

- 6) Ito, Y. (2008) *Adv. Cancer Res.*, 99, 33–76.
 7) Ito, Y. (2004) *Oncogene*, 23, 4198–4208.
 8) Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H. M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, M., Yano, T., Ikeda, T., Ito, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S.C., & Ito, Y. (2002) *Cell*, 109, 113–124.
 9) Ito, K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yano, T., Tada, K., Ida, H., Huang, C., Shah, N., Inoue, M., Rajnakova, A., Hiong, K.C., Peh, B.K., Han, H.C., Ito, T., Teh, M., Yeoh, K.G., & Ito, Y. (2005) *Cancer Res.*, 65, 7743–7750.
 10) Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Lees-Miller, S.P., & Lavin, M.F. (1998) *Nat. Genet.*, 20, 398–400.
 11) Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., & Lane, D.P. (1992) *Cell*, 71, 875–886.
 12) Friend, S. (1994) *Science*, 265, 334–335.
 13) Yano, T., Ito, K., Fukamachi, H., Chi, X.Z., Wee, H.J., Inoue, K., Ida, H., Bouillet, P., Strasser, A., Bae, S.C., & Ito, Y. (2006) *Mol. Cell Biol.*, 26, 4474–4488.

尾崎 俊文, 山田 千寿, 中川原 章
 (千葉県がんセンター研究所)

A novel role of RUNX3 in the regulation of p53-mediated apoptosis in response to DNA damage
 Toshinori Ozaki, Chizu Yamada and Akira Nakagawara
 (Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuoh-ku, Chiba 260-8717, Japan)
 投稿受付：平成 23 年 2 月 9 日

新規ラジカル反応を用いた細胞膜上分子間相互作用の解析

1. はじめに

細胞は生体を構成する最も基本的な単位である。例えば、ヒトの体は約 60 兆個の細胞の集合体であるといわれており、個々が整然と協調し機能を果たすことにより正常な生体機能が維持される。近年では、京都大学の山中伸弥教授らによって作製された人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell ; iPS 細胞) など、細胞生物学の目覚ましい発展により、様々な細胞を実験的に作り出すことが可能となり、多様な視点から個々の細胞機能について研究することが可能となっている。

一方、細胞下のレベルに視点を移すと、細胞は様々な細胞小器官、さらにはタンパク質・脂質・糖質などの様々な

生体分子から構成されている。興味深いことに、生体と細胞の関係と同じく個々の生体分子は相互作用し協調的に働くことで細胞機能に影響を与えている。従って、現在では生体分子個々の研究に加え、異なる生体分子同士の相互作用研究 (interactome) が注目されている。

このような背景の下、筆者らは細胞膜上に存在する生体分子の相互作用 (細胞膜上分子間相互作用) に焦点を当て、これらの解析法の開発および相互作用によって細胞機能がどのような影響を受けているかに注目し研究を進めてきた。本稿では、筆者らの研究の背景および新規に開発した「細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法」を中心に解説し、細胞膜上分子間相互作用が今後の生物学の発展にどのように寄与できるかについての展望を述べる。

2. 細胞膜上分子間相互作用

細胞の構造物を包んでいる細胞膜は外界との区切りとしての役割に留まることなく、外界からの物質輸送やシグナル伝達に関与している。細胞膜には細胞機能にとって重要な役割を果たしている多数の“細胞膜上分子”が埋没した状態で存在する。Singer と Nicolson の流動モザイクモデル¹⁾によると、これら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイナミックに自由運動している。これらの運動により、特定の生体分子同士が非常に短い一定時間内に膜上において会合、拡散を繰り返し相互作用している事象が観察されている (図 1)。

これらの「細胞膜上分子間相互作用」およびその結果形成される生体分子の集合体 (一般的には脂質ラフトや膜マイクロドメインと呼称される) は細胞内シグナル伝達機構に寄与していることや、細胞増殖やウイルス感染、免疫機構などの細胞機能ひいては生体機能にとっても重要な役割を果たしていることが示唆されている²⁾ (図 1)。従って、細胞膜上分子間相互作用の意義について研究するためには、第一にどのようなタイミングで、どのような細胞膜上分子が相互作用しているかを知る必要がある。

3. 細胞膜上分子間相互作用の解析

実際の細胞膜上分子間相互作用の解析法は、1) 主に生化学的な実験手法により相互作用分子を解析・同定する方法、2) 研究対象の任意分子を様々な方法で標識することにより形態学的に相互作用を観察する方法、の二つに大別される。1) では、免疫沈降法および detergent-insoluble membrane (DIM) 法³⁾がよく用いられる。前者は任意の細胞膜上分子について、抗体を用いて免疫沈降し、同時に沈

