

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24750029

研究課題名(和文) 二量化、クラスタ構成、および膜受容体細胞内輸送に関する単一分子蛍光の研究

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism underlying the dimerization, clustering and intracellular delivery of epidermal growth factor receptor in living cells.

研究代表者

B i j u V ・ P i l l a i (Biju, Vasudevan Pillai)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：60392651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、個々の細胞内での単一分子の時間ゲートおよび輝度ゲート蛍光イメージングに応じたEGFRの二量化とクラスターリングの動態を調べた。初期段階ではEGF-EGFR-EGFR(ヘテロダイマー)とシグナル伝達二量体(EGF-EGFR)₂が細胞内で均一に存在した。時間経過とともにシグナル伝達二量体が支配した、それはヘテロダイマーを犠牲にしてシグナル伝達二量体が形成されたことを示唆する。また、EGFRの小クラスターが約15分で出現し、細胞内取り込み前に数、量ともに増加した。結果、EGFRによる無制御シグナル伝達は、シグナル伝達二量体にヘテロダイマーの不均化抑制をすることにより抑制可能になる。

研究成果の概要(英文)：In this project, the kinetics of EGFR dimerization and clustering were investigated as functions of time- and intensity- gated fluorescence imaging of single-molecules in individual cells. Initially, EGF-EGFR-EGFR (heterodimer) and signaling dimer (EGF-EGFR)₂ were equally and uniformly present in cells. With time, signaling dimers dominated, which suggests the formation of signaling dimers at the cost of heterodimers. Also, small clusters of EGFR were appeared at ca 15 min, which grew in both number and size before endocytosis. These results suggests that uncontrolled signaling by EGFR can be suppressed by the suppression of disproportionation of heterodimers into signaling dimers.

研究分野：化学

キーワード：EGFR 細胞シグナル伝達 単一分子研究 FRET 細胞内輸送 受容体クラスターリング 受容体二量化

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ受容体ファミリーのメンバーであり、上皮増殖因子受容体(EGFR)細胞外領域への成長ホルモンの結合【トランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α)と上皮成長因子(EGF)】により駆動する細胞シグナル伝達は、胚性幹細胞構築や規則的成長、そして多様な細胞型形成の中心的役割を果たす。しかしながら一方で、EGFRの過剰発現による望ましくない細胞シグナル伝達は、多くのがんと腫瘍血管新生の病態生理学的特徴である。その結果として、がん治療においてEGFRによるシグナル伝達阻害剤が広範囲で研究されている。今まで別のメカニズムがEGFR媒介の望ましくない細胞シグナル伝達、およびがん増殖の主原因とされていた。例として、リガンド分泌は細胞内で高精度に制御されるが、シグナル伝達はがん細胞内の高密度EGFRによるリガンドの効率的削減により増幅することができる。それにもかかわらず、EGFR過剰発現に連動した腫瘍内微小環境におけるTGF- α およびEGFリガンドの持続的生成は、終始シグナル伝達を増幅する。さらに、EGFR間の受容体間相互作用およびシグナル伝達の多様化は、細胞内での望ましくないシグナル伝達および形質転換を意味しているが、詳細は不明のままである。

EGFRによるがん増殖とシグナル伝達との重要な関係性から、EGFR細胞外領域でのEGFリガンド結合およびシグナル伝達二量体へ引き続くEGFR活性化が総括的に研究されてきた。このような研究は、EGFによるEGFR活性化が細胞内シグナル伝達キナーゼ連鎖を引き起こすことを示唆している。さらに最近の研究では、遊離したEGFがなくてもEGFRシグナル伝達二量体が連続的に形成されることが明らかになっている。それは部分結合したEGFRと細胞シグナル伝達において非活性化したEGFRの協同的相互作用を示す。こうした背景では、EGFR間の根本的相互作用分子メカニズムを明らかにしない限り、がん増殖に対するEGFRシグナル伝達役割が完全に対処できないことを示唆している。このような相互作用を明らかにすることは、望ましくない細胞シグナル伝達を遮断することおよび効率的ながん治療法の計画に役立つ可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、典型例としてヒトがん細胞内のEGFR摂取による受容体の二量体化、およびクラスタ構成の基礎となる分子メカニズムを明らかにすることであった。特に、EGFRの相互作用の実験評価、それに引き続き、EGFホルモンの結合により活性化されたEGFRのクラスタ構成および細胞内輸送を目的とした。本研究は、EGFR活性化が二量体の会合と解離によって可逆的に起こるといふ仮説をたてた。しかし、この仮説は

