

# 研究報告書

## 「細胞走化性の再構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 井上 尊生

### 1. 研究のねらい

細胞走化性は、細胞外の化学物質の濃度勾配を検知して、細胞が濃度の高い、もしくは低い方へ遊走する性質である。血管新生、胚発生、創傷治癒、免疫防御と神経回路形成を含む様々な生理現象を担う。その障害は、上記の生理現象に異常をきたすだけでなく、癌や関節炎などの進行も促す。近年の確立された遺伝学的手法により、走化性に関わる分子はほぼ全て同定されたと考えられている。また蛍光イメージングの発展に伴い、それらの分子が非常にダイナミックな挙動を細胞内で示すことが明らかとなった。しかしながら、好中球などは非常に小さな濃度勾配（細胞の大きさで1%の勾配）も検知できることが知られており、その分子機構の解明は、細胞遊走の研究分野で最難関かつ最後の課題の一つと認識されている。この濃度勾配検出の分子機構に関しては、数理モデルから、活性化・不活性化による単純な一次線形シグナル様式だけではなく、フィードバック、クロストーク、時空間制御といった、速く複雑な高次/非線形様式を含む事が示唆されている。しかしながら、従来の遺伝学的手法（遺伝子ノックアウト、RNAi、タンパク過剰発現など）は、時間解像度が細胞内シグナル伝達の速度と比べ遅いため、与えられた摂動に対して細胞が2次的、3次的な反応を引き起こした後の状態を観察をすることが多々ある。そのため、途中の時間的な情報が失われ、非線形過程を実験的に検証することが難しい。

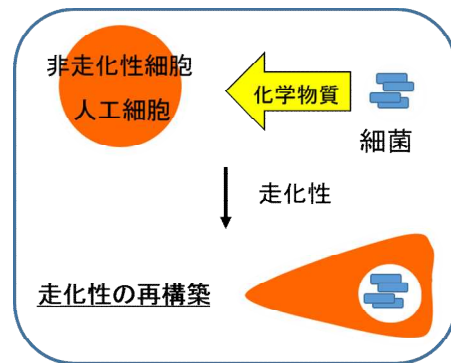
私達は近年、こうした速く複雑なシグナル伝達系をリアルタイムに制御できる摂動ツールの開発を行ってきた。本手法は生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる新規かつ独創的な摂動ツール（CRISP）である。本研究においては、CRISP を用いて好中球の濃度勾配検出機構を分子レベルで解明する。その際の主要仮説は「フィードバックの原動力は、細胞膜構造の微細変化が局所の生化学反応を活性化すること」である。CRISP を用いて実験的に仮説を検証した後に、常微分・偏微分方程式を用いて、直感的に理解が難しい非線形過程を数理モデル化し、*in silico* で細胞走化性の再構築を行う。これらの知見を総合し、最終的には人工巨大小胞膜を用いて、*in vitro* で細胞遊走・走化性を再構築することを目指す。その際に、人工膜の局所構造を時空間特異的に自在に操作する技術の開発も行う。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

「フィードバックの原動力は、細胞膜構造の微細変化が局所の生化学反応を活性化すること」という仮説を検証するために以下の3つの課題を設定した。好中球の濃度勾

配検出機構の分子レベルでの解明（研究テーマ A）、走化性の in silico および in vitro 再構築（研究テーマ B）、およびそれぞれのテーマを加速させる基礎技術の最適化（研究テーマ C）である。具体的には、速く複雑な情報伝達系をリアルタイムに制御できる**摂動ツールの開発**を行い、生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる一連の技術開発に成功した。続いてこれらの摂動ツールを用いて、走化性細胞による濃度勾配検出の**分子機構解明**を目指し、その原動力が細胞膜構造の微細変化により局所の生化学反応を活性化することを示した。最後にこれらの研究から得られた技術および知見を総合し、非走化性細胞や人工細胞を用いて、**試験管内での走化性の再構築**（右図参照）を目指した。



