

令和元年6月6日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07343

研究課題名(和文)細胞間コミュニケーションにおけるコンタクトアクティベーション機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of contact activation mechanism in intercellular communication

研究代表者

斉藤 美佳子 (Saito, Mikako)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20291346

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)：細胞間分子情報伝達に関わるコネクシン(Cx)群の網羅的解析の過程で、マウスES細胞ではCx30.3が隣接する細胞間接触部位のみに発現することを見出していた。本研究は、このCx30.3の遺伝子およびタンパク質レベルでの発現解析を行った。Cx30.3遺伝子は、同種のES細胞同士がコンタクトすると、これにตอบสนองして発現増強することがわかり、そのプロモーター領域を決定し、細胞内シグナリング経路の初期過程を明らかにした。また、Cx30.3の発現をリアルタイムで解析したところ、短時間で細胞接触部位に移動する様子が観察され、Cx30.3は同種の細胞接触を認識する新機能がある可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Cx30.3が同種の細胞接触情報を細胞内に伝達し発現を増加するという細胞認識機能を有する可能性を示した。これは、異常な細胞が隣接している場合を検知できる可能性を示唆するものであり、多細胞生物の多様な細胞間コミュニケーションの分子機構の解明に向けた重要な知見である。ヒトを含む多細胞生物は、未分化状態の幹細胞から機能細胞への分化を経て、個体を創製し維持している。個々の細胞の性質は異なるが、細胞間のコミュニケーションによって全体として統御された機能を維持していると考えられる。この仕組みを解明することは、恒常性維持および恒常性破綻時の病気発症のメカニズムの解明につながり、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In the process of comprehensive analysis of the connexin (Cx) group involved in intercellular molecular signal transduction, it was found that Cx30.3 was expressed only at the adjacent cell-cell contact region in mouse ES cells. In this study, expression analysis was performed at the Cx30.3 gene and protein level. Cx30.3 gene expression was activated in response to cell-cell contact in ES cells. The promoter region of Cx30.3 was determined and the initial process of the intracellular signaling pathway was clarified. In addition, it was observed that Cx30.3 moved to the cell-cell contact region in a short time when the expression of Cx30.3 was analyzed in real time. Cx30.3 might have the new function of recognizing the same type of cell-cell contact.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Cx30.3 コンタクトアクティベーション マウスES細胞 細胞間コミュニケーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発生から機能細胞へ分化する各段階で、細胞は異種、同種の細胞と幾度となく接触を繰り返す。そのような物理的な接触は、例えば、細胞外に存在するカドヘリンを介して行い、細胞内に情報として伝わり細胞選別機構として働くことが知られている。しかし、接触する細胞の種類は極めて多く、また細胞表面構造は一見同じでも細胞内の状態は全く異なる場合もある。したがって、細胞外分子による表面的な認識のみでは真の情報が得られない可能性が高い。そのため、相手細胞との接触情報を細胞膜で認識し、その情報を細胞内に伝達して速やかに活発化（コンタクトアクティベーション）する機能が重要であると考えられる。それによって、相手細胞の良否を、すみやかに判断することができるはずだからである。このようなコンタクトアクティベーション機能は、細胞間分子移動に関係しているはずで、当初ギャップジャンクションがその機能を果たしていると考えたがそのような内容の記述は全くなかった。そこで、ギャップジャンクションの機能を見直すべく、その構成分子であるコネキシン（Cx）分子群20種類の網羅的発現解析を改めて行ったところ、マウスES細胞において顕著に発現するアイソマーの一つCx30.3タンパク質が、ES細胞塊の細胞と細胞が接している場所のみに速やかに発現し、集積してプラークと呼ばれるギャップジャンクション会合体を形成してくることを見出した。また、Cx30.3遺伝子は、ES細胞を未分化に維持する化学物質（LIF）に速やかに応答する遺伝子であり、細胞塊を単一細胞にすると転写活性が10分の1以下になった。これらの結果から、隣接細胞に接触したという情報が細胞内に伝達され、続いて接触部位にCx30.3タンパク質を発現させてギャップジャンクションを形成し、細胞間コミュニケーションにより相手の情報を得ているのではないかと考えた。また、Cx30.3は必要が生じてから遺伝子レベルで速やかに転写され、必要がなくなるとまた速やかに排除されるというような動態を示していた。発現したCxタンパク質が細胞膜のどの位置を目指して運ばれていくのか、という問題はほとんど議論されてなく、ZO-1と呼ばれるタンパク質の関与が報告されたが、Cx30.3の発現動態と異なるものであった。Cx30.3の発現動態を捉えるには、単一細胞レベルで接触と非接触を繰り返しながら、Cx30.3タンパク質の発現をリアルタイムで解析する方法が必要である。このような実験は研究代表者の得意とする技術である、マニピュレーション技術を駆使して行なうことが不可欠の方法であった。

