

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570193

 研究課題名（和文） 細胞膜損傷が誘起する細胞間情報伝達の機序  
 およびその意義の解明

 研究課題名（英文） Research on the role of intercellular signaling induced by cell  
 membrane disruption

研究代表者

東郷 建（TOGO TATSURU）

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：40334247

研究成果の概要（和文）：細胞膜にできた小さな損傷の修復にはエキソサイトーシスが必須である。これまでに、細胞膜に繰り返し損傷を与えると2回目の損傷修復が1回目よりも早く、この修復促進反応には、以前の損傷からの時間に応じてプロテインキナーゼCやプロテインキナーゼAのキナーゼ活性、および転写因子 CREB に依存した遺伝子発現を必要とすることを明らかにしてきた。本研究において、細胞膜損傷を受けた細胞のみならず、その周辺の細胞においても CREB 依存的な遺伝子発現が活性化され、膜修復が促進されることを明らかにした。さらに、一酸化窒素/プロテインキナーゼGを介した情報伝達経路が、周辺の細胞における CREB の活性化を誘起していることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Resealing of a disrupted plasma membrane at the micron-diameter range requires  $Ca^{2+}$ -regulated exocytosis. Repeated membrane disruptions reseal more quickly than the initial wound, and this potentiation of membrane resealing persists for at least 24 hours after the initial wound in a wounded cell. The present study demonstrates that membrane resealing is potentiated in both wounded and neighboring cells in MDCK cells. Wounding of cells induces CREB phosphorylation, not only in wounded cells, but also in neighboring cells. Inhibition of the nitric oxide (NO)/protein kinase G (PKG) signaling pathway suppresses CREB phosphorylation in neighboring cells, but not in wounded cells. The potentiation of membrane resealing in neighboring cells is suppressed if the NO/PKG pathway is inhibited during the initial wound. Together, these results suggest that the NO/PKG pathway stimulates CREB phosphorylation in neighboring cells so that subsequent cell membrane disruptions of the neighboring cells reseal more quickly.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

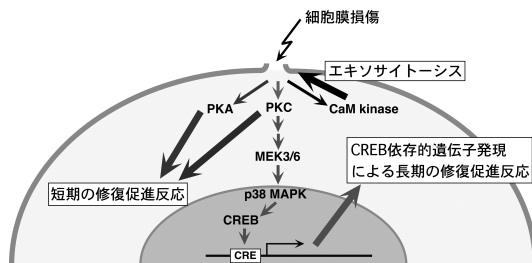
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：膜修復、細胞間情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜の損傷は、心臓・血管、筋肉、消化器、角膜、皮膚など物理的な負荷がかかる組織・器官を構成する細胞で広く観察される現象である。通常、細胞はこれらの損傷を修復して生き延びている。この修復システムの破綻は、例えば筋ジストロフィーに見られるように、多細胞生物の身体の維持に重大な影響を及ぼす。

細胞膜の損傷修復は、脂質二重層の物理化学的性質によって受動的にあるいは自発的に修復されると考えられがちであるが、1990年代以降、修復には細胞自身の積極的な関与が必要であることが明らかとなってきた。すなわち細胞は、細胞膜の損傷箇所から流入する  $Ca^{2+}$  に反応して、エキソサイトーシスや小胞同士の融合を誘起し、損傷の修復を達成している。



これまでの線維芽細胞や上皮細胞を用いた細胞膜損傷の修復機構の研究によって、細胞膜に繰り返し損傷を与えると2回目の損傷修復が1回目よりも早いことを見出してきた(文献1,2)。さらに、この修復促進反応には、以前の膜損傷からの時間に応じて幾つかの機構があることを明らかにしてきた。例えば、損傷の間隔が5分程度の場合、プロテインキナーゼCやプロテインキナーゼAのキナーゼ活性が修復促進には必要である。また、損傷の間隔が24時間という長期になると、修復促進反応には転写因子 CREB (cAMP response element binding protein) に依存した遺伝子発現が必要となる(上図参照; 文献2,3)。

さらに、細胞膜損傷後の CREB 依存的な遺伝子発現を解析している過程で、細胞膜損傷を受けた細胞の周辺の細胞でも CREB が活性化されていることを見出した。この観察から、1個の細胞が受けた細胞膜損傷が、その細胞のみならず、周辺の細胞へも影響し、組織レベルで反応する機構が生体には存在するのではないかとこの着想を得た。

文献:

- (1) Togo, T, Bi, GQ, Alderton, JM, Steinhardt, RA: J Cell Sci 112, 719-731 (1999)