## (2) 詳細

- 研究テーマ A 好中球の濃度勾配検出機構の分子レベルでの解明

走化性において、細胞内の分子極性が仮足形成を促すように、細胞の形態変化は常に細胞内の生化学的反応の産物として起こると考えられている。しかしこの逆の関係に関してはあまり研究がされていない。すなわち細胞膜の構造変化が、生化学反応の効率に影響を与えるだろうか。私はこの機構こそが、濃度勾配の検出に不可欠な正のフィードバックの根源なのではないかと考えた。この仮説を検証するためには、分子活性を変えことなく細胞の膜構造変化を引き起こす必要がある。従来は細胞外から増殖因子などの生理作用リガンドを加えて、情報伝達系を介して細胞膜の構造を変化させてきたが、これでは細胞内の生化学的反応がすでに影響を受けているため、それに引き続くフィードバックによる変化の定量的評価が難しい。物理的な作用をもって細胞膜の構造変化を促す方法として、ガラスピペットを用いて吸ったり、押ししたりする方法があるが、これは侵襲性が高く、また細胞遊走の際に見られる膜構造変化を模倣しているとは考えにくい。そこで私は、非侵襲的で、より生理的に近い方法で、かつ分子活性によらず膜構造を変化させる方法を探索した。

BAR ドメインは約 250 アミノ酸で構成され、酵素活性がなく、細胞膜と相互作用し、膜を裏打ちしたり、楔モチーフを膜に挿入したりすることで膜を曲げるドメインで、小胞輸送、細胞骨格の再編成に寄与している。そこで、私は BAR ドメインを CRISP プローブ（詳細は下記参照）として使い、BAR ドメインを細胞膜に移行させることで、膜構造変化を瞬時に誘発させることができるのではないかと考えた（図 1 A）。FKBP と BAR ドメインのひとつ、NBAR の融合タンパク質（FKBP-NBAR）を膜局在の FRB と共に発現し、ラパローグを加えると細胞膜の構造が変化し、仮足のような突起を形成することを確認した（図 1 B、C）。さらに FKBP-NBAR に対する免疫電顕像を取得し、ラパローグ添加後に FKBP-NBAR が確かに細胞膜にあること（図 1 D）、そしてその部位の膜が肥厚している様子が観察された（赤矢頭）。FKBP-NBAR がいないところでは膜の肥厚はみられない（黒矢頭）。続いてこの膜構造プローブを用いて、生化学反応の活性に影響があるかを調べた。PIP<sub>3</sub> は細胞走

化性において、細胞前部で多く見られる膜脂質である。以前に私達と他のグループにより、正のフィードバックに重要な役割をしていることが示されている。そこで PIP<sub>3</sub> に特異的に結合する蛍光バイオセンサーを用いて、PIP<sub>3</sub> の生成を全反射顕微鏡下で観察した。すると、ラパローグ添加後 1 分以内に PIP<sub>3</sub> の量は膜で増加し始め、5 分後にはピークに達することが観察された (図 1 E)。ラパローグの代わりに DMSO を加えた場合、また楔モチーフ (N 末の 25 アミノ酸) を除いた CRISP プローブを用いた場合には PIP<sub>3</sub> の増加は見られなかった。この結果は膜構造の微小変化が細胞内の生化学反応に影響を与える直接的な証拠として、非常に価値がある。