2. 研究の目的

研究代表者は、ギャップジャンクション構成タンパク質であるコネキシン群の網羅的解析の過程で、マウスES細胞ではCx30.3というアイソフォームが、隣接する細胞の細胞間接触部位のみに速やかに発現してくることを発見していた。本研究では、このCx30.3のES細胞における遺伝子およびタンパク質レベルでの発現解析を行い、Cx30.3が細胞接触部位のみに発現するメカニズムを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、本研究では以下の項目を中心に研究を推進した。

(1) Cx30.3遺伝子のプロモーター解析

データベース情報を元にCx30.3遺伝子のプロモーター領域を推測し、翻訳開始点から上流2,663 bpに存在する別のCx遺伝子（Cx31.1）までの領域、翻訳開始点から、転写開始点付近のヒトとマウス間でDNA配列の相同性がある領域を含む転写開始点から195 bp上流までの領域、翻訳開始点から転写開始点までの領域、の3つの領域をES細胞からゲノムDNA

を抽出し、EGFP をレポーター遺伝子とするベクターを作製した。各ベクターを ES 細胞へ導入しプロモーター活性を評価した。

(2) Cx30.3 遺伝子の細胞接触応答解析

ES 細胞の細胞懸濁液を培養ディッシュの蓋の裏にハンギングドロップ法により接触させたものと、十分なピペティングにより単一細胞化してディッシュに播種したものをそれぞれインキュベートし、一定時間後に細胞を回収し、Cx30.3 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した。また、ES 細胞と HeLa 細胞とをハンギングドロップ法により接触させた場合についても解析した。E-カドヘリンの抗体を用いて、E-カドヘリンの関与を調べた。

(3) Cx30.3 タンパク質の細胞接触に伴う時空間的発現解析

Cx30.3 と EGFP の融合タンパク質発現ベクターを ES 細胞および HeLa 細胞へ導入し、Cx30.3-EGFP 発現 ES 細胞および HeLa 細胞を作製した。ES 細胞同士あるいは ES 細胞と HeLa 細胞をマニピュレーションにより接触させた。EGFP 蛍光スポットの細胞膜内の位置を、HCIImage を用いて、細胞接触後の EGFP のスポットの変化をリアルタイムで連続観測した。対照実験として、ES 細胞と HeLa 細胞との接触実験も行った。

4. 研究成果

(1) Cx30.3 遺伝子のプロモーター解析

データベースを元に ES 細胞からプロモーター領域と予想されるゲノム DNA を抽出し、レポーター遺伝子 EGFP の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した。培地中の LIF に応答する領域は、翻訳開始点から上流 2,663 bp の領域と 翻訳開始点から、転写開始点付近のヒトとマウス間で DNA 配列の相同性がある領域を含む転写開始点から 195 bp 上流までの領域であることがわかった。一方、細胞接触においては 翻訳開始点から上流 2,663 bp の領域にプロモーター活性を有することがわかった。

