

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22113002

研究課題名（和文）細胞内情報伝達系の多次元 FRET イメージング

研究課題名（英文）Multidimensional FRET imaging of intracellular signal transduction

研究代表者

松田 道行 (Matsuda, Michiyuki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10199812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 151,400,000 円

研究成果の概要（和文）：FRETバイオセンサーは生きた細胞で細胞内情報伝達分子の活性を可視化する。しかし、これまで、ほとんど2次元培養細胞でのみの使用にとどまっていた。本研究では、FRETバイオセンサーを3次元培養あるいは生きた組織で使う技術を開発することを目的とした。FRETバイオセンサー遺伝子はしばしば組み換えを起こすために安定発現できなかった。この問題を克服するために、トランスポゾンを用いた遺伝子導入法を使った。特にTol2を用いるとFRETバイオセンサーを高発現するトランスジェニックマウスが容易に作成できた。このFRETマウスを使うことで、様々な細胞内情報伝達分子の活性が生きた組織で観察できた。

研究成果の概要（英文）：FRET biosensors visualize activities of signaling molecules in living cells. However, the use was limited mostly to the cultured 2D cells. Here, we aimed at developing technologies to apply FRET biosensors in 3D culture cells and in living tissues. Due to high recombination rates, stable expression of FRET biosensors had been a difficult task. To overcome this problem, we employed the transposon-mediated gene transfer. We found either piggyBac transposase or Tol2 transposase worked efficiently for the gene transfer of FRET biosensor cDNAs. In particular, we found tol2-mediated gene transfer worked efficiently to develop transgenic mice highly-expressing FRET biosensors, which we named FRET mice. By using FRET mice, we observed activation of various signaling molecules in living tissues.

研究分野：蛍光イメージング

キーワード：がん 二光子イメージング フレットイメージング 蛍光タンパク質 バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

20世紀後半に起きた生物学の爆発的進歩は、細胞培養技術と組換え DNA 技術の発明に負うところが大きい。この流れの研究においては細胞を集団として解析し、その中に存在する分子の平均的性質を生化学的に明らかにしてきた。この手法は多くの分子群の酵素学的性質を明らかにし、我々の身体がどういう部品 (=タンパク質) でできているかという疑問に回答の糸口を与えた。さらに、数理情報学的手法などを組み合わせることにより、細胞内情報伝達系を大まかにネットワークとして素描することを可能にした。この次のステップとして、一つ一つの細胞の中、あるいは細胞集団の中で、情報伝達分子群がいつどこで活性変化するかを解析し、情報伝達系をシステムとして理解していく必要がある。残念ながら、この目的には従来の細胞を集団として解析する生化学的手法は用いることができない。この問題を克服するべく我々は、多くの蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) の原理に基づくバイオセンサーを構築してきた。これらは低分子量 GTP 結合タンパク、チロシンリン酸化酵素、セリンスレオニンリン酸化酵素、イノシトールリン脂質の活性や量を生細胞で可視化するものである。しかし、これらの使用は培養細胞に限られており、より生理的条件下での使用が望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 上記の問題を背景に、本研究では、平面培養細胞からの脱却を目指した。硬いプラスチック底の上に成育した培養細胞と、やわらかい細胞外基質に囲まれた三次元の細胞とではその性質が大きく異なることが認知されている。この二次元培養細胞と三次元の細胞との大きな違いは、前者が均一な細胞集団とみなせるのに対し、後者は様々な形態を有する多様な集団である点である。本研究では、より生体に近い三次元環境での細胞内情報伝達のメカニズムを FRET バイオセンサーを使って明らかにする。特に、上皮細胞のがん化過程を FRET バイオセンサーで可視化する。このようなアプローチは同時にまた、細胞間での分子活性の違いをも明らかにすることが期待される。