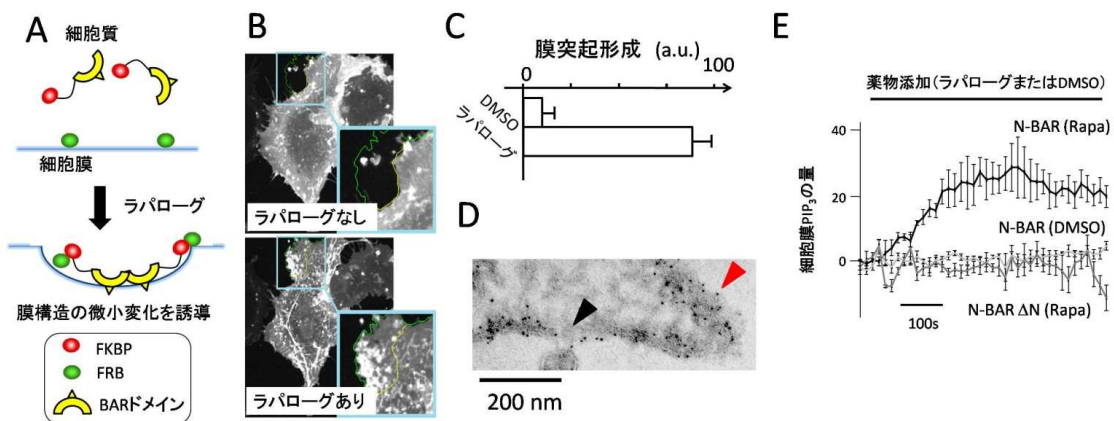


図 1 BAR ドメインの強制膜移行は膜構造の変化とその後の PIP<sub>3</sub> 生成を促す。

● 研究テーマ B 走化性の *in silico* および *in vitro* 再構築

上記の実験による定性・定量的な解析に基づいて、ヘルフリッヒ自由エネルギーと微分方程式を用い、細胞膜の曲率、BAR タンパク質と PI3 キナーゼのフィードバックをもとにすることで、PIP<sub>3</sub> の極性化を達成できることを示した。また *in vitro* での走化性再構築に関しては、膜工学で多用されている人工巨大小胞膜 (GUV と呼ばれる) を用いた。人工巨大小胞膜は、人工的に作製された脂質二重膜で、タンパク質や脂質が膜構造に与える影響を精査する上で非常に有用なモデルシステムである。人工膜の脂質組成は自在に変えることができ、またタンパク質の導入も膜タンパク質を含めて確立された技術である。特に BAR ドメインによる膜の構造変化に関する研究で多用されている。そこでまず第一段階として、FRB を人工膜へ局在させるために脂質修飾の最適化を行い、人工膜上で CRISP プローブが適切に機能するか確認した。人工膜の大きさは好中球と同程度の 20 ミクロメートル前後とした。本研究において、細胞の極性化とは初期の膜構造の微小変化とそれに伴う協同的な膜構造の大きな変化 (仮足形成) と定義される。この現象に必要な最小限の分子群 (Rac、PIP<sub>3</sub>、アクチンとその結合タンパク質群など) は先の実験結果とシミュレーションモデルおよびアクチン重合の *in vitro* 再構築の前例などをもとに選択した。これらの分子群を個々に精製されたものを購入した。今後、これらを人工膜内に導入することを計画している。そしてこのような人工細胞を用いて、CRISP による膜構造変化が膜の極性化及び遊走を誘発するかを確認する。最終的にはできる限りシグナル分子を導入せずに細胞遊走を再構築する。そのためには PIP<sub>3</sub> などのシグナル分子によって担

われている協同性を、他の同等のシグナルで達成しなくてはならないかもしれない。BAR ドメインは多量体を形成することが知られているため、この多量体形成を協同的になるよう操作できれば、CRISP プローブにより膜移行した FKBP-NBAR が、更なる BAR ドメインを協同的に膜にリクルートし、大きな膜構造変化を引き起こすと予測される。そこで BAR ドメインの構造解析などをもとに、アミノ酸側鎖に変異を加え、BAR ドメインの相互作用・結合様式を解析する。最終的にはラパログへの走化性を達成するため、人工巨大小胞膜をマイクロ流路系に導入し、ラパログを勾配状に加え、人工膜の運動を経時的に蛍光観察する予定である。

- 研究テーマ C それぞれのテーマを加速させる基礎技術の最適化

CRISP (Chemically-triggered, Rapidly-Inducible, and compartment-Specific Perturbation)の原理は、二種類のタンパク質 (FKBP と FRB) の会合を一つの小分子 (ラパマイシン) により誘導するものである (図 2A)。私はこの原理に基づき、多面的に改良を加えることで、生きた細胞内で、任意のタンパク質の活性を秒のオーダーで、任意の細胞内局所で制御できる手法 CRISP を構築した。改良点は

1. 新規ラパマイシン誘導体 (以下ラパログ) の有機合成
2. 遺伝子工学を利用したタンパク質相互作用及び局在の最適化
3. 光応答性ラパログの有機合成
4. 顕微鏡、光路系、マイクロ流路系のカスタマイズである。図 2B に示すように、CRISP においては細胞内に FKBP (濃青色) と任意のタンパク (灰色) との融合タンパク、そして細胞膜に局在する FRB (赤色) を使用する。ラパログ添加により FKBP と FRB との会合を誘導すると、結果として CRISP プローブが細胞膜へと移行する。多くの細胞内シグナル分子は、細胞膜の受容体刺激に伴い細胞内シグナル分子が細胞膜に