EGFRクラスタが形成され内部移行されるまで不均化が継続することも意味する。これらの目標内容を遂行するために、以下の3項目を行った。

- (1)高安定でラベリングされたEGFリガンドおよび蛍光性量子ドットを用いて活性化されたがん細胞内でのEGFRの単一分子蛍光検出
- (2)2つのEGFR単一分子の二量体への会合の特徴およびEGFRクラスタの後発形成
- (3)がん細胞内におけるEGFRクラスタ構成の動態評価

3. 研究の方法

本研究の主な実験手法は、単一分子蛍光顕微鏡を用いた生細胞中のEGFR検出である。ヒト卵巣上皮がん(A431)細胞およびヒト肺上皮腺がん(H1650)細胞中の検出を行った。これらの細胞は当実験室にて維持管理した。市販の2種類のEGFホルモンサンプル(ビオチン含有もしくは非含有ヒト組み換え型EGF)を入手した。ビオチン非含有EGFを、ビオチンNHSエステルを用いてビオチン化し、その後CdSe/ZnS量子ドットもしくは量子ドット系蛍光磁気ナノ粒子を使用してラベリングした。量子ドットの発光波長は605nm、655nmもしくは705nmだった。EGF上のビオチンと量子ドット上のストレプトアビジンをEGFラベリングする過程において結合した。エネルギー供与体(量子ドット)とエネルギー受容体(AlexaFluor®633 dye)を用いてラベリングしたEGF分子において、定常状態もしくは時間分解した蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)データを調べることにより、アビジンビオチンを基にしたラベリングを確認した。

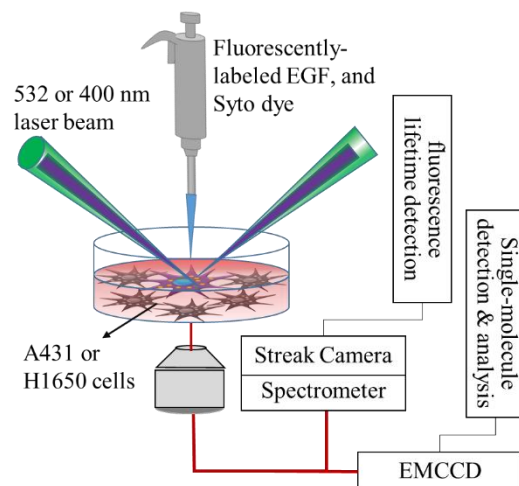


Figure 1. EGFR単一分子およびクラスタイメーキングの実験構成

ダルベッコ変法イーグル培地中で、10%ウシ胎児血清を60%以上補充し、60mm組織培養プレートで培養したA431細胞またはH1650細胞中で、EGFRの単一分子、二量体、クラスタを検出した。無血清培地に0°Cのラ

ベリングEGFサンプルを入れ、細胞内EGFRの蛍光ラベリングを行った。ある実験では、EGF量子ドットもしくはEGFナノ粒子コンジュゲートを用いたEGFRのラベリングに加え、細胞核がSyto染料(Syto21もしくはSyto13)使用により黄色もしくは緑色に染まった。400nmもしくは500nmレーザー光線で励起した細胞の蛍光画像およびEGFR単一分子、二量体、クラスターの蛍光画像を室温下、異なる時間間隔で記録した。蛍光検出もしくは蛍光イメージングの実験構成はFigure 1.に示す。電子増倍電荷結合素子(EMCCD)カメラを用いて、異なる時間間隔の細胞画像を収集した。そして単一分子蛍光分析システムを用いて、様々な蛍光スポットの輝度を記録した。

4. 研究成果

初めに、QD-ストレプトアビジンコンジュゲートとビオチン化したEGF分子の結合を、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定法で検証した。エネルギー供与体に量子ドット(蛍光約605nm)を、エネルギー受容体にAlexa Fluor® 633を用いてFRETシステムを構築した。次に、ビオチン化したコンジュゲートとストレプトアビジン-QDコンジュゲート混合物の蛍光スペクトルが別々の濃度で記録された。Alexa-EGF濃度が混合物中で増加するにしたがってQDの蛍光輝度が減少し、Alexa(Fig. 2A)の特徴的な蛍光バンドの出現や増大との関連が得られた。これらの結果はQDからAlexaへのFRETを示唆している。そしてそれはQD-ストレプトアビジンコンジュゲートとビオチン化されたAlexa-EGFコンジュゲートの結合に起因する。また、異なるQD:Alexa比条件下におけるQDs蛍光寿命を計測することでFRETを確認した。

