

令和元年6月11日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07304

研究課題名(和文) 光学的MAPK活性操作による細胞生死シグナル制御機構の研究

研究課題名(英文) Optical control of MAPK signaling for understanding of cell-fate decision mechanisms

研究代表者

富田 太一郎 (TOMIDA, Taichiro)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：70396886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の様々な酵素の活性は必ずしも一定ではないことが明らかにされつつあり、同一の分子であっても、細胞内で時間的あるいは空間的な活性のバリエーションが存在して、その違いにより異なる細胞応答を生じる可能性が指摘されている。本研究では、細胞のストレス応答を担うp38の動的な活性の生理的意義を探索する目的に、光照射依存的なp38制御系の構築をねらい、これに成功した。また、炎症応答を引き起こすIL-1の刺激に対して、JNK活性が短時間しか持続しないという性質を有すること、また、この現象がp38依存的なJNKの抑制系に原因があることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光を用いて生きた細胞内の情報伝達機構を解析する手法の開発が世界的に盛んに行われており、身体の部位特異的に遺伝子操作や細胞機能を制御することが可能になりつつある。光による神経活動操作法が開発されて以来、光操作は神経科学研究などに多用されているものの、細胞内シグナルを直接的に光で制御するものは少なく、がんや免疫異常などの治療法探索に資する光操作技術は十分ではない状況である。本研究では世界に先駆けてMAPK活性操作手法の開発に取り組み、炎症応答や細胞ストレスの中心経路であるp38経路の活性制御手法の実現に成功した。また、JNK活性の可視化によりp38とJNKに新しい関連機構を見出すことにも成功した。

研究成果の概要(英文)：The spatial and temporal variation of intracellular signaling may play role in determining cell fates by inducing different cellular functions. In this study, the dynamics of intracellular kinases in living cells was investigated by developing the novel tools to quantitatively evaluate and control kinase activity for understanding its physiological significance. It was found that inflammatory IL-1 β stimuli elicits JNK activity only transiently because of the negative feedback inhibitory mechanism lying downstream of p38. In addition, optical control of p38 activity in living cells was achieved by developing a new tool which is composed of light-responsive domains and a kinase domain.

研究分野：生理学、薬理学、分子生物学

キーワード：炎症 キナーゼ イメージング 光遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物に普遍的な環境応答のメカニズムである MAPK 経路は細胞の生死や細胞増殖、分化を担う鍵分子として知られる。ヒト細胞には、主に細胞増殖に作用する ERK 経路と、細胞死などを誘導して増殖抑制的に働くストレス応答経路 (JNK、p38 経路) などの複数の MAPK 経路が組織普遍的に存在する。研究開始当初までに行った先行研究において、MAPK 経路に存在する分子の活性化をリアルタイムに「可視化」して解析する手法の開発に取り組み、生細胞内 ERK、JNK、p38 および TAK1-MAP3K (MAPK 経路の上流キナーゼ) の各キナーゼ活性の可視化に成功している (富田 Science Signal 2012、MCB 2009、Nature Commun. 2015)。その結果、抗がん剤や炎症性サイトカインなどの刺激の種類に依存して MAP3K や p38 活性は非常にダイナミックに時間変動しており、極端な場合には 30 分~数時間の間隔でキナーゼ活性が増減するオシレーション (振動) 現象も生じていることが明らかになっていた。また、ERK および JNK 経路においても同様の時間的変動やオシレーション現象が報告されており (富田 JPS 総説 2014)、各 MAPK 活性の「持続時間や強さ、振動頻度」の情報は細胞増殖や細胞死などの「生理機能発現」の鍵である可能性が考えられていた。しかし、その明確な対応は明らかになっていなかった

(2) 近年、光照射によって分子の構造変化や多量体形成を誘導する手法が開発され、例えば、光活性化型イオンチャネルをマウス脳内に導入してその行動を頭部への光照射で制御する研究が始まっている。しかし、キナーゼなどの細胞内シグナル分子を光照射によって直接制御する方法はまだほとんど存在しなかった。もし、光照射によって MAPK を任意に活性調節する手法が実現すれば、どのようなタイミングで生じた MAPK 活性が癌などの異常な細胞応答を招くメカニズムを理解する上で非常に有効であると考えられていた。