移行することで、情報伝達系を開始させるが、ラパログによる強制的な CRISP プローブの膜移行は、受容体を介さずに任意の細胞内情報伝達系を活性化することができる。また FRB の局在を変えることで、ミトコンドリア、ゴルジなど様々な細胞内小器官に標的タンパク質を高速移動させることができる。CRISP の最大の特徴は、速い摂動 (<10 秒) を生きた細胞内で達成できる、そして一般性が高い、すなわち様々なタンパク質への応用が可能なことである。例えば、Rac などの小分子 G タンパク質活性を素早く制御することにより、細胞骨格が直接影響を受け、迅速に細胞の形が変化することを示した (図 2C)。私は近年さらに CRISP を改良し、新規に合成した光応答性のラパログを用いて、任意の細胞局所で分子活性を制御したり、さらにはラパログの系とは完全に独立した、新しい CRISP の系を植物ホルモンであるジベラリンの新規誘導体とその結合タンパク質

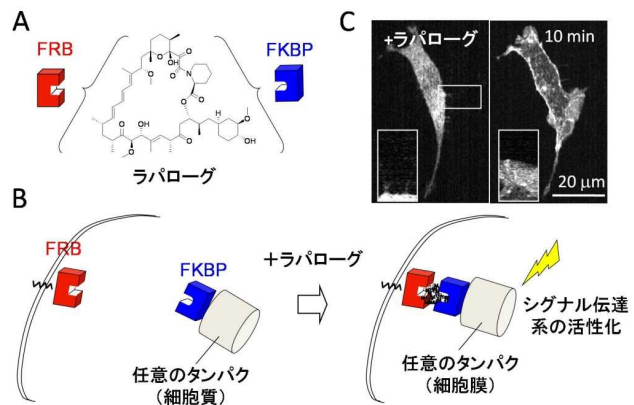


図 2 生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる CRISP の原理

移行すること、情報伝達系を開始させるが、ラパログによる強制的な CRISP プローブの膜移行は、受容体を介さずに任意の細胞内情報伝達系を活性化することができる。また FRB の局在を変えることで、ミトコンドリア、ゴルジなど様々な細胞内小器官に標的タンパク質を高速移動させることができる。CRISP の最大の特徴は、速い摂動 (<10 秒) を生きた細胞内で達成できる、そして一般性が高い、すなわち様々なタンパク質への応用が可能なことである。例えば、Rac などの小分子 G タンパク質活性を素早く制御することにより、細胞骨格が直接影響を受け、迅速に細胞の形が変化することを示した (図 2C)。私は近年さらに CRISP を改良し、新規に合成した光応答性のラパログを用いて、任意の細胞局所で分子活性を制御したり、さらにはラパログの系とは完全に独立した、新しい CRISP の系を植物ホルモンであるジベラリンの新規誘導体とその結合タンパク質

を用いて開発した。これにより、2種類の分子活性を同時、または異なるタイミングで、そして2つの場所特異的に制御できるようになった。さらにマイクロ流路系をデザイン、工作し、流路内においてラパローグの任意の濃度勾配を形成することに成功している。細胞を流路内に閉じ込め、仮足形成に重要な Rac タンパクを細胞内で勾配を形成するように活性化することで、細胞がラパローグの濃い方へ遊走することを示した。これはラパローグという非生理的化学物质に対する走化性を再構築した極めて珍しい例である。

### 3. 今後の展開

細胞膜構造の微細変化を引き起こす分子の同定、そして人工細胞を用いた走化性の再構築の完了を目指す。こうした時空間的に複雑なシグナル伝達は、細胞走化性だけでなく、細胞分裂、小胞輸送、神経可塑性などの細胞機能においても重要な働きをしていると考えられている。すなわち本研究によりもたらされる知見や技術は、様々な生理現象の理解を深め、またその病態モデルとなる癌や免疫疾患の治療戦略にも貢献することが期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