(2) さらに上記の研究を一步先に進め、*ex vivo* あるいは *in vivo* での FRET イメージングを、二光子励起顕微鏡を用いてチャレンジする。まず、二光子励起顕微鏡で使用できる FRET バイオセンサーを開発し、組織内を浸潤する脳腫瘍において、低分子量 G タンパク質やセリンスレオニンリン酸化酵素がどのような活性分布をとるのか時空間的に明らかにし、これらの情報伝達分子の個体レベルでの意義を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 三次元培養系における上皮細胞がん化モデルの構築：腎上皮細胞 MDCK の三次元培養系においてがん化モデルを構築した。MDCK 細胞はラミニンを含むマトリゲル内で培養すると、単層の上皮からなる管腔構造を形成する。様々な増殖因子や活性化型分子の発現により、細胞が重層化した腺腫様形態を誘導することができる。そこで、この過程で、低分子量 GTP 結合タンパク質や、セリンスレオニンリン酸化酵素群の活性がどのように変化するかを時空間的に観察し、その意義を明らかにした。

(2) 三次元培養系に供する FRET バイオセンサーの開発：上記の研究には、細胞内で安定して発現し、かつ細胞間で活性のぶれない FRET バイオセンサーが必要である。もっとも広く用いられているシアン蛍光タンパク質 (CFP) と黄色蛍光タンパク質 (YFP) とを FRET ペアとするバイオセンサーは、その遺伝子が容易に組み換えを起こすために、通常は細胞内で安定発現しない。以下の3つの方法で、FRET バイオセンサーを安定に発現させた。

Teal fluorescence protein を CFP の代わりに用いた。

piggyBac あるいは Tol2 トランスポゾンを用いた。

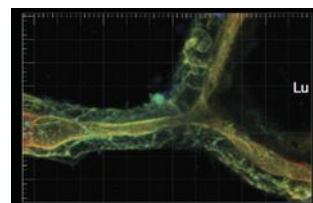
YFP を改変し、CFP との相同性を下げた。

(3) 脳腫瘍浸潤モデルの二光子励起顕微鏡による観察：より生体に近い実験系として、C6 グリオブラストーマ (悪性神経膠芽腫) 細胞のラット脳内接種モデルを用いた。GFP あるいは Keima 蛍光タンパク質を発現する C6 グリオブラストーマを脳内に接種し、その浸潤過程をスライスカルチャーにした脳組織を用いてビデオ画像化した。

(4) FRET バイオセンサーを発現するトランスジェニックマウスの作製：Tol2 トランスポゼースを使って FRET バイオセンサー発現ユニットをマウスに安定発現させた。ERK マップキナーゼ、PKA、Rac1、Cdc42、Ras、Rap1 などの FRET バイオセンサーを安定に発現するマウスを作成し、C57/BL6 系統にバッククロスした。

4. 研究成果

(1) 三次元培養系における上皮細胞がん化モデルの構築：腎上皮細胞 MDCK の三次元培養系においてがん化モデルを構築し、Ras を活性化すると、細胞が重層化した腺腫様形態を誘導できることを見出した。この過程で、低分子量 GTP 結合タンパク質である Rac1 や Cdc42 が部位特異的に活性化されることを見出した。

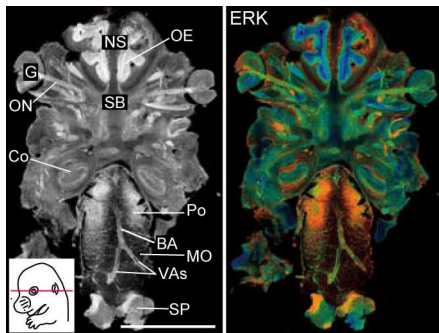


(2) 三次元培養系に供する FRET バイオセンサーの開発： piggyBac, Tol2 トランスポゼースあるいはレンチウイルスを介して遺伝子を導入することに成功した。

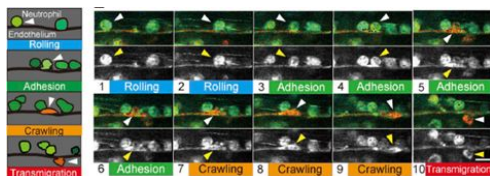
(3) 脳腫瘍浸潤モデルの二光子励起顕微鏡による観察： C6 グリオブラストーマ（悪性神経膠芽腫）細胞をラット脳内に接種し、その浸潤過程をスライスカルチャーにて可視化した。その結果、

