

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702028

研究課題名(和文) ユビキチンプロテアソーム経路を利用した新規遺伝子発現制御に基づく細胞制御法の開発

研究課題名(英文) Development the system controlling cell function based on the gene regulation via the ubiquitin proteasome pathway

研究代表者

樋口 ゆり子 (HIGUCHI, Yuriko)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・講師

研究者番号：40402797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞治療においては、細胞の遺伝子発現制御により新しい細胞のDDSが可能になると考えられる。本研究の目的は、生体内の微小環境に応答するタンパク質発現制御システムを構築することである。IkBaとリプレッサーとの融合タンパク質を設計し、リプレッサーの結合配列の下流にレポータータンパク質としてbeta-galactosidaseの発現配列を配したベクターと一緒に細胞に発現させると、TNFa添加によりbeta-galactosidaseの発現が誘導された。ユビキチンプロテアソーム経路による分解を利用して分解するリプレッサーを設計し、TNFa添加により遺伝子発現誘導される遺伝子発現制御システムを構築した。

研究成果の概要(英文)：The gene regulation in the cell would lead a novel DDS in the cell based therapy. The purpose of this study is to develop the gene regulation system which responds to the microenvironment in the body. The repressor fused with IkBa was constructed and co-transfected with the vector expressing beta-galactosidase as a reporter protein which was inserted downstream of the operator. Beta-galactosidase expression was induced in those cells by TNFa treatment. We designed the repressor which is degraded via the ubiquitin proteasome pathway and developed a novel gene regulation system which activated by TNFa treatment

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：ユビキチンプロテアソーム経路 遺伝子発現制御 細胞製剤

1. 研究開始当初の背景

医薬品の治療効果を最大限に引き出すためには、薬物を治療の標的部位へ送達し、必要な時間、必要な量を作用させる Drug Delivery System (DDS) が有効な方法論となる。これは、細胞を投与・移植して治療を行う細胞治療においても同様で、投与・移植された細胞がどこで、いつ、どの様な機能を発揮するかが、治療効果を決定する重要な要素であると考えられる。研究代表者らは、これまで細胞の表面にリガンド分子を人工的に導入し、標的細胞との接着を改善することにより、細胞製剤を治療標的部位へ送達するシステムの開発を行っていた。その中で、薬物を治療標的部位へ送達するという従来の DDS の概念に基づいて細胞をデリバリーするという観点に加えて、細胞が持つタンパク質発現機能を有効に利用し制御することで、新しい細胞の DDS が可能になるのではないかと考えた。

細胞内のタンパク質発現量の制御機構の一つにユビキチンプロテアソーム経路によるタンパク質の分解がある。プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を分解することにより、タンパク質の寿命を制御し、細胞周期、転写、DNA 修復、シグナル伝達をはじめとする細胞内のさまざまなイベントに関与することが知られている。プロテアソームによる分解では、まず標的タンパク質がその中の特定の配列に対して E1, E2, E3 の酵素によりポリユビキチン化され、そのポリユビキチン鎖が認識されて分解される。これまで、ユビキチンを結合させた蛍光タンパク質や、ユビキチンプロテアソーム経路により分解を受けるタンパク質と融合させた蛍光タンパク質がプロテアソームにより分解されることが報告されている。また、ユビキチンプロテアソーム経路により分解を受けるタンパク質のリン酸化配列、ユビキチン化配列などユビキチン化に必要な配列だけを融合させた蛍光タンパク質もプロテアソームによる分解を受けることも報告されている。

I κ B α は、ユビキチンプロテアソーム経路により分解を受けるタンパク質である。定常状態で I κ B α は転写調節因子 NF κ B に結合し NF κ B による転写活性を不活性な状態に維持しているが、細胞外からのサイトカインなどによる刺激を受けると、I κ B α はポリユビキチン化を経てプロテアソームにより分解を受ける。その結果、NF κ B は核内へ移行し転写を開始する。

2. 研究の目的

がんや炎症の組織では、TNF α などのサイトカインの産生が亢進されている細胞が存在するため、局所的にサイトカイン濃度が高くなっていると考えられる。また、がんや炎症の組織において、NF κ B の転写活性が亢進されていることも知られている。従って、正常組織と比較して I κ B α の分解が亢進した状