以上の背景から、本研究では、MAPK 経路のキナーゼ活性を任意の状態に変化させることのできる制御実験系の構築を試み、特に、光学的に生きた細胞の MAPK 活性を可視化すると同時に光照射で制御する系を構築することにより、生細胞内の MAPK 動態の制御機構およびその生理的意義の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、生細胞内で MAPK 活性を光照射により自在に制御する実験系の構築を目的とした。具体的には、光刺激依存的に多量体形成を生じる光応答分子と各 MAPK 経路分子との融合タンパク質を細胞に発現させ、光照射による MAPK 分子の多量体化および自己リン酸化反応を誘導する応答 (活性化) を誘導して、MAPK 活性を操作する手法を確立することを目的とした。

(2) 癌由来培養細胞を用いて刺激依存的な MAPK 活性化の動態 (持続時間や強さなど) を MAPK 活性可視化実験で解明する。

以上から、「細胞内 MAPK シグナルの時間変動パラメータ」と細胞機能との関連を明らかにすることを狙った。

3. 研究の方法

本研究では、まず、光照射依存的な MAPK 制御コンストラクトの構築と評価を行った。特定の波長の光照射によりキナーゼの酵素活性を惹起する光応答 MAPK 分子を発現するコンストラクトを作製した。その際、遺伝子操作法およびウェスタンブロット法などの分子生物学的手法、また蛍光分子 FRET イメージングおよび蛍光イメージング法などの細胞生物学的手法を用いて実施した。MAPK 経路のキナーゼ分子は、その多くが人為的にホモダイマーを形成させることにより、自己リン酸化反応を生じて、不活性化状態から活性化状態へと変化することが知られている。そこで、光照射に応答して多量体形成を生じる Cryptochrome、Phytochrome、Phototropin などに由来する光受容体ドメインに、MAPK 経路分子あるいは MAPK 上流分子をその N 末端あるいは C 末端に融合させる発現コンストラクトを多数作製した。それぞれ由来する Cryptochrome は青色光、Phytochrome は近赤色光、Phototropin は青色光で活性化されて、その光受容体ドメインは多量体化もしくは単量体化させることができる。作製した光応答 MAPK コンストラクト候補は HeLa 細胞に一過性に発現させてその光応答性の有無を確認した。また、同一の細胞で MAPK 活性をモニターしながら同時に独立に光制御する観察系を構築した。また、代表的なストレス応答 MAPK 経路の一つである JNK 経路の MAPK 動態を定量的 FRET イメージングにより解析した。HeLa 細胞に JNK-FRET レポータを恒常的に発現させ、IL-1 β 刺激による応答を解析した。

4. 研究成果

(1) 本研究では、まず、光応答ドメインと MAPK との融合コンストラクトの作製とその光応答性の検証を行った。p38 経路では、MAP2K-MAPK 間の融合タンパク質が恒常的活性化型 MAPK として機能することが知られていたため、光照射依存的に相互作用するコンストラクトを検討した。可逆的な光応答能を有する Cryptochrome 由来光応答ドメインとして、Cry2-CIBN および Cry2-oligomer の 2 つが報告されていたため、これらの光受容ドメインに p38 および上流分子との融合タンパク質を発現させるコンストラクトをそれぞれ作製して、p38 レポータ細胞に導入して光応答を解析した。その結果、光照射によって、レポータを活性化させる新規のコンストラクトを得ることに成功した。このとき、このコンストラクトを導入した細胞では、光照射によって細胞膜の運動が顕著に生じることを見出した。

当初作製した光応答コンストラクトは p38 分子を細胞に過剰発現するものであるが、このコ

ンストラクトでは、2分子を同一の細胞に同モル数を発現させる必要があるために一過的な発現系では安定した解析が困難なことがわかった。そこで、次に1分子でp38活性を誘導可能なコンストラクトの開発を行った。光応答ドメインとMAPK経路分子とを含有する新たなタンパク質を設計して、その発現コンストラクトを用いてHeLa細胞における光応答能を検証した結果、1分子のコンストラクトを得ることに成功した。しかしながら、この1分子コンストラクトにおいても、basalのp38活性も高くなる傾向があること、可逆的な応答を生じにくいこと、蛍光タンパク質を褪色させる程度の光照射量が必要であることの3点が理由で、そのまま制御実験に適用するのは困難であった。