- (2) Togo, T, Alderton, JM, Steinhardt, RA: Mol Biol Cell 14, 93-106 (2003)

- (3) Togo, T: J Biol Chem 279, 44996-45003 (2004)

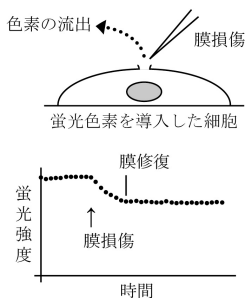
## 2. 研究の目的

本研究においては、1個の細胞が受けた細胞膜損傷が、周辺の細胞にどのように作用しているかを明らかにする目的で、(1) 損傷を受けた細胞がどのようにして周辺の細胞の CREB 依存的な遺伝子発現を誘起しているか、その情報伝達経路を明らかにし、(2) 損傷を受けた細胞の周辺で CREB 依存的な遺伝子発現を誘起された細胞において、実際に膜修復の促進反応が見られるかを検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞膜損傷の修復に要する時間の計測

実験に用いた細胞は MDCK 細胞である。まず、損傷を受けた細胞、およびその周辺の細胞に損傷を与えたときの、細胞膜の損傷から修復に至るまでの時間を比較した。具体的には、細胞に蛍光色素 calcein red-orange AM をロードし、その後、蛍光顕微鏡下でマイクロマニピュレータを用いてマイクロインジェクションと同じ操作で細胞膜損傷を与え、色素の流出 calcein red-orange の蛍光量の変化を経時的に測定した。膜損傷の修復完了までの時間は、calcein red-orange の蛍光量の減少が停止するまでの時間として計測することができる。



### (2) 周辺の細胞の修復促進反応における転写因子 CREB の役割の解析

CREB 依存的な遺伝子発現が、損傷を受けた細胞の周辺の細胞における修復促進反応に必要などうかを検討するため、CREB のドミナントネガティブベクターを導入し、上記の方法で膜修復に要する時間を比較検討した。

### (3) 周辺の細胞における CREB 活性化に至る情報伝達経路の解析

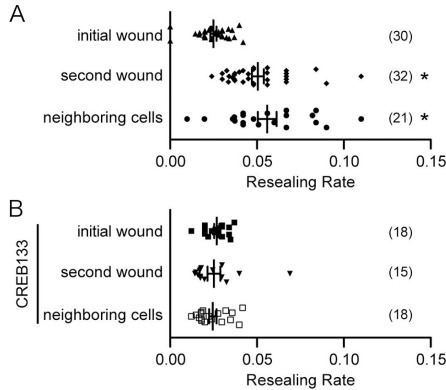
幾つかの情報伝達系を遮断することにより、周辺の細胞における CREB の活性化にどのような影響が出るかを、抗リン酸化 CREB 抗体を用いた免疫染色を指標に検討した。また、CREB の活性化に関与している情報伝達系を遮断し、実際に周辺の細胞において修復促進反応に影響がみられるか、細胞膜損傷の修復に要する時間を計測することによって検討した。

#### 4. 研究成果

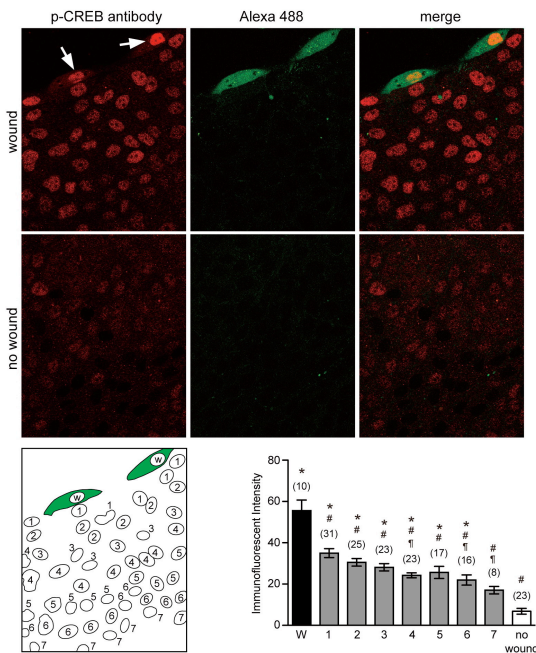
##### (1) 損傷を受けた細胞とその周辺の細胞における修復促進反応

まず、損傷を受けた細胞、およびその周辺の細胞における長期の修復促進反応を比較した (図 1)。図の横軸 Resealing Rate は、修復に要した時間の逆数を表している。

