

論文題目 **A Fluorescent Indicator for Monitoring Src Activation in Cell Membranes and a Spatially Limited Knockdown of Src Kinase Activity**

(細胞膜上での Src の活性化を可視化する蛍光プローブ分子と  
場所特異的な Src の活性化阻害プローブ分子)

氏名 一杉 太郎

[研究内容 1, 細胞膜上での Src の活性化を可視化する蛍光プローブ分子]

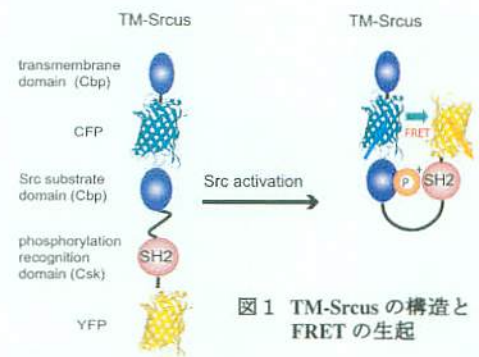
(背景と目的)

細胞内で起きる情報伝達を細胞が生きたまま非破壊で検出することは、細胞のメカニズムを知る上で非常に重要である。細胞内情報伝達において非常に重要な蛋白質リン酸化酵素の一つである Src は細胞内において細胞膜、細胞内の各小器官の表面にある細胞内膜等の細胞の膜全般に広く分布していることが知られている。

この Src は女性ホルモンであるエストロジェン (以下 E2) あるいは男性ホルモンであるアンドロジェン (以下 DHT) 等の性ホルモンによって活性化状態となり他の蛋白質をリン酸化する。修士課程において私は、Src の活性化を可視化する蛍光プローブ分子 a transmembrane fluorescent indicator for detecting the Src activation in cell membranes (TM-Srcus)を開発することに成功した。博士課程ではこの開発した TM-Srcus を用いて、ヒト乳癌細胞由来の細胞である MCF-7 細胞内における、Src の活性化の時空間分析を行うことを目的とした。

(原理)

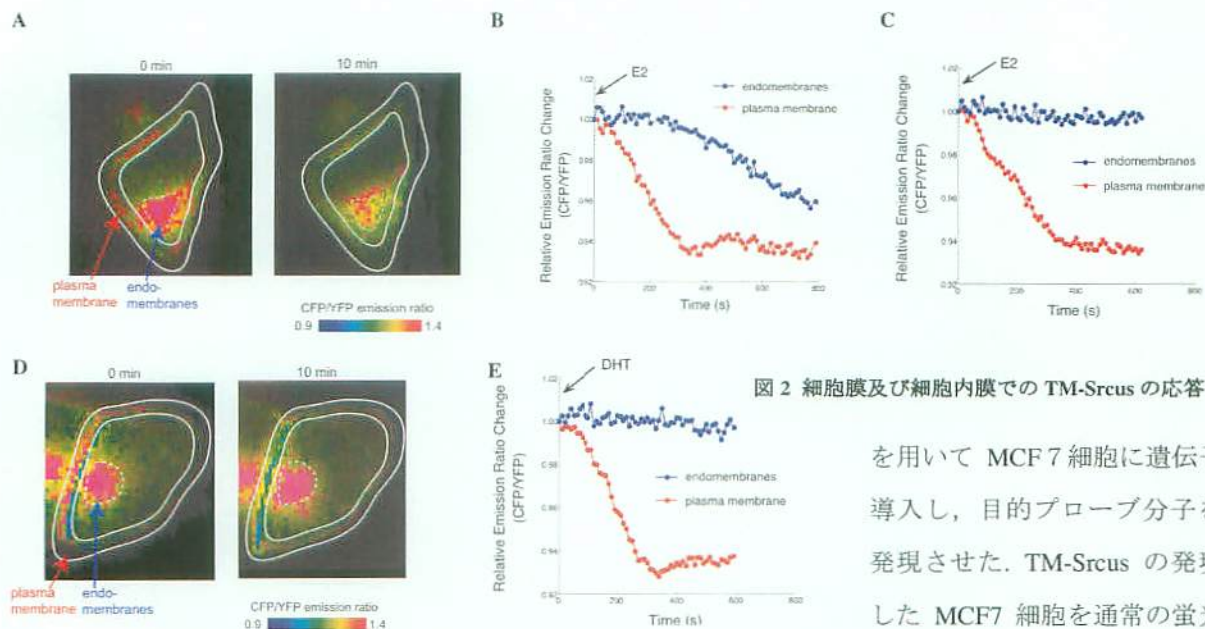
TM-Srcus はキメラ蛋白質であり、その基本骨格は膜局在ドメイン、基質ドメイン、リン酸化チロシン認識ドメイン、そして蛍光団の四つの部分からなっている。膜局在ドメインにはプローブ分子を膜へと局在しやすくするため Src によりリン酸化される膜貫通蛋白質 Cbp の膜貫通ドメインを使用した。Src が活性化すると、Src の基質ドメインである Cbp のリン酸化部位内にあるチロシンが特異的にリン酸化され、そこにリン酸化チロシン認識ドメインである