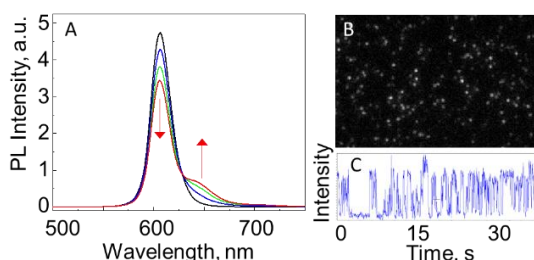


Figure 2. (A) Alexa-EGF濃度増加時における、ビオチン化Alexa-EGFコンジュゲートとQD-ストレプトアビジンコンジュゲートの混合物蛍光スペクトル (B) カバーガラス上でテザリングし、532 nmレーザーで輝くEGF-QDコンジュゲートの蛍光画像。画像は580 nmロングパスフィルターを通して収集した画像 (C) 単一分子蛍光明滅行動を示すEGF-QDコンジュゲートの蛍光輝度曲線

単一分子検出に用いた標準サンプルはEGF-QDコンジュゲートであったが、いずれの細胞も含まれていない。ここでは、アミノシラン化し、次にビオチン化したカバーガラス上でEGF-QDコンジュゲートを均一にテザ

リングした。EGF-QDコンジュゲート内にあるストレプトアビジンの遊離したビオチン結合ポケットをテザリングに利用した。蛍光画像(Fig.2B)および単一QDsでの特徴的な明滅蛍光曲線(Fig.2C)から単一分子EGF-QDコンジュゲートの検出を確認した。EGF-QDコンジュゲート溶液(約1 nM)で処理された細胞(H1650もしくはA431)は、細胞膜上で多数の蛍光スポットを示した(Fig. 3A)。処理後の時間経過とともに、核領域周辺の高輝度蛍光スポットを優先的に観察した(Fig. 3B)。細胞膜中での蛍光スポットの存在は、EGF-QDコンジュゲートのがん細胞中で過剰発現したEGFR細胞外領域への結合を示唆する。初期段階(5~15分)でQD-EGF-EGFR複合体は、細胞膜の糸状仮足部分もしくは葉状仮足部分に付着した。Fig. 3Cの画像で示すように、糸状仮足構造体と葉状仮足構造体が維持されたという事実があるにもかかわらず、QD-EGF-EGFR複合体はサイトゾルの中へ次第に輸送された(Fig. 3D)。

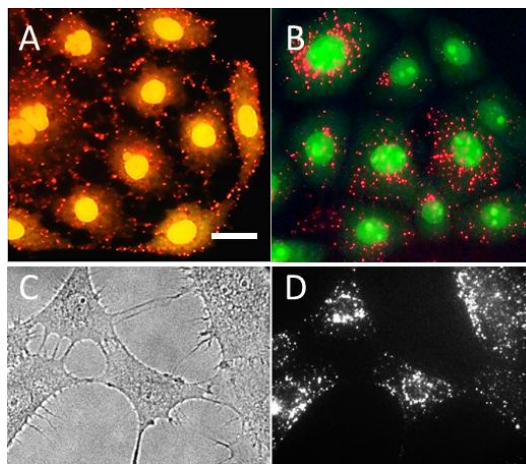


Figure 3. EGF-QDコンジュゲートを用いて活性化したEGFRs内のH1650細胞画像。(A) 活性化直後(15分以内)の蛍光画像 (B) 活性化後約60分の第2細胞サンプル蛍光画像 (C, D) 活性化後約60分の第3細胞サンプルの明視野および蛍光画像。スケールバー:20μm; 核染色。(A) Syto 21色素 (B) Syto 13色素