(2) Cx30.3 遺伝子の細胞接触応答解析

細胞懸濁液のハンギングドロップ法による細胞接触あるいは単一細胞の状態から一定時間後の Cx30.3 の発現量を比較したところ、ハンギングドロップ法による細胞接触状態の Cx30.3 の発現量は、単一細胞の場合に比べて明らかに増大した(図1)。すなわち、Cx30.3 の発現は推定通り、細胞接触によって発現増強することが確認された。また、この応答は、異種細胞である HeLa 細胞と接触させた場合では、Cx30.3 遺伝子の発現増加は認められず、同種でのみ生じる応答であることがわかった。さらに、また、この細胞接触応答は、E-カドヘリンの細胞接着機能を抗体で阻害すると低下し、さらに、E-カドヘリンシグナルの下流因子である β -カテニンの siRNA によるノックダウンによっても発現低下することが明らかになった。以上のことから、ES 細胞同士が接触することにより E-カドヘリン- β -カテニンシグナル伝達系が関与し、Cx30.3 遺伝子の発現が活性化することが明らかになった(図2)。

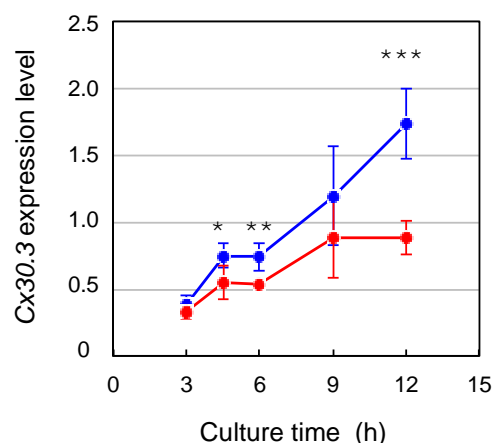


図1. ES細胞同士の接触に伴うCx30.3の発現量変化
青線:ハンギング法による接触
赤線:単一細胞を定法により培養
N=5 (12時間のみN=6, mean±SD)
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001

(3) Cx30.3 タンパク質の細胞接触に伴う時空間的発現解析

2 個の ES 細胞コロニー同士を接触させたところ、図 3 に示すように、速やかに接触点に向かって移動する蛍光スポットが確認された。しかし、接触時に 6 μm 以上離れている場合は、ほとんど影響を受けないようであった。2 個の単一細胞を一旦接触したのち、1200 秒後に細胞を強制的に離れたところ、細胞接触面から速やかに遠ざかる蛍光スポットが確認された。これに対して、ES 細胞を HeLa 細胞に接触させた場合は、それに伴う蛍光スポットの移動は全く観察されなかった。以上により、Cx30.3 は、同一の ES 細胞間接触を認識して、それに速やかに応答して細胞間連絡を迅速に制御していることが強く示唆された。

Cx30.3 タンパク質は、ES細胞同士を認識し、細胞と細胞の接触に応答して活性化し、すなわちコンタクトアクティベーションの機能を有する分子として初めて実体が捉えられた分子である。また、Cx30.3遺伝子の過剰発現ES細胞は細胞増殖活性が上昇する知見も得られた。以上の成果により、Cx30.3の新たな機能を発見したことで多細胞生物の多様な細胞間コミュニケーション機構の解明に向けた重要な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Naruwa Tokunaga, Ryota Kishi, Tomoko Sasai, Mikako Saito, "Enhancement of connexin30.3 expression in mouse embryonic stem cells line EB3 in response to cell-cell contacts", *Hum. Cell*, **32**(2), 95-102 (2019), DOI: 10.1007/s13577-018-00235-z. (査読有)
- (2) Mikako Saito, Shoya Hiratoko, Ikuko Fukuba, Shin-ichi Tate, Hideaki Matsuoka, "Use of a right triangle chip and its engraved shape as a transferrable x-y coordinate system from light microscopy to electron microscopy", *Electrochemistry*, **86**(1), 6-9 (2018), DOI: 10.5796/electrochemistry.17-00058. (査読有)