る Csk のリン酸化認識部位が結合する。すると、図 1 に示すような構造変化が起きて二つの蛍光団 CFP と YFP の相対的な距離が近づき FRET が生起され、440nm で CFP を励起した際の CFP の蛍光(480nm)が減少し、YFP の蛍光(535nm)が増加する。その結果、CFP と YFP の蛍光強度比(CFP/YFP)が下がり、Src の活性化の指標となる (図 1)。

(実験と考察)

図 1 のようなプローブ蛋白質 TM-Srcus をコードする cDNA を遺伝子工学的手法用いて作成し、Lipofection 法



顕微鏡で観察し、図 2 A のように細胞膜と細胞内膜それぞれの領域内での蛍光強度比の変化を測定した。その結果、細胞膜では E2 添加直後から蛍光強度比が急激に減少し始めるが、細胞内膜では多少遅れて、徐々に減少した (図 2 A,B)。つまり、Src の活性化が細胞膜上から始まり、徐々に細胞内膜に伝播されていく様子が観察された。この活性化の伝播のメカニズムを解明するため申請者は細胞をエンドサイトーシスの阻害剤 Dyn により前処理した。すると、細胞内膜での蛍光強度比の減少が見られなくなった (図 2 C)。一方、同じステロイドホルモンである男性ホルモン DHT 刺激ではこのような現象は見られず、細胞膜だけで蛍光強度比が変化した (図 2 D,E)。また、western blotting 法による実験から E2 刺激の場合、Src はエストロゲン受容体(ER)及び皮成長因子受容体 (EGFR) と結合し活性化されるのに対して、DHT 刺激の場合にはアンドロゲン受容体(AR)は EGFR と結合せずに Src を直接活性化することが分かった (図 3 A,B)。EGFR はエンドサイトーシスにより細胞内膜へと運搬されることが知られており、以上のことから E2 により活性化した Src は EGFR とともにエンドサイトーシスにより細胞膜から細胞内膜へと運搬されていると考えられる。一方、アンドロゲン刺激による Src の活性化の場合は EGFR と関係しないため活性化された Src がそのまま細胞膜にとどまっているのだと考えられる。

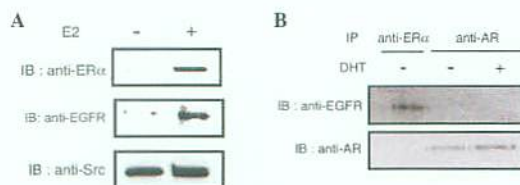


図 3 A, anti-Src 抗体による免疫沈降物を western blotting した結果、E2 刺激依存的に ER, EGFR, Src が複合体を形成することが分かった。B, anti-ER, anti-AR 抗体による免疫沈降物を western blotting した結果、AR は EGFR とは結合しないことが示された。

[研究内容 2, 場所特異的な Src の活性化阻害プローブ分子]

(背景と目的)

研究内容 1 において Src は MCF-7 細胞の細胞膜で活性化することが明らかになった (図 2)。そこで、全反射型蛍光顕微鏡を細胞の観察に用いることで、MCF-7 細胞の細胞膜上でおきる Src の活性化のさらに詳細な



