

論文要旨の内容

Fluorescent Indicators for Visualizing Lipid Second Messengers in Single Living Cells

(単一細胞内の脂質セカンドメッセンジャーを検出する蛍光可視化プローブ分子の開発)

上田 善文

序 ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP₃)やジアシルグリセロール (DAG)などの脂質セカンドメッセンジャーは、ホルモンや神経伝達物質などの細胞外刺激により産生され、細胞増殖、アポトーシスなどの細胞応答を制御することが知られている。しかしながら、これらの脂質セカンドメッセンジャーが、細胞のどの膜で、いつ、どのように産生されるのか明らかではない。そこで本研究では、脂質セカンドメッセンジャーの生きた細胞内での動態を明らかにすべく、PIP₃及びDAGの蛍光可視化プローブ分子を開発し、新たな知見を得ることを目的とする。

本研究で、検出対象となるPIP₃は、ホスファチジルイノシトールニリン酸(PIP₂)を基質としてホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(PI3K)により産生される。DAGは、フォスファチジン酸(PA)及びPIP₂を基質としてそれぞれPAホスファターゼ(PAP)及びホスホリパーゼC(PLC)により産生される(図1)。

蛍光プローブ分子の設計

蛍光プローブ分子を以下のように設計した(図2)。蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を原理として脂質メッセンジャーを定量的に検出するため、シアン色蛍光蛋白質(CFP)、黄色蛍光蛋白質(YFP)をプローブ分子に導入する。脂質メッセンジャー

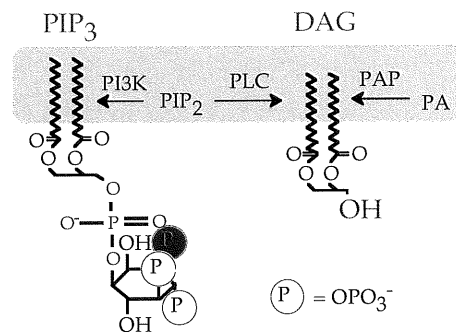


図1. 脂質セカンドメッセンジャーの産生機構

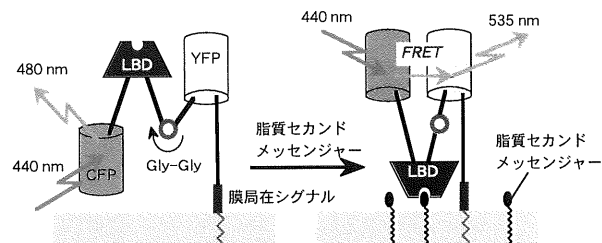


図2. Fliip, DAG-Fliip: 脂質セカンドメッセンジャーが産生されると、プローブの構造変化に伴うFRETの増加が起きる。

を選択的に認識する部位として、脂質結合ドメイン (LBD, lipid binding domain) を導入する。この LBD として PIP₃ 認識には、PH ドメイン、DAG の認識には C1B ドメインを用いる。CFP, LBD, YFP 間を剛直な、 α ヘリックスで連結する。このヘリックスに Gly-Gly を 1 箇所導入することによって、ここを起点にプローブ分子が回転できる。このように遺伝子工学的に開発した PIP₃ 及び DAG の蛍光プローブ分子をそれぞれ、flip, DAG-flip と名付ける (flip: a fluorescent indicator for lipid second messenger that can be tailor-made)。また、膜局在シグナルを連結することで、興味のある膜に局在させ、その膜での脂質メッセンジャーの産生を測定できる。細胞膜 (pm) 及び細胞内膜 (em; 小胞体膜及びゴルジ体膜) の PIP₃ 及び DAG 産生を測定するためのプローブ分子をそれぞれ flip-pm, flip-em, 及び DAG-flip-pm, DAG-flip-em と名付けた。産生した脂質セカンドメッセンジャーが LBD に結合すると CFP, YFP 間の距離及び相対的配向の変化によって FRET が増加、すなわち CFP と YFP の蛍光強度比が減少する。この FRET 応答から PIP₃ 及び DAG の動態分析を行う (図 2)。