(4) FRET バイオセンサーを発現するトランスジェニックマウスの作製： Tol2 トランスポゼースを使うと、高効率に FRET バイオセンサー発現マウス（FRET マウス）が作成できることを見出した。これらのマウスを使って以下の研究を行った。

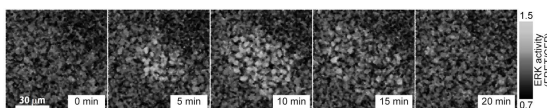
ERK 活性の脳内分布： ERK マップキナーゼの活性を測定する FRET バイオセンサーを恒常的に発現するトランスジェニックマウス EISUKE マウスを作製した。このマウスの胎児脳のスライスを多光子顕微鏡で観察すると脳内の ERK 活性地図が容易に作成できることが分かった。



好中球の血管外遊出過程における ERK の活性化： EISUKE マウスに腸炎を誘導した状態において、粘膜下の血管を観察し、好中球が血管外に遊出する過程における ERK 活性の変化を可視化した。好中球は、ローリング、接着を経て血管内皮の間をとって血管外に出るとされるが、接着の過程で ERK が活性化されること、ERK 活性はこの血管外遊出に必須であることを明らかにした。



上皮基底細胞における ERK 活性伝搬現象の発見： EISUKE マウスの表皮基底細胞を観察し、ERK 分子の一過性活性化が同心円状に伝搬していく現象を発見し、SPREAD と命名した。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 36 件)

1. Takaoka, S. et al. Live imaging of TAK1 activation in Lewis lung carcinoma 3LL cells implanted into syngeneic mice and treated with polyI:C. *Cancer Science* (2016).
2. Yamao, M. et al. Distinct predictive performance of Rac1 and Cdc42 in cell migration. *Sci Rep* 5, 17527 (2015).
3. Yamaguchi, T. et al. Role of PKA signaling in D2 receptor-expressing neurons in the core of the nucleus accumbens in aversive learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 11383-11388 (2015).
4. Wakayama, Y., Fukuhara, S., Ando, K., Matsuda, M. & Mochizuki, N. Cdc42 mediates Bmp-induced sprouting angiogenesis through Fmnl3-driven assembly of endothelial filopodia in zebrafish. *Developmental cell* 32, 109-122 (2015).
5. Kumagai, Y. et al. Heterogeneity in ERK activity as visualized by in vivo FRET imaging of mammary tumor cells developed in MMTV-Neu mice. *Oncogene* 34, 1051-1057 (2015).
6. Komatsubara, A.T., Matsuda, M. & Aoki, K. Quantitative analysis of recombination between YFP and CFP genes of FRET biosensors introduced by lentiviral or retroviral gene transfer. *Sci Rep* 5, 13283 (2015).
7. Komatsu, N., Fujita, Y., Matsuda, M. & Aoki, K. mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic Kras-mutant cancer cells. *Oncogene* (2015).
8. Hiratsuka, T. et al. Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *Elife* 4, e05178 (2015).
9. Hirata, E. et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* 27, 574-588 (2015).
10. Goto, A. et al. Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 6718-6723 (2015).
11. Yukinaga, H. et al. Fluctuation of Rac1

