1.

鈴木崇弘、近藤千裕、金森孝雄、井上敏：MMP-2 分泌のビデオレート生物発光イメージング. 第 10 回生命科学研究会(前橋),

2011. 6. 25.

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

第 21 回日本バイオイメーキング学会学術集会ベストイメーグ賞受賞

女子中高生夏の学校 2013 (独立行政法人国立女性教育会館、2013.8.8-10 開催)における日本バイオイメーキング学会のポスター出展への研究資料提供

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 崇弘 (SUZUKI TAKAHIRO)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：70298545

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

井上 敏 (INOUE SATOSHI)
JNC (株)・横浜研究所・主席研究員
研究者番号：40426622