蛍光明滅および輝度から、初期段階では細胞膜上で観察した個々のスポット(Fig. 4A)は、1もしくは2量子ドットに相当する。言い換えれば、EGFRの二量体構造体を考察することにより、初期段階に観察した蛍光スポットは1あるいは2EGFによって活性化したEGFRプレダイマーを意味する。2EGFにより活性化されたプレダイマーはシグナル伝達二量体と呼ばれている。単一のEGF-QDコンジュゲートによって活性化したEGFRプレダイマーの典型的な蛍光輝度曲線、および2コンジュゲートにより活性化したシグナル伝達二量体を、それぞれFig. 4B, Cで示す。興味深いことに、シグナル伝達二量体の蛍光輝度は一段階の下降や上昇が見られた(Fig. 4C)。輝度低下はシグナル伝達二量体

の解離を示唆する。そしてそれはシグナル伝達二量体とプレダイマーの会合、および部分的に活性化された2つの EGFR 二量体形成の起因となり得る。同様に、輝度上昇は部分活性化した2つの EGFR 二量体がシグナル伝達二量体とプレダイマーの不均衡をもたらしたことを示唆する。他の可能性として、EGF-QD コンジュゲートがシグナル伝達二量体から遊離した (輝度低下)、あるいは自在に拡散する EGF-QD コンジュゲートが部分的に活性化した EGFR 二量体に加えられた (輝度上昇) という2点が挙げられるが、単一蛍光スポットが2つに解離する、または2蛍光スポットが1つに会合するという可視化の観点から除外した。しかしながら、蛍光スポットの拡散および量子ドットの明滅行動が、EGFR の解離と会合を詳細分析するための二大問題であった。

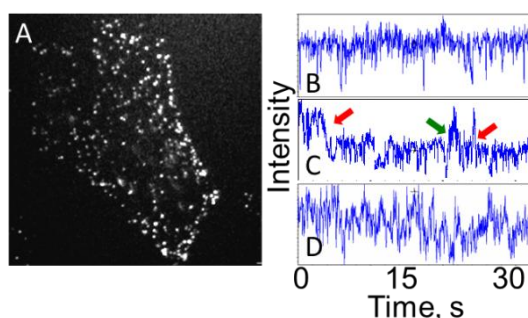


Figure 4. (A) EGF-QD コンジュゲートを用いて活性化後約 15 分時点で記録した H1650 細胞の蛍光画像 (B-D) 細胞内単一蛍光スポットの蛍光輝度曲線 (B) 1 量子ドット相当輝度のスポット (C) 2 量子ドット相当の初期輝度のスポット (D) 高輝度スポット

EGF-QD コンジュゲートを用いての細胞活性化後の間隔が経過すると、蛍光スポットの数が減少し、個々のスポットの蛍光輝度が増加した。これは活性化した EGFR の段階的会合、および細胞内取り込み前の細胞膜内クラスタ形成を示している。そのような単一量子ドットを用いて、細胞膜内の 500 を超える単一分子受容体と単一量子ドットの時間ゲート蛍光画像および輝度ゲート蛍光画像の相関により、スポットの蛍光輝度の時間変化を調べた。活性化後、異なる時間帯での様々なスポットの蛍光輝度ヒストグラムを Fig. 5A. に示す。活性化後 15 分以内で多数の受容体が 1 もしくは 2EGF-QD コンジュゲートと結合した (Figs. 4A, 5Ab)。これに引き続いて二量体および大型クラスタの出現頻度が増加した。増加の結果、ヒストグラムが高輝度方向に移動した (Fig. 5Ac,d)。2 量子ドット相当の出現の増加は、シグナル伝達二量体形成を示す (Fig. 5B)。活性化後 30 分以上制御した高輝度蛍光スポットは、1 もしくは 2EGF-QD コンジュゲートを用いて活性化した EGFR 二量体を元にしてクラスタ形成が行われたことを示唆する。

要約すると、ヒト由来がん細胞の細胞膜中で部分活性化した二量体、シグナル伝達

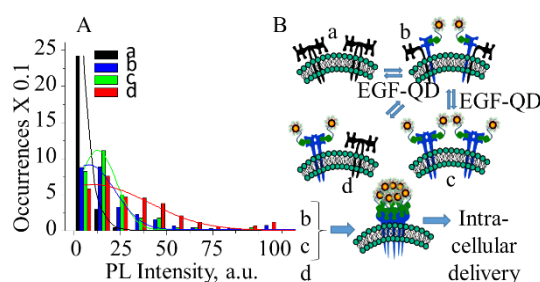


Figure 5. (A) 蛍光スポットの輝度ヒストグラム: (a) いずれの細胞を含まない単一 QDs、および 1 nM EGF-QD コンジュゲートを用いて活性化した H1650 細胞の細胞膜で検出したスポット (b) 15 分以内に検出したスポット (c) 30 分以内に検出したスポット (d) 30 分以上で検出したスポット (C) 活性化した EGFR の二量体化、解離、およびクラスタリングを示唆したメカニズム