損傷を受けた細胞およびその隣に位置する細胞に対して、最初の膜損傷から 24 時間後に損傷を与えたところ、いずれも修復に要する時間が、1 回目の損傷の修復に要する時間より短かった (図 1 A)。



[図 1]



[図 2]

同様の実験を CREB のドミナントネガティブベクター (CREB133) を導入した細胞を用いて行ったところ、損傷を受けた細胞およびその周辺の細胞のいずれにおいても長期の修復促進反応が消失した (図 1 B)。

次に、CREB の活性化を評価するために、マーカー色素 Alexa488 存在下で MDCK 細胞のモ

ノレイヤーを注射針でひっかけ、細胞膜に損傷を与えた。その後固定し、抗リン酸化 CREB 抗体による免疫染色を行った (図 2)。

その結果、損傷を受けた (マーカー色素 Alexa488 を取り込んだ) 細胞 (図 2 矢印) だけにとどまらず、その周辺の細胞においても抗リン酸化 CREB 抗体による染色が認められた。さらに、膜損傷を受けた細胞に近い細胞ほど、抗リン酸化 CREB 抗体による免疫染色が強いことも明らかとなった。

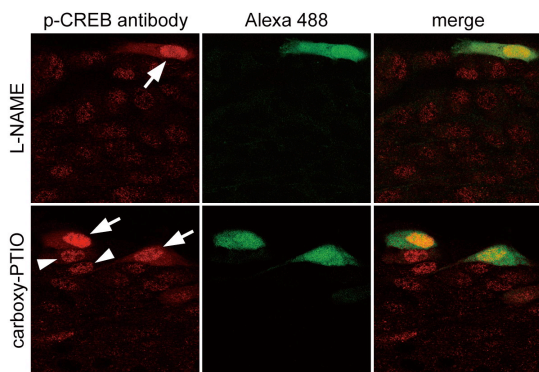
以上の結果から、周辺の細胞における長期の修復促進反応には転写因子 CREB を介した遺伝子発現が必要であることが示された。

##### (2) 周辺の細胞において CREB 活性化に至る情報伝達経路の解析

周辺の細胞における CREB の活性化に至る情報伝達経路を調べる目的で、幾つかの情報伝達系を遮断した条件下で細胞膜損傷を与え、抗リン酸化 CREB 抗体による免疫染色を行った。

まず、ATP による情報伝達の可能性を調べるため、ATP 加水分解酵素 apyrase 存在下で細胞膜損傷を与えたが、損傷を受けた細胞の近傍の細胞で CREB の活性化が認められた。次いでギャップジャンクションを介した情報伝達の可能性を調べるため、阻害剤 carbenoxolone を用いたが、CREB の活性化が認められた。

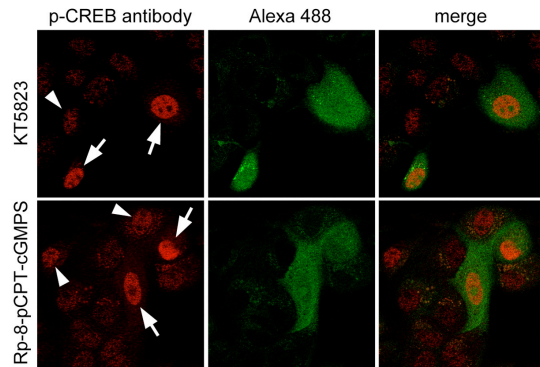
一酸化窒素 (NO) の関与を調べるために、NO 合成阻害剤 L-NAME 存在下で細胞膜損傷を与えたところ、損傷を受けた (マーカー色素 Alexa488 を取り込んだ) 細胞でのみ CREB の活性化が認められた (図 3 上、矢印)。さらに NO 除去剤 carboxy-PTIO を用いて、溶液中の NO を除いたところ、損傷を受けた細胞では CREB が活性化されていたが (図 3 下、矢印)、その近傍の細胞ではほとんど CREB が活



[図 3]

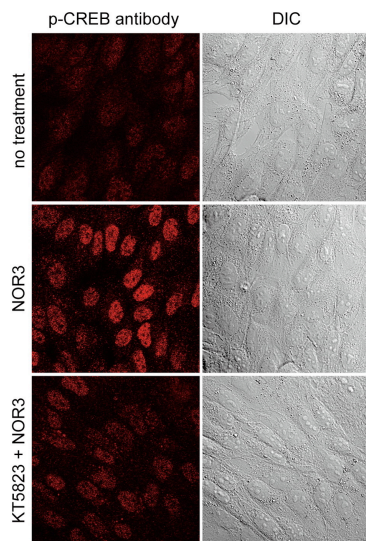
性化しなかった。以上の結果から、細胞膜損傷を受けた細胞が産生する NO が近傍の細胞に作用し、CREB の活性化をもたらしていることが示唆された。