現時点で、目標の9割を達成したと理解している。また目標外の成果もあった。当初は、膜の曲率はBARたんぱく質のみが認識できると仮定していたが、その後のPI3キナーゼ専門の構造生物学者との議論から、PI3キナーゼそのものが膜の曲率を認識できる可能性が生じたため、現在生化学的、細胞生物学的手法を駆使して検討中。もしこれが事実であれば、フィードバックの分子機構は非常に単純に記述できることになる。また好中球や細胞性粘菌などの速い遊走細胞で同様の原理が成り立つか確認するために、細胞性粘菌に関しては、同さきがけ領域の澤井研究者と共同研究を開始した。

#### (2) 研究総括評価

生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる摂動ツールを開発し、そのツールを用いて、走化性細胞による濃度勾配検出の分子機構解明を図り、その原動力が細胞膜構造の微細変化により局所の生化学反応を活性化することを明らかにしたことを評価します。

膜曲率がPIP3量という研究を進める一方で、その産生酵素であるPI3キナーゼが膜の曲率を認識する結果を得たのは、酵素の活性化から膜の変形が起こるのではなく、その逆が成り立ち得るのではないかという点が、予想外で大変興味深いと思います。細胞性粘菌では、同じ領域の澤井 哲研究者と共同研究を進めている点も楽しみです。

2013 年度若手奨励賞(日本薬学会) 、 2014 年度若手科学者賞(文部科学省)、R.R. Bensley Award in Cell Biology, American Association of Anatomists(2014)他国内外で多くの賞を受賞しており、国内外での学会発表の多さも抜き出ており、グローバルに活躍している。H27 年度 国際強化支援シンポジウム(米国 9/19-26)などのさきがけ研究者の国際活動を積極的にリードした点も評価致します。

### 5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Lin B., Wang J., Ueno T., Harwell A., Inoue T.\* and Levchenko A.\* “Synthetic spatially graded Rac activation drives directed cell polarization and locomotion” *PNAS* (2012) 109, E3668-E3677
2. Thevathasan, J.V., Tan E., Hui Z., Lin Y.C., Li Y., Inoue T.\* and Fivaz M.\* “The small GTPase HRas shapes local PI3K signals through positive feedback and regulates persistent membrane extension in migrating fibroblasts” *Molecular Biology of the Cell* (2013)24, 2228-2237
3. Lin YC, Nihongaki Y, Liu T-Y, Razavi S., Sato M., and Inoue T.\* “Rapidly Reversible Manipulation of Molecular Activities Using Dual Chemical Dimerizers” *Angewandte Chemie* (2013) 52, 6450-6454
4. Suarez A., Ueno T., Huebner R., McCaffery J.M., and Inoue T.\* “Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) family members bend membranes in cells” *Scientific Reports* (2014) 4 ,1-6
5. Lin B., Yin T., Wu Y.I., Inoue T.\* and Levchenko A.\* “Interplay between chemotaxis and contact inhibition of locomotion determines exploratory cell migration” *Nature Communications* (2015) 6, 6619

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

2013年

- 4/3/13 7<sup>th</sup> INBT Nanobiotechnology Symposium, Baltimore, MD
- 4/29/13 Department of Physiology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX
- 5/4/13 ACS Regional Meeting, “Frontiers in Chemical Biology”, University of Maryland College Park, MD
- 8/2/13 NIH Seminar Series in Japanese, NIH, Bethesda, MD
- 9/8/13 246<sup>th</sup> ACS National Meeting, “Breakthrough” session, Indianapolis, IN
- 9/9/13 UC-Tomorrow Seminar Series in Japanese, University of Cincinnati, Cincinnati, IN
- 11/2/13 Department of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan
- 11/22/13 Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Osaka, Japan
- 12/9/13 Integrated Imaging Center Symposium, Johns Hopkins University, Baltimore, MD
- 12/14/13 2013 ASCB Annual Meeting, Subgroup “Molecular Sensors and Actuators”, New Orleans, LA

2014年

- 2/17/14 58<sup>th</sup> Annual Meeting, Plat Form Session, Biophysical Society, Philadelphia, PA
- 3/12/14 Cell, Developmental and Integrative Biology, Hepato/Renal Fibrocystic Disease