分析を試みた。全反射型蛍光顕微鏡は、カバーガラスと観察試料の界面において入射光が全反射する際に生じるエバネッセント

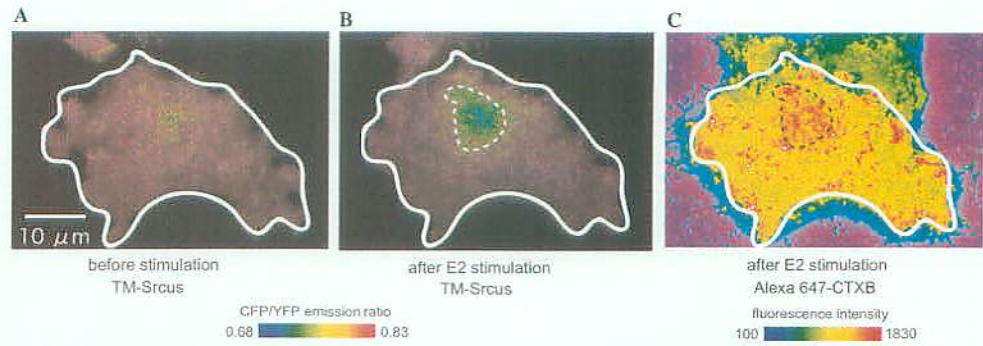


図4 E2刺激による細胞膜でのTM-Srcusの応答の様子とCTXBの染色図(白実線内:単一細胞膜、白点線内:FRET応答のよく起きている領域、黒点線内:CTXBの集積している領域)

波と呼ばれる特殊な電磁波を使い、細胞膜上のTM-Srcusのみを励起する。そのため、細胞膜上におけるSrcの活性化の様子が観察可能となる。TM-Srcusの発現したMCF7細胞をE2で刺激し、その細胞膜上の様子を全反射型蛍光顕微鏡により観察した。その結果、細胞膜上において蛍光強度比が局所的に変化することが観察された(図4A,B)。近年の研究から、細胞膜上にはラフトと呼ばれるナノドメインが存在することが分かっている。そこで、TM-Srcusの発現しているMCF-7細胞をラフトのマーカー蛋白質であるコレラ毒素サブユニットB(以下CTXB)により染色し、全反射型蛍光顕微鏡により観察した(図4C)。その結果、TM-Srcusがよく応答している領域(blue shifted region: 図4B中の白点線内)とCTXBの集積している領域(図4C中の黒点線内)は良く一致した。以上からE2存在下においてSrcはラフト内で活性化状態になっていることが示された。

前述までの実験からE2刺激に伴いMCF-7細胞内のSrcは生体膜上に浮かぶラフトと呼ばれるナノドメイン内で起きることを発見した。しかしながら、このラフトでのSrcの活性化が細胞の機能にとってどれくらい重要なのかまだ分かっていない。そこで、Srcの活性化をラフトでのみ阻害するプローブ分

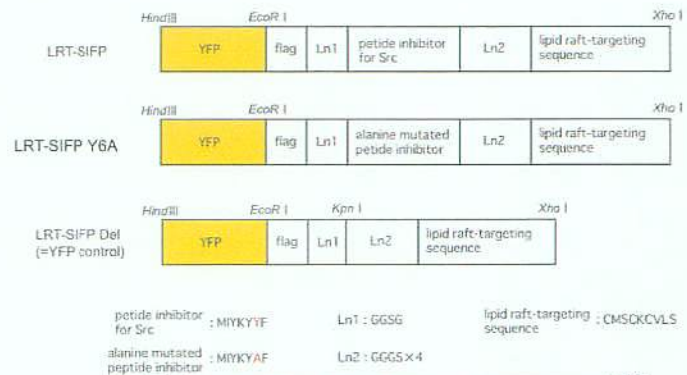


図5 LRT-SIFP, LRT-SIFP Y6A, LRT-SIFP Delの構造

子lipid raft-targeted Src inhibitory fusion protein(以下LRT-SIFP)を開発し、それを発現させたMCF-7細胞の機能解析を行った。LRT-SIFPの基本骨格は、YFP, flag tag, Srcの活性を特異的に阻害するSrc阻害ペプチド、そしてプローブ分子をラフトに局在化させるtargeting sequenceからなっている(図5)。