二量体および EGFR クラスタを観察した。生体細胞中での単一蛍光スポットの輝度および動態分析によると、部分活性化シグナリングした二量体構造において EGFR が存在することを意味する。さらに、シグナル伝達二量体はプレダイマーとの会合および部分的活性化 EGFR の形成を行う。同様に、部分活性化した EGFR はシグナル伝達二量体を形成する。これらの二量体はさらに時間経過とともに会合し、大型クラスタ形成をする。そしてそれは細胞に取り込まれ、サイトゾル中の核周囲腔に輸送される。本研究結果は、部分活性化した EGFR の会合およびシグナル伝達二量体の解離を制御することにより、シグナル伝達二量体および細胞シグナリングの形成をコントロールできる可能性があることを意味する。とはいえ、シグナル伝達二量体形成の制御にはさらなる研究を要する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Shin-ichi Yamashita, Morihiko Hamada, Shunsuke Nakanishi, Hironobu Saito, Yoshio Nosaka, Shin-ichi Wakida, and Vasudevanpillai Biju, "Auger Ionization Beats Photo-Oxidation of Semiconductor Quantum Dots: Extended Stability of Single-Molecule Photoluminescence", *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, Vol. 54, pp 3892–3896 (2015).
- ② Vasudevanpillai Biju, "Chemical Modifications and Bioconjugate Reactions of Nanomaterials for Sensing, Imaging, Drug Delivery and Therapy", *Chemical Society Reviews*, 査読有, Vol. 43, pp 744-764 (2014).
- ③ Morihiko Hamada, Norifumi Takenokoshi, Keiji Matozaki, Qi Feng, Norio Murase, Shin-ichi Wakida, Shunsuke Nakanishi, and Vasudevanpillai Biju, "In Situ Photochemical Surface Passivation of

CdSe/ZnS Quantum Dots for Quantitative Light Emission and Enhanced Photocurrent Response in Solar Cells”, The Journal of Physical Chemistry C, 査読有, Vol. 118, pp 2178–2186 (2014).

- ④ Edakkattuparambil Sidharth, Shibu, Morihiko Hamada, Shunsuke Nakanishi, Shin-ichi Wakida, and Vasudevanpillai Biju, “Photoluminescence of CdSe and CdSe/ZnS quantum dots: Modifications for Making the Invisible Visible at Ensemble and Single-molecule Levels”, Coordination Chemistry Reviews, 査読有, Vol. 263-264, pp 2-12 (2014).
- ⑤ Edakkattuparambil Sidharth Shibu, Morihiko Hamada, Norio Murase, and Vasudevanpillai Biju, “Nanomaterials Formulations for Photothermal and Photodynamic Therapy of Cancer”, Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 査読有, Vol. 15, pp 53-72 (2013).
- ⑥ Philip Jones, Sakiko Sugino, Shohei Yamamura, Fred Lacy, and Vasudevanpillai Biju, “Impairments of Cells and Genomic DNA by Environmentally Transformed Engineered Nanomaterials”, Nanoscale, 査読有, Vol. 5, pp 9511–9516 (2013).

[学会発表] (計 18 件)

- ① Vasudevanpillai Biju, Shin-ichi Wakida, and Yasuhiro Suzuki, “Single-molecule Fluorescence Detections of Extracellular and Intracellular Transport of Nanobioconjugates”, 95th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan (2015.03.28, Nihon University, Chiba, Japan).
- ② Vasudevanpillai Biju, Shin-ichi Wakida, and Yasuhiro Suzuki, “Single-molecule Fluorescence Detections of the Dynamics and Transduction of Nanobioconjugates in Living Cells”, 8th Asian Photochemistry Conference (2014.11.11, Trivandrum, India).
- ③ Vasudevanpillai Biju, Shin-ichi Yamashita, Morihiko Hamada, Tamitake Itoh, Sunshuke Nakanishi, Shin-ichi Wakida, Syoji Ito, and Hiroshi Miyasaka, “Chemical Control of Bleaching, Blinking, Blueing and Brightening of Single Quantum Dots”, 2014 Annual Meeting of the Japanese Photochemistry Association (2014.10.12, Hokkaido University, Japan).
- ④ Vasudevanpillai Biju, Shin-ichi Wakida, and Yasuhiro Suzuki, “Formulation of Nanomaterials for Single-molecule Detections and Bioimaging”, 日本分析化学会第 63 年会 (2014.09.17, Hiroshima University, Japan).