PIP₃ を検出するための蛍光プローブ分子: flip-pm 及び flip-em の細胞内局在及び応答の確認

flip-pm 及び flip-em を遺伝子工学的手法により作製した。免疫染色法を用いて、両者が細胞膜及び細胞内膜 (ゴルジ体膜, 小胞体膜) に局在していることを確認した。次に、flip-pm 及び flip-em が PIP₃ に応答するかを確認するために、マイクロインジェクション法によって PIP₃ を導入したところ、PIP₃ 依存的に蛍光強度比 (CFP/YFP) の減少が観察された。このことより、PIP₃ との結合の結果、プローブ分子内で FRET が増加することがわかった。また、flip-pm と flip-em の蛍光強度比の減少は同程度だった。

細胞膜の PIP₃ を検出する Flip-pm

次に flip-pm が生理的刺激に応答するかを観察するために、血小板由来増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) を発現させたチャニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-PDGFR) に flip-pm を発現させた。ホルモンである血小板由来増殖因子 (PDGF) でその細胞を刺激すると、細胞膜において PIP₃ 産生が観察された (図 3b)。また、PI3K の阻害剤である wortmannin を添加し、5 分後に PDGF 刺激を行ってもプローブ分子の応答

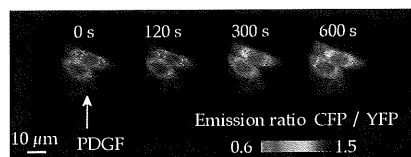


図3a. PDGF 刺激によって PIP₃ が細胞内膜で産生される様子を疑似カラー表示した。

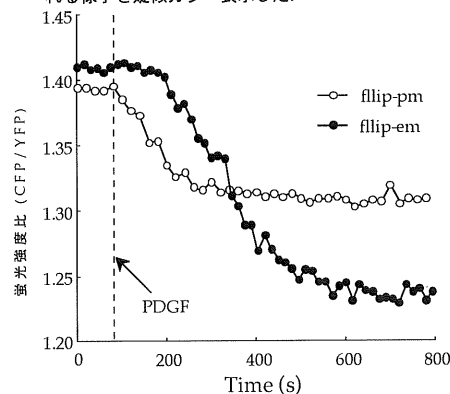


図3b. PDGF 刺激による細胞膜及び細胞内膜での PIP₃ 産生

は観察されなかった。これは、PDGF 刺激による PDGFR の自己リン酸化部位に PI3K が結合し、それにより、活性化した PI3K が細胞膜に産生した生理的濃度の PIP₃ を flipp-pm を用いて検出できることを示している。

細胞内膜の PIP₃ を検出する Flipp-em

次に、flipp-em を発現させた CHO-PDGFR 細胞において、PDGF 刺激を行うと、およそ 2 分後に急激な PIP₃ の産生が観測された (図 3a, b)。これにより、PDGFR の活性化に伴う PIP₃ 産生は細胞膜のみならず、細胞内膜においても起きていることを初めて見出した。また、細胞内膜での PIP₃ 産生は細胞膜での PIP₃ 産生に比べて 2 倍以上であることがわかった (図 3b)。さらに、細胞内膜での PIP₃ 産生量は、細胞膜での PIP₃ 産生量に比べて遅れることがわかった (図 3b)。このような細胞内膜での PIP₃ はどのようなメカニズムによって誘起されているかを調べるために、エンドサイトーシスを阻害する DynK44A、及び プロテインホスファターゼ-1B (PTP1B) をそれぞれ CHO-PDGFR 細胞に発現させた。PTP1B は小胞体膜に局在しエンドサイトーシスによって細胞内膜に運ばれた PDGFR を不活性化する。2 つの実験系において、PDGF 刺激による PIP₃ の産生は観察できなくなった。この結果より、細胞内膜において PIP₃ は、PDGFR のエンドサイトーシスを介して、細胞内膜上で *in situ* 産生されていることを初めて明らかにした。