態にあると考えられる。

本研究の目的は、生体内の微小環境にตอบสนองして細胞のタンパク質発現制御が可能なシステムを構築することである。そこで、タンパク質の発現を抑制するリプレッサーに I κ B α またはプロテアソームによる分解に必要な配列を融合させることにより、TNF α などのサイトカイン濃度が高いなどの I κ B α が分解される状態において分解されるリプレッサーを作成する。リプレッサーの結合配列の下流に目的のタンパク質の発現配列を配することにより、細胞外からのサイトカインなどの刺激によりリプレッサーの分解を経てタンパク質が発現するシステムとなる。

3. 研究の方法

ベクター構築

蛍光タンパク質には、発現してから比較的速度やかに蛍光シグナルが観察できることが知られる単量体 Kusabira-Orange2 (mKO2) (MBL) を選択し、pcDNA3.1 (Invitrogen) に、mKO2 の配列を挿入した。さらに、その C 末端側に、柔軟性が高いことが知られる GS-linker と human I κ B α (Gene ID:4792, Clone ID: RDB 6668, Riken) を挿入し、ベクターを構築した。

コントロールとしてリプレッサーだけを発現するコントロールベクターを作成した。リプレッサーと I κ B の融合タンパク質を発現するヘルパーベクターを構築した。また、レポーター遺伝子として β -galactosidase を選択し、その上流にリプレッサーの結合配列を配した発現ベクターを構築した。

細胞培養および遺伝子導入

Hela 細胞 (Riken Bioresource Center) は、10% FBS を含有する DMEM で培養した。遺伝子導入には FuGENE6 (Roche) を使用した。

タイムラプスイメージング

Hela 細胞を 35mm ガラスボトムディッシュに播種し、トランスフェクションして 24 時間培養した後、10 ng/ml の TNF α で 5 分間処理を行った。PBS で 3 回洗浄した後に、フェノールレッド不含 OptiMEM に培地を変更し、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1) で観察を行った。得られた画像データは、ImageJ を用いて解析を行った。

タンパク質発現の確認

Hela 細胞に、mKO2 または mKO2 と各種 I κ B α のドメインとの融合タンパク質を発現するプラスミドベクターをトランスフェクションし、一定時間培養した後、TNF α 処理を行った。回収した細胞のライセートに対して、抗 mKO2 抗体または抗 I κ B α 抗体を用いて、ウエスタンブロット法により評価を行った。

Hela 細胞にコントロールベクターまたはヘルパーベクターをトランスフェクションし、24 時間後の細胞抽出液に対して、抗リプレッサー抗体を用いたウエスタンブロット法によりリプレッサーの発現を確認した。

また、目的タンパク質の発現誘導に関しては、発現ベクターとコントロールベクターまたはヘルパーベクターをコトランスフェクションして24時間培養した後、TNF α 含有培地に変更しさらに12時間培養した。その後、細胞に対してX-gal染色またはBeta-Glo Assay System(Promega)を用いて β -galactosidaseの活性を定量した。

4. 研究成果

Hela細胞に融合タンパク質 mKO2-I κ B α を発現させ、蛍光顕微鏡で観察すると、蛍光シグナルは主に細胞質に観察された。次に、mKO2またはmKO2-I κ B α を発現させた細胞に対して、TNF α 処理を行い、タイムラプスイメージングにより経時的に蛍光シグナルを観察した。結果、mKO2を発現させた細胞においては、蛍光シグナルの減少はほとんど認められなかったが、mKO2-I κ B α を発現させた細胞においてはTNF α 処理をして2時間後にはほとんど蛍光シグナルが認められなかった。また、ウエスタンブロット法で細胞内のmKO2または融合タンパク質を評価したところ同様の結果が得られた。したがって、TNF α 処理によりmKO2-I κ B α が分解された可能性が示唆された。