(実験と考察)

まず、LRT-SIFPを発現しているMCF-7細胞の細胞接着について調べた。その結果、LRT-SIFPは細胞接着を顕著に減少させることが分かった(図6)。対照的に、阻害ペプチドを持たないLRT-SIFP Del(図5下段)は細胞接着を損なわなかった(図6)。LRT-SIFPに比べその阻害効果が1/60に低減されているLRT-SIFP Y6A(図5中段)もMCF-7細胞の細胞接着を抑制しなかった(図6)。さらに、

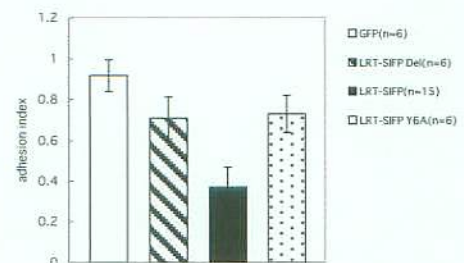


図6 LRT-SIFPによる細胞接着の阻害

LRT-SIFP が MCF-7 細胞の細胞周期に影響を与えるかどうか検討した。LRT-SIFP をトランスフェクトした MCF-7 細胞の DNA をヨウ化プロピジウム(PI)で染色し、フローサイトメトリーにより測定した。LRT-SIFP を発現している YFP 陽性細胞の細胞周期プロファイルをこのアッセイを用いて取得した(図7)。LRT-SIFP Del に比べ LRT-SIFP は、G<sub>1</sub> 期にある細胞に対する G<sub>2</sub>/M 期にある細胞の割合を減少させたが(図7 A,B)、LRT-SIFP Y6A はこの割合を減少

させなかった(図7A,C)。この結果から、MCF-7 細胞の細胞周期がラフト内における Src 活性の阻害により停止することが分かった。

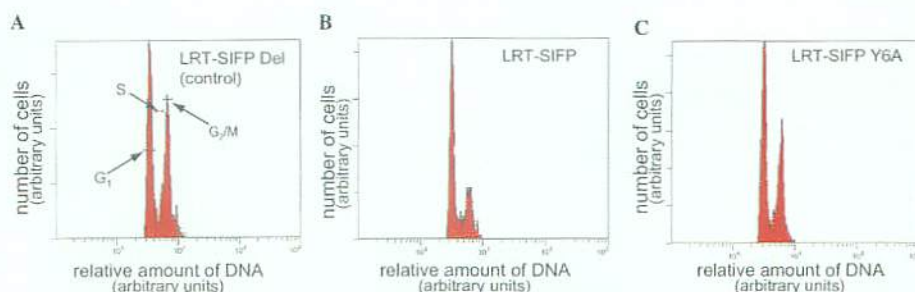


図7 LRT-SIFP による細胞周期の停止

#### [まとめ]

(研究内容1) 以前の研究から性ホルモンであるエストロゲンとアンドロゲンはどちらも Src を活性化するのにも関わらず、全く異なった細胞応答を引き起こすことが知られていた。蛍光プローブ分子 TM-Srcus を用いることにより、Src の活性化の場所が男女性ホルモン刺激によって異なることが初めて明らかになった。さらに、この Src の活性化の場所の違いは、Src がそれぞれの性ホルモンにより活性化する際 EGFR と複合体を形成するかしらないかに起因することを明らかにした。

(研究内容2) E2 刺激により Src の活性化が生体膜上に浮かぶラフトで起きることを初めて見出した。この発見をもとに、新たに開発したラフト特異的な Src の活性化阻害プローブ分子 LRT-SIFP により、このラフト内における Src の活性化は MCF-7 細胞の細胞接着及び細胞周期にとって非常に重要であることが明らかになった。これらの細胞機能は癌の転移や増殖にとって重要なプロセスであることから、本研究によりラフト内における Src の活性化が癌の転移や増殖に深く関わっていることが強く示唆された。