- activity is associated with the phenotypic and transcriptional heterogeneity of glioma cells. *Journal of Cell Science* 127, 1805-1815 (2014).
12. Ueyama, T. et al. Maintenance of stereocilia and apical junctional complexes by Cdc42 in cochlear hair cells. *Journal of Cell Science* 127, 2040-2052 (2014).
 13. Sadaie, W., Harada, Y., Matsuda, M. & Aoki, K. Quantitative in vivo fluorescence cross-correlation analyses highlight the importance of competitive effects in the regulation of protein-protein interactions. *Molecular and Cellular Biology* 34, 3272-3290 (2014).
 14. Mizuno, R. et al. In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines. *Journal of Experimental Medicine* 211, 1123-1136 (2014).
 15. Miura, H., Matsuda, M. & Aoki, K. Development of a FRET biosensor with high specificity for Akt. *Cell Structure and Function* 39, 9-20 (2014).
 16. Goto, A., Kamioka, Y. & Matsuda, M. PKA modulation of Rac in neuronal cells. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 321 (2014).
 17. Fujita, Y., Komatsu, N., Matsuda, M. & Aoki, K. Fluorescence resonance energy transfer based quantitative analysis of feedforward and feedback loops in epidermal growth factor receptor signaling and the sensitivity to molecular targeting drugs. *The FEBS journal* 281, 3177-3192 (2014).
 18. Mori, Y., Yagi, S., Sakurai, A., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Insufficient ability of Rac1b to perturb cystogenesis. *Small GTPases* 4 (2013).
 19. Kagawa, Y. et al. Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. *PLoS ONE* 8, e83629 (2013).
 20. Goto, A. et al. GDNF and Endothelin 3 Regulate Migration of Enteric Neural Crest-Derived Cells via Protein Kinase A and Rac1. *Journal of Neuroscience* 33, 4901-4912 (2013).
 21. Aoki, K., Takahashi, K., Kaizu, K. & Matsuda, M. A quantitative model of ERK MAP kinase phosphorylation in crowded media. *Sci Rep* 3, 1541 (2013).
 22. Aoki, K. et al. Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Molecular Cell* 52, 529-540 (2013).
 23. Aoki, K., Kamioka, Y. & Matsuda, M. Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: Basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Development Growth and Differentiation* (2013).
 24. Yagi, S., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Chimaerin suppresses rac1 activation at the apical membrane to maintain the cyst structure. *PLoS ONE* 7, e52258 (2012).
 25. Yagi, S., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Suppression of Rac1 activity at the apical membrane of MDCK cells is essential for cyst structure maintenance. *EMBO Report* 13, 237-243 (2012).
 26. Sakurai, A., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. Activated ras protein accelerates cell cycle progression to perturb madin-darby canine kidney cystogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 287, 31703-31711 (2012).
 27. Kunida, K., Matsuda, M. & Aoki, K. FRET imaging and statistical signal processing reveal positive and negative feedback loops regulating the morphology of randomly migrating HT-1080 cells. *Journal of Cell Science* 125, 2381-2392 (2012).
 28. Kamioka, Y. et al. Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell Structure and Function* 37, 65-73 (2012).
 29. Hirata, E. et al. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *Journal of Cell Science* 125, 858-868 (2012).
 30. Elfenbein, A. et al. Syndecan 4 regulates FGFR1 signaling in endothelial cells by directing macropinocytosis. *Science Signaling* 5, ra36 (2012).
 31. Aoki, K., Komatsu, N., Hirata, E., Kamioka, Y. & Matsuda, M. Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research. *Cancer Science* 103, 614-619 (2012).
 32. Parrini, M.C. et al. SH3BP1, an exocyst-associated RhoGAP, inactivates Rac1 at the front to drive cell motility. *Molecular Cell* 42, 650-661 (2011).
 33. Kumagai, Y., Kamioka, Y., Yagi, S., Matsuda, M. & Kiyokawa, E. A genetically encoded Förster resonance energy transfer biosensor for two-photon excitation microscopy. *Analytical Biochemistry* 413, 192-199 (2011).
 34. Komatsu, N. et al. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular Biology of the Cell* 22, 4647-4656 (2011).

35. Goto, A., Hoshino, M., Matsuda, M. & Nakamura, T. Phosphorylation of STEF/Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyl cAMP-treated PC12D cells. *Molecular Biology of the Cell* 22, 1780-1790 (2011).

36. Aoki, K., Yamada, M., Kunida, K., Yasuda, S. & Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12675-12680 (2011).

〔学会発表〕(計 42 件)

〔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

<http://www.fret.lif.kyoto-u.ac.jp/phogemon/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 道行 (MATSUDA, Michiyuki)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：10199812

(2) 研究分担者

清川 悦子 (KIYOKAWA, Etsuko)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：80300929

平塚 拓也 (HIRATSUKA, Takuya)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：90641639

大場 雄介 (OHBA, Yusuke)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：1010188620

(3) 連携研究者

青木 一洋 (AOKI, Kazuhiro)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80511427

中村 岳史 (NAKAMURA, Takeshi)
東京理科大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：60362604