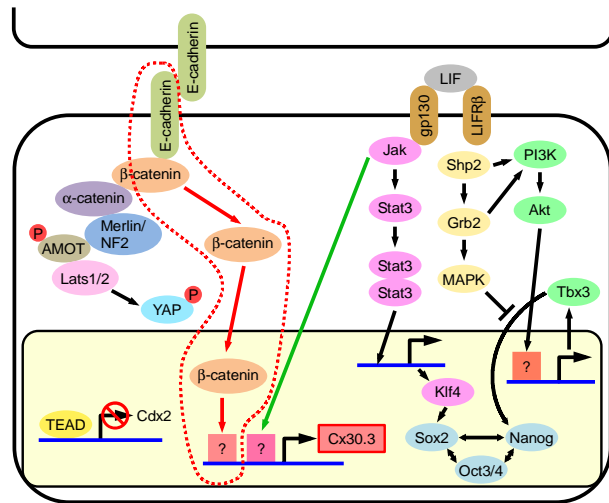


図 2. ES細胞におけるCx30.3コンタクトアクティベーション細胞内シグナリング経路
赤点線: 本研究により明らかになった経路、緑線: 先行研究により明らかになった経路

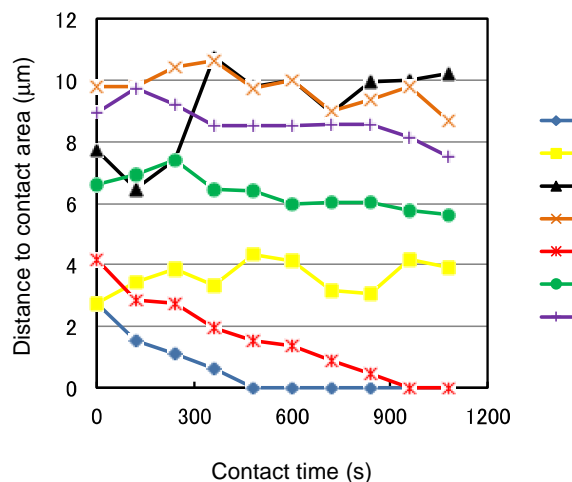
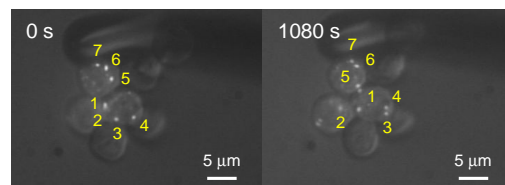


図 3. ES細胞同士の接触に伴うEGF蛍光スポットの移動

- (3) Mikako Saito, Misako Kaburagi, Keiko Otokuni, Genu Takahashi, "Functional role of natural killer T cells in non-obese pre-diabetes model mice", *Cytotechnology*, **70**(1), 423-430 (2018), DOI: 10.1007/s10616-017-0157-5. (査読有)
- (4) Mikako Saito, Ayano Ishida, Shota Nakagawa, "In vitro production of insulin-responsive skeletal muscle tissue from mouse embryonic stem cells by spermine-induced differentiation method", *Hum. Cell*, **30**(3), 162-168 (2017), DOI: 10.1007/s13577-017-0176-8. (査読有)
- (5) Mikako Saito, Yuma Asai, Keiichi Imai, Shoya Hiratoko, Kento Tanaka, "Connexin30.3 is expressed in mouse embryonic stem cells and is responsive to leukemia inhibitory factor", *Sci. Rep.*, **7**, Article number:42403 (2017), DOI: 10.1038/srep42403. (査読有)

[学会発表](計13件)