- ⑤ Vasudevanpillai Biju, “Nanomaterials Engineered for Single-molecule Detections and Multimodal Bioimaging”, 3rd International Summer Course and Workshop on Single Molecule/Nanoparticle Spectroscopy and Imaging (2014.07.10, National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan).
- ⑥ Vasudevanpillai Biju, “Light and Materials in the Pursuit of Bilateral Relations”, the 10th Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience (2014.06.22, Ewha Womans University, Seoul, the Republic of Korea).
- ⑦ Vasudevanpillai Biju, “On the Optical Pathway of Nanomaterials to Life Science: Pitfalls, Prospects and the Roles of Cell Surface Receptors”, Optics’14 (2014.03.19, National Institute of Technology, Calicut, India).
- ⑧ Vasudevanpillai Biju, “Nanomaterials Formulations for Bioimaging”, Nanotech 2014 (2014.01.30, Tokyo Big Sight, Japan).
- ⑨ Vasudevanpillai Biju, “Nanomaterials for Multiplexed Fluorescence Imaging”, 4th Asian Spectroscopy Conference (2013.12.17, Nanyang Technological University, Singapore).
- ⑩ Vasudevanpillai Biju, “Engineered Nanomaterials: Potential Agents for Biological Applications or Potentiators of Toxicity”, Symposium on Emerging Materials for Health, Environment and Safety (2013.10.11, Indian Embassy, Tokyo, Japan).
- ⑪ Vasudevanpillai Biju, Edakkattuparambil Sidharth Shibu, Sakiko Sugino, Kenji Ono, Hironobu Saito, Shohei Yamamura, Shin-ichi Wakida, Yoshio Nosaka, and Makato Sawada, “Photouncaging Nanoparticles for Bioimaging”, 2013 Annual Meeting of the Japanese Photochemistry Association (2013.09.13, Ehime University, Matsuyama, Japan).
- ⑫ Vasudevanpillai Biju, “Bioengineered Nanomaterials: from Bioimaging to Nanotoxicity”, International conference on Nanoscience and Nanotechnology - ICONN2013 (2013.8.18, SRM University, Chennai, India).
- ⑬ Vasudevanpillai Biju, “Photoresponsive Nanomaterials for Bioimaging”, 26th International Conference on Photochemistry (2013.07.24, Catholic University of Leuven, Belgium).
- ⑭ Vasudevanpillai Biju, “Engineered Nanomaterials for Advanced Bioimaging”, International Conference on Material Science - ICMAT 2013 (2013.07.04, SunTech Convention Center, Singapore).
- ⑮ Vasudevanpillai Biju, “Multifunctional

Engineered Nanomaterials: Bioimaging Applications Vs Toxicity”, International Workshop on Photonics of Functional Nanomaterials (2013.05.09, City University of Hong Kong).

- ⑩ Vasudevanpillai Biju, “Optical Properties, Bioimaging Applications and Cytotoxicity of Engineered Nanomaterials”, Scientific Meeting (2013.02.05, University of Strathclyde, UK).
- ⑪ Vasudevanpillai Biju, Norio Murase, Morihiko Hamada, Philip Jones, and Edakkattuparambil Sidharth Shibu, “Quantum Dot Formulations for Energy and Electron Transfer”, RCAS-TNNA Symposium on Recent Development in Nanomaterials: Structure, Dynamics and Applications (2012.10.05, Academia Sinica, Taipei, Taiwan).
- ⑫ Vasudevanpillai Biju, Norio Murase, Edakkattuparambil Sidharth Shibu, Tamitake Itoh, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima, and Mitsuru Ishikawa, “Energy Transfer-mediated Photodecomposition of Undesired Acceptors to Reversibly Report the Condensation and Decondensation of DNA”, 2012 Annual Meeting of the Japanese Photochemistry Association (2012.09.13, Tokyo Institute of Technology, Japan).

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

ヴァスデヴァンピライ ビジュ (BIJU

Vasudevan Pillai)

産業技術総合研究所四国センター・健康工

学研究部門・生体ナノ計測研究グループ・

主任研究員

研究者番号：60392651