そこで、mKO2-I κ B α の分解の速度を内在性のI κ B α と比較することを目的に、Hela細胞をTNF α 処理した後、I κ B α の発現量を経時的にウエスタンブロット法により評価した。内在性のI κ B α は徐々に減少し、60分後には、ほとんどバンドが観察されなかったが、90分後には、再びバンドが観察された。細胞外からTNF α などの刺激を受けると、I κ B α が分解され、結果、NF κ Bが活性化される。しかしながら、NF κ Bの転写活性によりI κ B α の発現が誘導され、NF κ Bが不活性化される負のフィードバック制御が存在することが知られている。90分後にバンドが復活したのは、この負のフィードバックの影響であると考えられる。しかしながら、mKO2-I κ B α の蛍光シグナルの減少は内在性のI κ B α の分解の速度とは一致しなかった。また、プロテアソーム阻害剤であるLactacystinの存在下ではTNF α を添加しても蛍光シグナルの減少は認められなかった。したがって、融合タンパク質の分解はプロテアソーム経路による分解であることが確認された。そこで、I κ B α を構成するドメインのいくつかを組み合わせることでmKO2との融合タンパク質を作製し、発現させた細胞の蛍光シグナルを観察した。PEST配列の無い融合タンパク質は、TNF α を添加しても全く蛍光シグナルが減少しなかった。一方、ユビキチン化配列、リン酸化配列およびPESTがあれば、ankyrin repeat domain 1-2の有無には関係なく同様に蛍光シグナルが減少し、これらの融合タンパク質の分解速度の推移は、mKO2-I κ B α と比べて内在性のI κ B α の分解速度の推移と比較的であった。

以上の結果より、TNF α を添加した時の

I κ B α との融合タンパク質のユビキチンプロテアソーム系による分解が確認できた。さらに、蛍光タンパク質に融合させたI κ B α の各ドメインとTNF α 添加による融合タンパク質の分解の関係に関して基礎的な情報を得ることができた。

次に、遺伝子発現制御システムの構築を目的に、リプレッサーとI κ B α の融合タンパク質を発現するベクターを設計、作製した。Hela細胞に、発現ベクターとコントロールベクターまたはヘルパーベクターのそれぞれの組み合わせで、コトランスフェクションした細胞に対してTNF α 処理したものと処理しないものを用意し、それぞれの細胞における β -galactosidase活性を評価した。発現ベクターおよびコントロールベクターをトランスフェクションした細胞では、TNF α 処理の有無にかかわらず発現量は、同程度であった(図1A B)。また、発現ベクターおよびヘルパーベクターをコトランスフェクションした細胞にTNF α 処理しなかった場合も同程度であった。これに対し、ヘルパーベクターをコトランスフェクションした細胞にTNF α 処理を行った場合、他の3群と比較して発現量が有意に高かった(図1A B)。

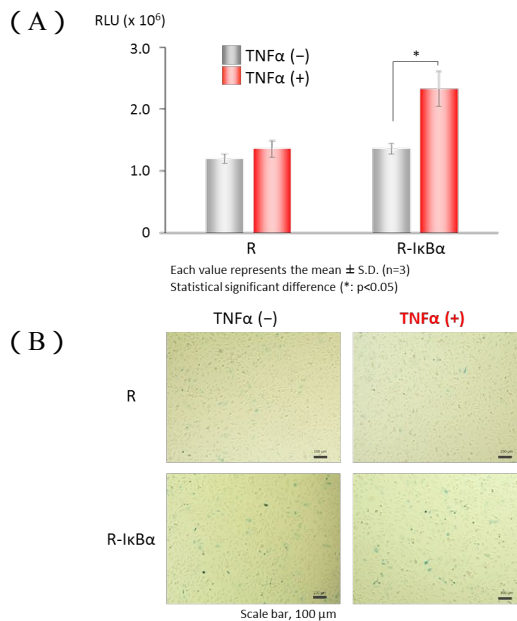


図1 発現ベクターおよびコントロールベクターまたはヘルパーベクターをコトランスフェクションしたHela細胞におけるTNF α による遺伝子発現誘導 β -galactosidase活性は、X-gal染色(A)または β -galactosidase assay(B)により評価した。

したがって、TNF α 処理はリプレッサーによる発現抑制に影響を与えないことが確認できた。また、発現ベクターとリプレッサーとI κ B α の融合体が共存する細胞にTNF α 処理を行うと、リプレッサーによる発現抑制が解除されることが明らかとなった。また、発現ベクターおよびヘルパーベクターをコトランスフェクションした細胞に0-100 ng/mlの異