そこで次に、1分子コンストラクトと同じ配置のまま、光応答ドメインを置換した新しいコンストラクトを検討した結果、比較的低照度でも光照射依存的にp38活性を惹起させるコンストラクトを得た。この新しいコンストラクトでは蛍光タンパク質イメージングによってp38活性化をモニターしながら、その観察用の光とは別の色の光を照射することによってp38活性を光照射依存的に誘導できることもわかった(図1)。この光応答ドメインに既知の変異を導入したところ、恒常的明応答になる変異では暗条件でもp38活性を誘導し、恒常的暗応答の変異ではp38活性は誘導されなくなることも確認された。以上から、光依存的なp38活性誘導と同時にp38活性のイメージングを両立できるという目標に達した。

抗がん剤 CDDP や etoposide, UV などが細胞死を誘導する際には p38 経路の活性化が持続的に生じることを以前に報告している(富田 MolCellBiol. 2009)。本研究において、p38 活性だけを光照射で誘導した細胞を観察したところ、細胞膜に小突起あるいは bleb 様の構造が生じており、膜の運動状態が光照射に対応して変動する様子が観察された。実際、p38 は細胞運動および細胞骨格 actin の重合制御を担う主要な因子の一つであることが報告されている。無刺激の状態では特徴的な変化はほとんど観察されないことから、持続的に p38 活性が生じたことが原因で、細胞膜の構造や状態に変化を生じさせる可能性がある。アポトーシスやネクロシス、あるいはネクロプトーシスなどの細胞死にはストレス環境で活性化されるキナーゼの関与が報告されているが、従来、特定のキナーゼ活性を短時間に惹起させる方法はほとんどなかった。本研究の実施により、ストレス応答経路の下流シグナルを上流シグナルとは独立に、かつ、10~20分程度の短時間に惹起できるようになったため、今後、p38 が寄与する細胞機能の解析に時間のファクターを導入することが可能な状況になった。

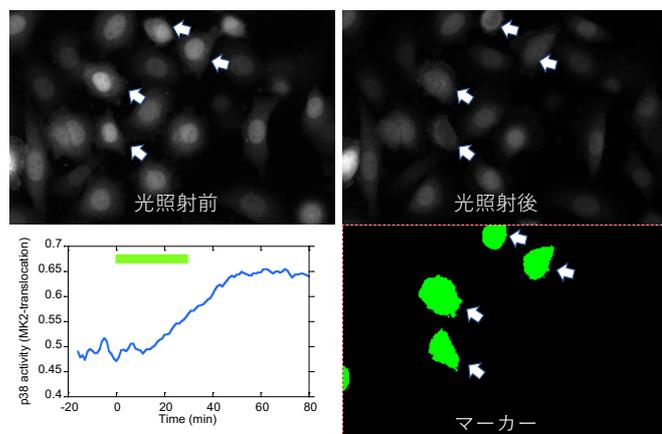


図1: 光照射によるp38活性化の可視化(MK2-mCherry)
光制御コンストラクトが導入された細胞(矢印)においてのみ、
光照射依存的にMK2-mCherryの核外移行(p38活性化)が観察された。

(2) JNK 経路の活性制御機構の解析

ストレス応答 MAPK 経路は多様な刺激を受けた細胞内で活性化される。増殖因子やサイトカイン、抗がん剤、細胞ストレスなどの刺激により活性化された JNK は炎症応答の誘導や細胞死、細胞分化などの多様な細胞応答を生じることが知られるが、その細胞内動態および制御が未解明であった。そこで、本研究において、FRET イメージング法および生化学的手法を用いて、典型的な JNK 活性化刺激に対する JNK 動態の解明とその制御機構の解析を行った。解析には HeLa 細胞を用いた。また、画像処理プログラムを作成し、1細胞毎に経時追跡可能な FRET 画像解析系を構築した。その結果、特に、炎症性サイトカインの IL-1 β により惹起された JNK 活性は比較的短時間に収束し、その後数時間にわたり刺激に応答しなくなることが見出された。このような一過的応答のメカニズムを生化学的に検証したところ、MAPK 下流に存在するホスファターゼの発現が原因であることを見出した。しかし、興味深いことに、断続的に十分な間隔をあけて、短時間の刺激を繰り返し与えた場合には、JNK 活性は少なくとも10時間以上も、繰り返し活性上昇することが見出された。したがって、慢性炎症に類する状況では JNK 活性は抑制されるが、断続的な免疫応答の場合にはその都度 JNK の活性化が可能になることが明らかとなった。刺激の種類や量ではなく、刺激の与え方(時間的な差)により、異なる応答性を示すメカニズム