NO はプロテインキナーゼG (PKG) を活性化させることが知られているので、次に PKG の関与を同様に検討した (図4)。KT5823 あるいは Rp-8-pCPT-cGMPs によって PKG 活性を阻害し、膜損傷を与えたところ、損傷を受けた (マーカー色素 Alexa488 を取り込んだ) 細胞では CREB が活性化していたが (図4 矢印)、その近傍の細胞ではほとんど CREB が活性化していなかった。



[図4]

次いで、NO と PKG の関係を確認するため、PKG 阻害剤存在下、非存在下で培地中に NOR3 を加え、NO を発生させた。その後、抗リン酸化 CREB 抗体による免疫染色を行った (図5)。NO による CREB の活性化は PKG 阻害剤によって抑制されたことから、NO が PKG の活性化に関与していることが示唆された。

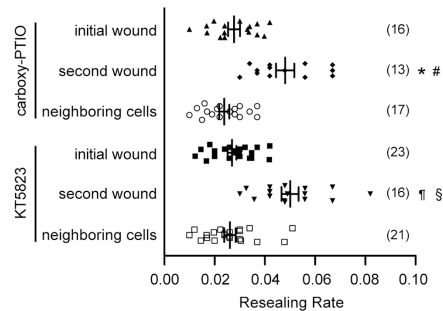


[図5]

最後に、NO 除去剤 carboxy-PTIO および PKG 阻害剤 KT5823 を用いて NO/PKG 情報伝達系を遮断して1回目の損傷を与え、損傷を受けた細胞、およびその周辺の細胞における長期の修復促進反応を比較した (図6)。図の横軸 Resealing Rate は、修復に要した時間の逆数

を表している。

NO 除去剤 carboxy-PTIO および PKG 阻害剤 KT5823 のいずれを用いた場合でも、損傷を受けた細胞における長期の修復促進反応は阻害されなかったが、近傍の細胞における修復促進反応は阻害された。



[図6]

### (3) 結論・今後の展望

本研究によって、細胞膜損傷を受けた細胞のみならず、その周辺の細胞において、NO/PKG を介した情報伝達経路によって CREB 依存的な遺伝子発現が活性化され、膜修復が促進されることを明らかにした。このように、組織に与えられた物理的な刺激に対して、実際に膜損傷を受けた細胞だけが反応するのではなく、組織レベルで物理的的刺激に反応していることが示された。

これまでの研究から、転写因子 CREB による遺伝子発現が修復促進には重要であることは明らかにできたが、実際の遺伝子産物が何であるかは全く検討できていない。今後、どのような遺伝子の発現が誘起されているのか、具体的な検討が必要である。

膜損傷を実際に受けた細胞における修復促進反応には、「1. 研究開始当初の背景」で述べたように、CREB 依存的な遺伝子発現を必要とする長期の反応に加えて、キナーゼ活性が関与する短期の反応がある。周辺の細胞における修復促進反応に、同様の短期の反応がみられるかを検討したところ、膜損傷の5分後には既に修復促進反応が観察されることを見出した (未発表)。このことから周辺の細胞においては、本研究で明らかにしてきた NO/PKG/CREB 依存的な長期の修復促進反応に加えて、短期の修復促進反応が存在することが明らかになった。また予備的な実験から、この短期の修復促進反応が ATP 加水分解酵素 apyrase によって消失することが明らかとなった (未発表)。このことから、1個の細胞が受けた細胞膜損傷が、NO による細胞間情報伝達に加え、ATP による細胞間情報伝達をも誘起していることが考えられる。現在、この短期の修復促進反応についての研究を進めており、細胞膜損傷が誘起する細胞間情報伝達の全体像の把握に努めている。

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1件)

- ① Togo, T. (2012). Cell membrane disruption stimulates NO/PKG signaling and potentiates cell membrane repair in neighboring cells. PLoS ONE 7, e42885.  
(査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0042885

[学会発表] (計1件)

- ① 東郷 建. Cell membrane disruption of a single cell stimulates NO/PKG signaling and potentiates cell membrane resealing in neighboring cells. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会, 5/31/2012, 神戸.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東郷 建 (TOGO TATSURU)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40334247

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし