

セミインタクト細胞を駆使した細胞ストレス応答ネットワークの定量的可視化解析

●村田 昌之 ◆加納 ふみ
 東京大学 大学院総合文化研究科

<研究の目的と進め方>

細胞はストレス環境下ではほとんどのタンパク質合成が停止されるにも関わらず、シャペロンやある種の転写因子群の翻訳が活性化される。本研究では、細胞膜を透過性にした「セミインタクト細胞」に、ストレスにさらされた細胞から調製した細胞質を導入し、ストレス負荷時に翻訳が活性化される転写因子 ATF4 の発現の可視化・再構成を行う。さらに、ストレス依存的翻訳活性化に関わる転写開始因子 eIF2 のリン酸化/脱リン酸化キネティクス（時間情報）と ATF4 発現量の相関解析、および ATF4-mRNA の細胞内局在変動（空間情報）と ATF4 発現の相関の定量的解析から、各種ストレスにおける固有のパラメーター値を決定する。最終的には、病態細胞質を先に構築した系でアッセイし、パラメーターを指標に病態時に細胞に負荷されるストレスの種類を同定する。本研究の基盤技術であるセミインタクト細胞系は、定量的に蛋白質を細胞内に導入することが可能であり、導入したタンパク質量とセミインタクト細胞内で生じる生命現象との定量的相関解析に使用できるほとんど唯一の実験系である。本申請研究を通し、世界初の翻訳制御に関わるタンパク質ネットワークの定量的可視化解析システムを構築し、ゲノム情報を利用した翻訳制御因子の網羅的解析のプロトタイプとする。

<研究開始時の研究計画>

1) セミインタクト細胞を用いたストレス応答の翻訳制御の可視化・再構成アッセイ系の構築 (図1 参照) : 細胞に付加されたストレス依存的に翻訳が開始される遺伝子産物として、転写因子 ATF4 を標的とする。ATF4 タンパク質の翻訳を可視化するために、ATF4 mRNA の 5'UTR 領域 (ストレス時には翻訳されるが通常時には翻訳されないために必要な配列) + ATF4 タンパク質コーディング領域 + 短寿命 GFP タンパク質 (半減期約 1 時間) コーディング領域を融合させたコンストラクトを作成する。この遺伝子を安定に発現する細胞株 CHO-ATF4 を得る。CHO-ATF4 では、常に ATF4-mRNA が転写されているが、タンパク質としての ATF4 を翻訳発現できない状態にある。しかし小胞体ストレスを誘発するタプシガルジン (Tg) 等で処理すると、ATF4-GFP が翻訳され、ATF4 の核内移行シグナルに従って核内に集積するはずである。次に、セミインタクト細胞系を駆使して、ストレス応答の翻訳制御の可視化・再構成アッセイ系を構築する。具体的には、CHO-ATF4 をセミインタクト細胞処理し細胞質を洗い流した後、新たに様々な種類のストレスを負荷された細胞から調製した細胞質を添加する。その結果、各ストレスに反応して ATF4-GFP が翻訳発現され核に移行し、核内の GFP 蛍光強度が上昇する。蓄積した核内の ATF4-GFP の定量は、共焦点レーザー顕微鏡 (既に所有している) を用いて定量化する。レーザー顕微鏡とカップルさせることにより、細胞核を 3 次元的に高速スキャンした画像を基に、核内の ATF4-GFP 量の迅速で定量的な計測とそのキネティクス解析が可能となる。ストレス負荷された細胞質は、「小胞体ストレス」「酸化ストレス」「飢餓ストレス」「ウ

イルス感染ストレス (double strand RNA stress) 」状態にある L5178Y 細胞から調製する予定である。

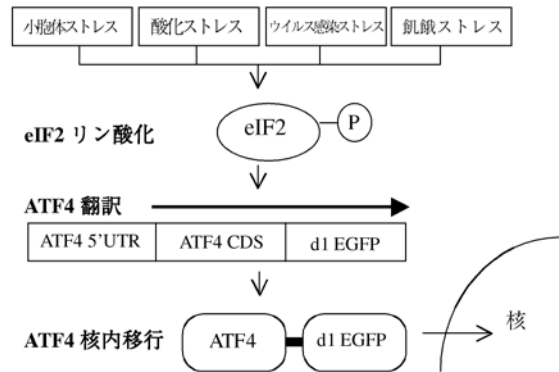


図1：細胞ストレスによる転写因子 ATF4 の翻訳制御可視化アッセイの原理図

2) ストレス応答性翻訳制御の各種パラメーターの決定法の構築 : 最近われわれは、ストレス負荷に応じて mRNA の細胞内局在が変動する事実を in situ ハイブリダイゼーションによって発見している (論文作成中)。よって ATF4-mRNA の細胞内局在を定量化し、別のパラメーターとして設定する。ATF4-mRNA の細胞内局在は、外部より ATF4-mRNA の特異的に結合する Cy5 (蛍光色素、>630nm) 標識タンパク質 (MS2 等) や ATF4 特異的配列に hybrid する Cy5 標識オリゴヌクレオチド等を利用する。これらプローブの細胞内局在を温度制御機能を持った顕微鏡ステージ上で共焦点レーザー顕微鏡によりタイムラプス観察する。各ストレス負荷細胞質存在下での ATF4-mRNA の局在場所を、「核内」「細胞質全般」「細胞質のストレス顆粒 (ストレス時に出現する mRNA の凝集体)」「フィロポーデア」の 4 つの場所にグループ分けし、それぞれの場所の ATF4-mRNA の定量を行う。さらに (1) の結果を加えて、ストレス負荷細胞質それぞれに対して、「eIF2 のリン酸化の程度」「ATF4-mRNA の局在場所 (空間情報) と各場所での量」「ATF4 の発現量 + キネティクス」の 3 種のパラメーター値を得る。

(3) ストレス応答性翻訳制御の各種パラメーターの決定 : ストレス依存的な ATF4 の翻訳量は、ストレス負荷細胞質中のキナーゼによる転写開始因子 eIF2 のリン酸化/脱リン酸化のキネティクス (時間情報) と細胞内の ATF4-mRNA の局在場所 (空間情報) をパラメーターに変化する。各種ストレスにおけるこれらパラメーターを求め、グループ分けする。(4) 病態細胞質のパラメーター値測定によるクラスタリング : 病態モデルマウスの組織より細胞質を調製して、(1) のストレス応答性翻訳制御の再構成を行い (3) で述べたパラメーター値を求める。既に決定された各種ストレス負荷細胞質のパラメーター値と比較してクラスタリングし、病態細胞質のストレスの種類を同定する。また生体シミュレーション (専門家との共同研究) により各種ストレスの割合を求めることも検討する。

<研究期間の成果>

1) ATF4mRNA を恒常的に発現する細胞株の樹立：ストレス依存的翻訳制御を受ける転写因子 ATF4 の 5' UTR 配列 +ATF4 コード領域 + 短寿命 GFP 遺伝子のコンストラクトを作成し、この遺伝子 mRNA を恒常的に発現する細胞株 CHO-ATF4 クローンを樹立した。2) 生細胞における ATF4-GFP のストレス応答反応の可視化：CHO-ATF4 細胞に小胞体ストレス（タブシガルジン、DTT 処理など）や酸化ストレスを負荷することにより、ATF4-GFP がストレス依存的に翻訳され、核内に移行することを確認した。この細胞株の ATF4mRNA 量はストレス負荷時、ストレスのない場合においても殆ど変化していないことを RT-PCR やノーザンブロットにより確認した。3) セミインタクト細胞を用いたストレス依存的 ATF4-GFP の翻訳制御の可視化・再構成系の構築：CHO-ATF4 細胞をセミインタクト細胞処理し、小胞体ストレス（タブシガルジンや DTT 等）を負荷した CHO 細胞 (WT) より調製した細胞質を添加し、ATF4-GFP の翻訳制御の再構成を試みた。その結果、ストレス負荷細胞質依存的に ATF4-GFP が翻訳され、かつそれが核内に効率よく輸送されることを確認できた。ATF4-GFP は分子量約 70kDa での転写因子であり、例え発現したとしてもセミインタクト細胞の穴より細胞外へ拡散してゆくことが危惧されていたが、非常に効率よく核に移行することにより、本再構成アッセイ系が翻訳制御の可視化再構成系として十分使用できること、また、セミインタクト細胞内では転写因子のような核移行する分子は何らかの方法で（恐らく微小管依存的に）核にターゲットできることが明らかとなった。4) ATF4mRNA の生細胞内動態の可視化：小胞体ストレスにตอบสนองして翻訳が開始する ATF4-GFP の細胞内の場所を可視化する目的で、既に細胞内局在が知られているアクチン mRNA と GAPGHmRNA の細胞内局在を MS2-tag 法を用いることにより可視化し検証できた。現在、小胞体ストレス依存的な ATF4mRNA の単一細胞内局在や動態を可視化することを試みている。今後、1)～4) のアッセイ系を駆使し、セミインタクト細胞内の小胞体ストレス、酸化ストレス、ウイルス感染ストレス、飢餓ストレスなどにおける ATF4-GFP の発現のキネティクス、eIF2 のリン酸化キネティクス（時間情報）、ATF4mRNA の細胞内局在（空間情報）をパラメーターとして各種ストレス依存的な翻訳制御ネットワークの可視化解析を行って行く予定である。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究では、セミインタクト細胞系と可視化技術をカップリングさせることにより上述した計画に従いストレス応答の翻訳制御機構解明を目指した。セミインタクト細胞アッセイ系は、申請者が独自に開発してきた細胞内タンパク質機能検定システムであり、世界の追随を許さない解析系である。本研究成果によって構築した細胞ストレスによる翻訳制御解析系は、今まで、DNA チップ解析のような網羅的な解析系が皆無であった翻訳制御研究に最適な解析系を供することができたと考える。また、成果 4) に述べたセミインタクト細胞系を利用した簡便な MS2-tag 付き mRNA の細胞内動態可視化検出系は、細胞外から蛍光標識したタンパク質を定量的に細胞内に導入できるというセミインタクト細胞の利点を活かした新規の mRNA 検出法になりうる。何故なら、従来のマイクロインジェクション法や蛍光タンパク質の発現法では、細胞に導入した MS2-tag を認識する蛍光タンパク質が高バックグラウンドの原因となり高感度の mRNA の検出が不可能であったからである。今回の成果は、免疫系や神経系などの翻訳制御が細胞の分化・活性化に深く関与している翻訳制御システム研究に