はまだ不明な点が残るものの、この応答にホスファターゼが関与する可能性がある。そこで、JNK 制御の細胞内シグナルに関する数理モデルを構築してその制御メカニズムを検証したところ、JNK 活性化系とホスファターゼ発現系の2つを与えただけで特徴的な刺激応答特性が再現できることが検証された。その結果を踏まえて、JNK 抑制に関わる MAPK ホスファターゼの制御メカニズムとその作用を生化学的に解析したところ、特定の MAPK ホスファターゼの発現には p38 活性が必要であること、さらに、p38 活性を薬理的および遺伝学的に抑制すると JNK 活性にも増強が生じることが見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

①Shin Murai, Yoshifumi Yamaguchi, Yoshitaka Shirasaki, Mai Yamagishi, Ryodai Shindo, Joanne M. Hildebrand, Ryosuke Miura, Osamu Nakabayashi, Mamoru Totsuka, Taichiro Tomida, Satomi Adachi-Akahane, Sotaro Uemura, John Silke, Hideo Yagita, Masayuki Miura, Hiroyasu Nakano. A FRET biosensor for necroptosis uncovers two different modes of the release of DAMPs. *Nature Communications* 9, an4457. (2018) 査読有
DOI:10.1038/s41467-018-06985-6

②富田太郎 p38 活性のオシレーションと炎症遺伝子の制御. *生物物理* 57 卷(6), pp. 302-304. (2017) 査読有
DOI:<https://doi.org/10.2142/biophys.57.302>

③富田太郎, 赤羽悟美 FRET を用いたイメージング技術. *Clinical immunology & allergology*. 68, pp. 563-568. (2017) 査読無
<http://www.kahyo.com/brand/b-M201711-685>

〔学会発表〕 (計 5 件)

①Taichiro Tomida, Kimitaka Yamaguchi, Masanori Ito, Shingo Murakami, Yoshinori Mikami, Daisuke Ohshima, Satomi Adachi-Akahane
Systems-analysis of inflammatory JNK signaling using live-cell FRET imaging
第 91 回日本薬理学会年会・第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議(2018)

②富田太郎、山口君空、伊藤雅方、三上義礼、大島大輔、村上慎吾、赤羽悟美
炎症シグナルにおける JNK 制御の 1 細胞可視化解析
第 28 回日本循環薬理学会 (2018)

③Taichiro Tomida, Kimitaka Yamaguchi, Masanori Ito, Shingo Murakami, Yoshinori Mikami, Satomi Adachi-Akahane
Dynamics and regulation of inflammatory JNK signaling revealed by systems-analysis based on FRET imaging. 米国 62nd Biophysical Society annual meetings(2018)

④Taichiro Tomida, Kimitaka Yamaguchi, Masanori Ito, Shingo Murakami, Yoshinori Mikami, Satomi Adachi-Akahane
Quantitative imaging and mathematical modeling of JNK activation in inflammatory signaling.
第 95 回日本生理学会大会 (2018)

⑤Kimitaka Yamaguchi, Taichiro Tomida, Masanori Ito, Shingo Murakami, Yoshinori Mikami, Satomi Adachi-Akahane
JNK activity dynamics plays a crucial role in expression of inflammatory cytokines.
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2018)

〔図書〕 (計 1 件)

①富田太郎、他(分担執筆)
羊土社、実験医学増刊「生命科学で使えるはじめての数理モデルとシミュレーション」
pp. 174-177 (2018)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://gyoseki.toho-u.ac.jp/thuhp/KgApp?kyoinId=ymdkgsokggy>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
- (2) 研究協力者 なし

※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。