なる濃度の TNF α 処理を行ったところ、濃度が高い方が β -galactosidase の活性が高かった。

TNF α 処理による遺伝子発現誘導におけるプロテアソームによる分解の関与を確認することを目的に、発現ベクターおよびヘルパーベクターをコトランスフェクションし、プロテアソーム阻害剤 Lactacystin を添加または未添加の細胞を用意し、それぞれの細胞における β -galactosidase 活性を評価した。阻害剤を添加した細胞の β -galactosidase 活性は、阻害剤を添加しなかった細胞に比べて有意に低く、その値は、TNF α 処理を行わなかった細胞と同程度であった(図2)。この結果から、リプレッサーとI κ B の融合体を発現する細胞において TNF α 処理により誘導される遺伝子発現には UPS によるリプレッサーの分解が関与していることが示唆された。

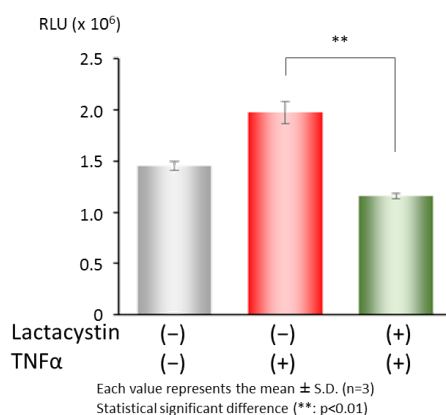


図2 発現ベクターおよびヘルパーベクターをコトランスフェクションした Hela 細胞における TNF α による遺伝子発現誘導 β -galactosidase 活性は、 β -galactosidase assay により評価した。

本研究においては、まず、蛍光タンパク質に I κ B α を融合させることにより、TNF α 添加による I κ B α との融合タンパク質の分解をタイムラプスイメージングで評価する系を確立した。プロテアソーム阻害剤を用いた検討で、融合タンパク質が TNF α 添加によりプロテアソーム経路で分解されることを確認した。さらに、I κ B α のリン酸化配列、ユビキチン化配列、ankyrin repeat domain、PESTなどの各ドメインを組み合わせて mKO2 と融合タンパク質を作製し、各ドメインと融合タンパク質の分解の関係を整理した。さらに、蛍光タンパク質のかわりにリプレッサーを融合させたタンパク質を発現するベクターを作製した。また、リプレッサーの結合配列の下流にレポータータンパク質として β -galactosidase を配したベクターを作製し、I κ B α 融合リプレッサー発現ベクターとコトランスフェクションすることにより、TNF α により遺伝子発現を on にするシステムを構築することができた。今後は、リプレッサーと融合させるドメインの設計による分解速度の調製などの改良を行うと共に、レポータータンパク質のかわりに機能性タンパク質

を導入することにより、細胞の機能制御に繋がることを期待できる。

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0件)

[学会発表](計9件)

Nilufar Rahimova, 樋口ゆり子、山下富義、橋田充、I kappa B alpha 分解のリアルタイムイメージングを目的として蛍光プローブの開発、第22回日本バイオイメージング学会学術集会、2013年9月15日、東京大学、東京

樋口ゆり子、生きたマウスにおける一細胞蛍光イメージング、第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013年11月23日、東北大学、福島

樋口ゆり子、組織吸引固定デバイスを用いたマウス体内の一細胞イメージング、第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4日、国立京都国際会館、京都

樋口ゆり子、蛍光イメージングを利用したマウス組織内における細胞の挙動・機能の評価、第6回薬学の未来を考える京都シンポジウム、2014年8月2日、京都大学、京都

樋口ゆり子、顕微鏡を用いた生体内リアルタイム蛍光イメージング、日本 DDS 学会創立30周年記念シンポジウム、2014年12月16日、東京ガーデンパレス、東京

樋口ゆり子、蛍光イメージングを利用した生きたマウスにおける細胞挙動の評価、第33回日本ヒト細胞学会学術集会、2015年8月23日、ホテルスカイタワー、宮崎

樋口ゆり子、細胞製剤の体内動態の制御と評価、日本薬学会第136年会、2016年3月28日、パシフィコ横浜、神奈川

ほか2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

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口ゆり子 (HIGUCHI Yuriko)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・講師

研究者番号：40402797