広く応用できる可能性がある。また、現在、セミインタクト細胞自動作成装置の開発を行っており、翻訳制御の再構成や mRNA の局在変化を利用した創薬ターゲットのハイスループット解析も視野に入れて研究を進めている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

研究計画 (3) ストレス応答性翻訳制御の各種パラメーター決定計画の内、ストレス負荷細胞質中のキナーゼによる転写開始因子 eIF2 のリン酸化/脱リン酸化のキネティクス（時間情報）をパラメーターとするシステムを構築予定であったが、セミインタクト細胞に導入するための eIF2 タンパク質が大腸菌のリコンビナントタンパク質として発現せず使用できなかった。原因は不明であるが、結果的には大腸菌による調製は止め他、最近、漸く無細胞翻訳系による *in vitro* タンパク質調製系を利用することで濃度的には十分な eIF2 リコンビナントタンパク質が調製できたので、それを利用しこの実験を進める予定である。に変化する。研究計画 (4) 病態細胞質のパラメーター値測定によるクラスとリングは、研究計画 (1)-(3) 研究の進展が予定通りに行かなかったため 2005 年内の研究実施機関内には時間的余裕が無く到達できなかった。また生体シミュレーション（専門家との共同研究を開始したかったが達成できなかった。これは、われわれのウエット系の具体的な研究結果が出ていないことに起因すると思われるので、今後実験が進み具体的なデータが蓄積すれば具体的な共同研究の実施に向かうつもりである。

<今後の課題、展望>

・本研究計画のベースとなるのは、ATF4 の翻訳制御可視化再構成系（ウエット実験系）である。この解析系に関しては、そのプロトタイプを 2005 年度中に完成させることができたため、今後はそれを利用して当初研究計画の項目のうち未達成のものを中に研究を進める予定である。

・現在所有している「セミインタクト細胞アッセイ自動化システム」を利用すれば、生細胞チップを作成でき、一日約 1000 個のペースで生細胞の共焦点観察像を殆ど自動で取得することが可能である。これを利用し、生細胞 CHO-ATF4 のストレス応答に対する各種試薬・siRNA の効果を可視化スクリーニングすることができるとされる。そこで、現有しているキナーゼ約 700 種類の siRNA プローブや各種キナーゼ阻害剤をライブラリーとして使い、ATF4 の翻訳制御に関わるキナーゼの網羅的解析を行い、その結果をセミインタクト細胞アッセイ系を利用して検定し、ATF4 の翻訳制御のキナーゼネットワークを生体シミュレーションの専門家と共同で解析したい。

<研究期間の全成果公表リスト>

- (1)論文/プロシーディングなど：特になし
- (2)データベース/ソフトウェア：特になし
- (3)特許など：特になし
- (4)その他顕著なもの：

（本研究の基盤技術であるセミインタクト細胞アッセイの一般戦略をまとめ、アッセイの汎用性を紹介したもの）

1) Kano, F., Takenaka, K., Murata, M. (2006) Reconstitution of Golgi disassembly by mitotic *Xenopus* egg extracts in semi-intact MDCK cells. in *Methods in Molecular Biology* (X. John Liu ed.) 357-365

（登録番号：601231920）

2) 加納ふみ、村田昌之 (2005) セミインタクト細胞アッセイ系の構築 実験医学, vol. 22(No.16) pp2307-2311