- (1) Mikako Saito, Naruwa Tokunaga, Ryota Kishi, Shoya Hiratoko, "Cell-cell contact responsive activation of Cx30.3 in mouse embryonic stem cells", International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2018, Melbourne (June 20-23, 2018).
- (2) 徳永成和, 斉藤美佳子, "Dynamic expression analysis of Cx30.3 in ES cell microenvironment", 第70回日本細胞生物学会大会, 東京 (2018年6月6日)
- (3) 岸 亮太, 増井陽香, 斉藤美佳子, "Expression analysis of connexin gene family in mouse hepatic cells", 第70回日本細胞生物学会大会, 東京 (2018年6月6日)
- (4) 斎藤哉樹, 斉藤美佳子, "Effect of the overexpression of connexin isoforms on HeLa cell proliferation", 第70回日本細胞生物学会大会, 東京 (2018年6月6日)
- (5) 笹井智子, 斉藤美佳子, "Effects of microenvironment on the connexin expression behavior in mouse melanoma cells", 第70回日本細胞生物学会大会, 東京 (2018年6月6日)
- (6) Mikako Saito, Keiichi Imai, Shoya Hiratoko, Naruwa Tokunaga, Ryota Kishi, "Novel function of Cx30.3 in mouse embryonic stem cells", International Gap Junction Conference, Glasgow (July 29-August 2, 2017).
- (7) 徳永成和, 今井慶一, 平床聖也, 斉藤美佳子, "マウスES細胞特異的Cx30.3のプロモーター解析", 第69回日本細胞生物学会大会, 仙台 (2017年6月15日)
- (8) Mikako Saito, Keiichi Imai, Shoya Hiratoko, Naruwa Tokunaga, Ryota Kishi, "Novel function of Cx30.3 in regulating pluripotency in mouse embryonic stem cells", International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2017, Boston (June 14-17, 2017).
- (9) 平床聖也, 福場郁子, 加治木泰範, 楯 真一, 斉藤美佳子, "細胞内ナノ空間動態解析のための光顕-電顕イメージング照合法の開発", 電気化学会第84回大会, 東京 (2017年3月27日)
- (10) 平床聖也, 岸 亮太, 徳永成和, 斉藤美佳子, "Cx30.3のES細胞における特異機能", 電気化学会第84回大会, 東京 (2017年3月27日)
- (11) Mikako Saito, Shoya Hiratoko, Naruwa Tokunaga, Yoshihide Ogawa, "Development of HeLa cell lines expressing specific connexins", PRiME 2016, Honolulu (October 2-7, 2016).
- (12) 斉藤美佳子, "細胞間動的コミュニケーションにおけるコネクシンの新機能", 国立精神・神

経医療研究センター―農工大合同シンポジウム, 東京 (2016年9月20日)

- (13) Mikako Saito, Yuma Asai, Keiichi Imai, Shoya Hiratoko, Yoshihide Ogawa, "Cell-cell contact super sensitive connexin found in mouse embryonic stem cells", International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2016, San Francisco (June 22-25, 2016).

〔図書〕(計1件)

- (1) 斉藤美佳子, “単一細胞からの組織の創製を支えるフェムトインジェクション技術”, 再生医療等製品の開発と実用化展望 製造技術・支援技術編 第30章, シーエムシー出版, 235-243 (2016).

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~msaito/>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 浅井 佑真

ローマ字氏名: (ASAI, yuma)

研究協力者氏名: 田中 健人

ローマ字氏名: (TANAKA, kento)

研究協力者氏名: 今井 慶一

ローマ字氏名: (IMAI, keiichi)

研究協力者氏名: 平床 聖也

ローマ字氏名: (HIRATOKO, shoya)

研究協力者氏名: 徳永 成和

ローマ字氏名: (TOKUNAGA, naruwa)

研究協力者氏名: 岸 亮太

ローマ字氏名: (KISHI, ryota)

研究協力者氏名: 斎藤 哉樹

ローマ字氏名: (SAITO, toshiki)

研究協力者氏名: 笹井 智子

ローマ字氏名: (SASAI, tomoko)