結論 本研究では、生きた細胞内での PIP₃ の動態を可視化できる蛍光プローブ分子を開発し、生細胞内において、PIP₃ が細胞膜だけでなく、細胞内膜でも産生していることを明らかにした。この細胞内膜での PIP₃ 産生は PDGFR のエンドサイトーシスを介して細胞内膜上で *in situ* 産生されることを示した。

DAG を検出するための蛍光プローブ分子: DAG-flipp-pm 及び DAG-flipp-em の応答の確認

PKC 由来の C1B ドメインは DAG と選択的に結合することが知られている。そこで、LBD としてこのドメインを選択し、DAG-flipp を作製した。細胞膜及び細胞内膜への局在ドメインを DAG-flipp に取り付けることによって、DAG-flipp-pm 及び DAG-flipp-em を作製した。次に、DAG-flipp-pm と DAG-flipp-em が DAG に応答するかを確認するために、膜透過性を有し、C1B ドメインと特異的に結合する物質、ホルボールエステルを用いて、DAG-flipp-pm と DAG-flipp-em を評価した。ホルボールエステルを添加したところ両者とも蛍光強度比が減少した。この結果は、両者がそれぞれ細胞膜、細胞内膜の DAG を可視化するプローブ分子として使えることを示している。

DAG-flipp-pm を用いた細胞膜での DAG 産生の検出

細胞膜で産生される DAG を生細胞内で観察するため、Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に DAG-flipp-pm を発現させた。細胞外刺激の一つであるアデ

ノシン 5'-三リン酸 (ATP)で MDCK 細胞を刺激したところ、20 秒以内に蛍光強度比が減少し、3 分以内に回復した。また、この一過性の蛍光強度比変化は、PLC の特異的阻害剤である U73122 を ATP 刺激前に加えておくことで観察されなくなった。これらの結果は、生理的刺激によって起きた細胞膜における DAG 産生を DAG-flip-pm が検出できることを示しており、さらに、一過性の DAG 産生が細胞膜で起きることを生細胞内で初めて示した。次に、DAG の分解酵素である DAG キナーゼを阻害する R59949 を ATP 刺激前に加えておくことで、ATP 刺激による蛍光強度比の回復が観察されなくなった。この結果より、細胞膜で産生した DAG が DAG キナーゼによって分解されることを生細胞内で初めて示した。

次に、ATP などの細胞外刺激を受けていない細胞において、DAG が細胞膜に存在しているかを調べた。PLC 活性の阻害剤として U73122、PAP 活性の阻害剤として propanolol を用いた。DAG-flip-pm を発現させた MDCK 細胞に、U73122 及び propanolol をそれぞれ添加した。蛍光強度比に影響を与えないコントロールとしての緩衝溶液を加えた場合と同様に、両者によるそれぞれの蛍光強度比の変化は検出できなかった。これらの結果より、細胞外刺激を受けていない細胞において、DAG が細胞膜にほとんど存在していないことを示した。

DAG-flip-em を用いた細胞内膜での DAG 産生の検出

細胞外刺激により DAG が細胞内膜において産生するかを観察するために、DAG-flip-em を MDCK 細胞に発現させた。ATP 刺激後、3 分後に蛍光強度比が減少し、その後プラトーに達した。この結果より、細胞膜のみならず、細胞内膜においても DAG が産生されることを初めて見い出した。さらに、この細胞内膜での DAG 産生は PIP₃ と同様に DynK44A を用いた実験を行うことによって、エンドサイトーシスを介して起きることを明らかにした。