- Center Seminar Series, University of Alabama, Birmingham, AL
- 4/16/14 3<sup>rd</sup> Japanese Life Science Seminar Series at University of Pennsylvania, Philadelphia, PA
- 4/29/14 Award Lecture, Experimental Biology, San Diego, CA
- 9/4/14 Department of Pharmacology, University of Colorado, Denver, CO
- 9/6/14 JSPS Annual Meeting for US Fellowship Recipients, Washington DC
- 9/20/14 Department of Pharmacology, Retreat, Mt. Washington, MD
- 10/14 In-vivo Cellular and Molecular Imaging Center (ICMIC) Seminar Series, Baltimore, MD
- 11/6/14 Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Department of Cell Biology, NY
- 12/7/14 2014 ASCB Annual Meeting, Subgroup Session, Philadelphia, PA

## 2015 年

- 1/15/15 Department of Chemistry and Chemical Biology, University of New Mexico, NM
- 1/30/15 Gordon Conference, Directed Cell Migration, Galveston, TX
- 2/24/15 National Institute of Health, National Cancer Institute, Cellular and Molecular Biology Seminar Series, Bethesda, MD
- 3/2/15 Keynote Lecture, 15<sup>th</sup> International Membrane Dynamics Forum, Kyoto University, Japan
- 4/29/15 EB2015 ASBMB Annual Meeting, "Lipid Partners: Unusual Suspects", Boston, MA
- 4/6/15 Department of Chemical and Biomolecular Engineering, North Carolina State University, Raleigh, NC
- 4/28/15 New Jersey Institute of Technology, Department of Mathematical Sciences, Newark, NJ
- 5/27/15 Ulsan National Institute of Science and Technology, Department of Chemistry, Ulsan, Korea
- 5/28/15 Korea Advanced Institute of Science & Technology, Daejeon, Korea
- 5/29/15 Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB), Plenary Speaker, Seoul, Korea
- 6/9/15 University of Tokyo, Department of Chemistry, Tokyo, Japan
- 6/11/15 Kyushu University, Department of Biology, Hakata, Japan
- 6/16/15 Osaka University, Department of Engineering, Suita, Japan
- 6/10/15 Okayama University, Department of Engineering, Okayama, Japan
- 6/23/15 National Institute of Genetics, Mishima, Japan
- 6/24/15 University of Tokyo, Department of Pharmaceutical Science, Tokyo, Japan
- 6/25/15 National Tsing Hua University, Department of Medical Science, Hsinchu, Taiwan
- 6/29/15 BPS Thematic meeting, National University of Taiwan, Taipei City, Taiwan
- 7/2/15 East China University of Science and Technology, College of Bioengineering, Shanghai, China
- 7/3/15 Shanghai Jiao Tong University, Department of Biomedical Engineering, Shanghai,

- China
- 7/6/15 Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Tokyo, Japan
- 7/7/15 Kobe University, Bio-Signal Research Center, Kobe, Japan
- 7/10/15 Institute of Transformative bio-Molecules, Nagoya University, Nagoya, Japan
- 9/21/15 JST-HMS Symposium on Systems and Synthetic Biology 2015, Boston, MA
- 9/23/15 JST-JHU Symposium on Systems and Synthetic Biology 2015, Baltimore, MD
- 9/28/15 Dutch Biophysics 2015, Plenary Speaker, Veldhoven, Netherland
- 9/30/15 Eindhoven University of Technology, Biomedical Engineering, Eindhoven, Netherland
- 10/1/15 Delft University of Technology, Bionanoscience, Delft, Netherland
- 10/13/15 Mayo Clinic Cancer Center, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Rochester, MN
- 11/4/15 In-vivo Cellular and Molecular Imaging Center (ICMIC) Seminar Series, Baltimore, MD
- 11/10/15 Chemical Biophysics Mini-Symposia Series, selected by students of the Chemistry, Biochemistry and Biophysics Departments, University of Pennsylvania, PA
- 12/7/15 Department of Neurobiology, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel
- 12/9/15 1<sup>st</sup> Pearl Seiden International Meeting in Life Sciences: From synthetic biology to discovery and applications, Haifa, Israel

## 受賞

- 2013 日本薬学会 若手奨励賞
- 2014 R.R. Bensley Award in Cell Biology, American Association of Anatomists
- 2014 文部科学省 若手科学者賞
- 2015 Catalyst Award, Johns Hopkins University, Office of the Provost
- 2015 Discovery Award, Johns Hopkins University, Office of the Provost
- 2016 SPIE's Systems Biology Pioneer Award, International Society for Optics and Photonics