また、細胞外刺激のない状態で、DAG-flip-pm 及び DAG-flip-em の FRET を比較した。その結果、DAG-flip-em の FRET は DAG-flip-pm のそれに比べて大きかった。これより、細胞外刺激のない状態でも、DAG が細胞内膜で産生していることを生細胞内で初めて示した。そこで、この細胞内膜に存在している DAG がどのような機構によって産生されているかを調べた。MDCK 細胞に DAG-flip-em を発現させ、propanolol を添加すると、flip-em の蛍光強度比の増加が観察され、U73122 を添加した時には、蛍光強度比に影響を与えないコントロールとしての緩衝溶液を加えた場合と同様に、flip-em の蛍光強度比に変化は見られなかった。これらの結果より、細胞外刺激を受けていない時でさえ、PAP によって、DAG が細胞内膜で常時、産生されていることを生細胞内で初めて示した。

結論 本研究で明らかにした細胞内の DAG 濃度-時間プロファイルは図 4 のようになる。細胞膜では、細胞が細胞外 ATP 刺激を受けた時のみ、一過性の DAG 産生が起きる。この DAG 産生機構は、PLD によって産生され、DAG キナーゼによって分解

されることがわかった。この一過性の DAG 産生プロファイルからわかることは、細胞膜では、DAG の過剰な産生を妨げる DAG 分解機構が備わっていると考えられる。一方、細胞内膜においては、近年、DAG によって活性化される蛋白質が細胞内膜で各々に特有な細胞応答を制御していることが知られている。しかし、これらの蛋白質が細胞膜から離れた細胞内膜で、

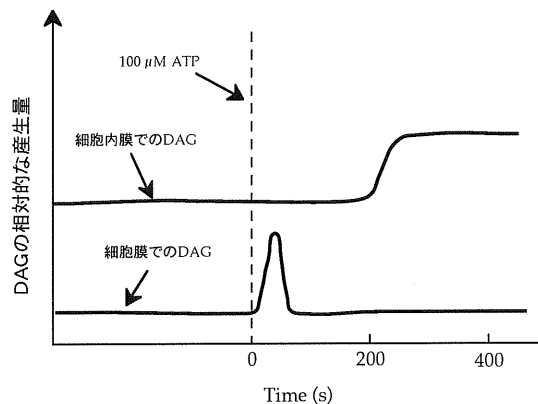


図4. 細胞膜及び細胞内膜におけるDAG濃度の比較

どのように活性化されているかは不明であった。本研究で、細胞内膜において、ATP 刺激存在下では、G 蛋白質結合型受容体のエンドサイトーシスを介して、また、ATP 非存在化では PAP を介して DAG が産生していることを示した。これら 2 つの機構で細胞内膜に産生される DAG の生理的意味は以下のように考えられる。細胞外 ATP 刺激を受けていない時に存在する DAG はプロテインキナーゼ D などの、膜輸送に関わる蛋白質を常に膜に呼び寄せておくことで、日常的におこなわれている膜輸送を制御していると考えられる。一方、ATP 刺激によって産生される DAG は、ラス蛋白質リン酸化酵素などの細胞質に存在する蛋白質を刺激依存的に細胞内膜に呼び寄せ、活性化し、細胞の分化などの細胞応答を制御すると考えられる。

まとめ 本研究で、脂質セカンドメッセンジャー、 PIP_3 及び DAG の蛍光可視化プローブ分子を開発した。プローブ分子内の膜局在ドメインを選択することで、プローブ分子を細胞膜及び細胞内膜に局在させ、そこでの PIP_3 及び DAG の動態分析を行った。その結果、 PIP_3 及び DAG が細胞膜のみならず、細胞内膜においても産生していることを明らかにした。細胞内膜でのこれらの産生は、細胞膜からのエンドサイトーシスを介して起きることがわかった。さらに、DAG では、細胞外刺激のない状態においても、細胞内膜に DAG が存在していることを示した。近年、 PIP_3 及び DAG によって、活性化される蛋白質が細胞内膜で各々に特有な細胞応答を制御することが知られている。しかし、これらの蛋白質がどのように活性化されるかは不明であった。今回の研究より、細胞内膜で産生した PIP_3 及び DAG がその場でこれらの蛋白質を制御していると考えられる。