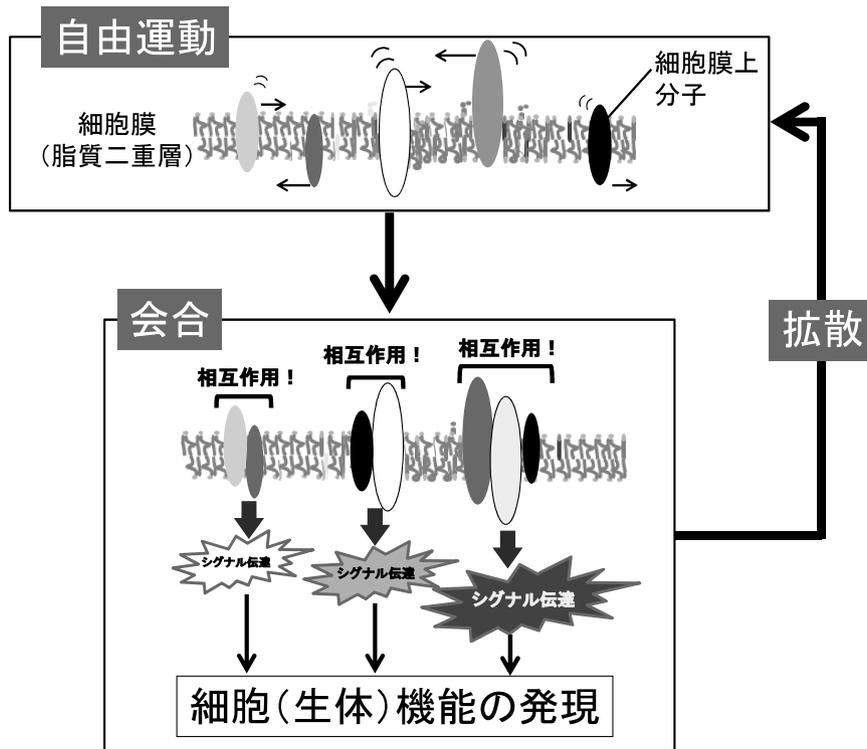


図1 細胞膜上分子の運動と分子間相互作用の模式図

脂質二重層（細胞膜）上に存在する分子は自由運動をしているが（図上部），一部の分子は特異的に会合することで相互作用し（図下部），マイクロドメインの形成および細胞内へのシグナル伝達を行う．その後，また拡散し自由運動に戻る．

降してくる分子を相互作用分子として同定する簡便な方法である．後者は前述の脂質ラフトが界面活性剤に難溶であるという性質を利用して分離・精製する手法である．細胞を低温で界面活性剤（TritonX-100 など）を含んだ緩衝液を加えてホモジナイズする．この条件で溶け残ってきたものがDIMであり，脂質ラフトを含んでいる．これをさらにシヨ糖密度勾配遠心法で分画する．2）は，現在注目されている蛍光共鳴エネルギー転移法（FRET）^{4）}や一分子イメージ法^{5）}を用いた解析である．Sheetsらは，一分子イメージ法を駆使してThy-1やガングリオシドG_{M1}といった細胞膜上分子の運動を生細胞において解析した結果を報告している^{6）}．この結果によると，これらの分子は細胞膜上で自由運動しているが，数秒間だけ直径約200-300 nmの領域に留まってその範囲内で小刻みに運動することが示された．この約200-300 nmの領域に留まっている状況こそが脂質ラフトを反映しているのではないかと考えられている．

4. 細胞膜上分子間相互作用の生化学的可視化法

このように細胞膜上分子間相互作用の解析手法はある程

度充実しているが，いくつかの問題点も生じている．例えば，生化学的な解析法は簡便である反面，相互作用のタイミングなどを考慮することが難しく，生理的な相互作用の結果に反映しているのか問題視する意見もある．また，FRETや一分子イメージは生理的な結果を反映していると考えてよいが，決められた分子間の相互作用を形態学的に観察する方法であり相互作用分子の同定などはできない．

このような背景の中，筆者らはこれらの問題点の解決につながる新規細胞膜上分子間相互作用解析法の開発に着手し，その過程で偶然にも大変興味深いラジカル生成反応を見いだした．その反応は，研究室で頻繁に使用される酵素，西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）がアリルアジド化合物をラジカル化するというものである．アリルアジド化合物はUVや強い光を照射することでナイトレンラジカル化され，タンパク質や核酸などのアミノ基やC-H結合と反応し共有結合を作ることが知られている．しかし，筆者らが見いだした反応ではこのようなUVや強い光，過酸化物の添加は必要なく，生理条件下でHRPが特異的にアリルアジド化合物をナイトレンラジカル化する．筆者らは

この反応を enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) と名付けた⁷⁾ (図 2a).

さらに、この EMARS 反応を用いて、i) 生細胞において、研究対象である任意の細胞膜上分子に HRP を結合させる (抗体や特異的認識分子を利用する)、ii) アリルアジドを反応させる、iii) 細胞上で EMARS 反応が起こる、iv) HRP の近傍に存在、つまり相互作用している分子のみがラジカルと反応することで相互作用分子が特異的に標識される (ラジカルは一般則として発生源から極近傍 (ナノ

メートル単位) の領域内では存在できない)、v) 標識された分子をウエスタンブロットや抗体アレイ、質量分析装置を用いたプロテオーム解析などの方法で同定する、という五つの段階を経ることにより、生理的な相互作用を解析する方法を着想した (図 2b). 筆者らは、あたかも分子の相互作用が生化学的手法により“可視化”できるという意味を込めて、この EMARS 反応を用いた新規解析法を細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法 (biochemical visualization) と名付けた⁷⁾.

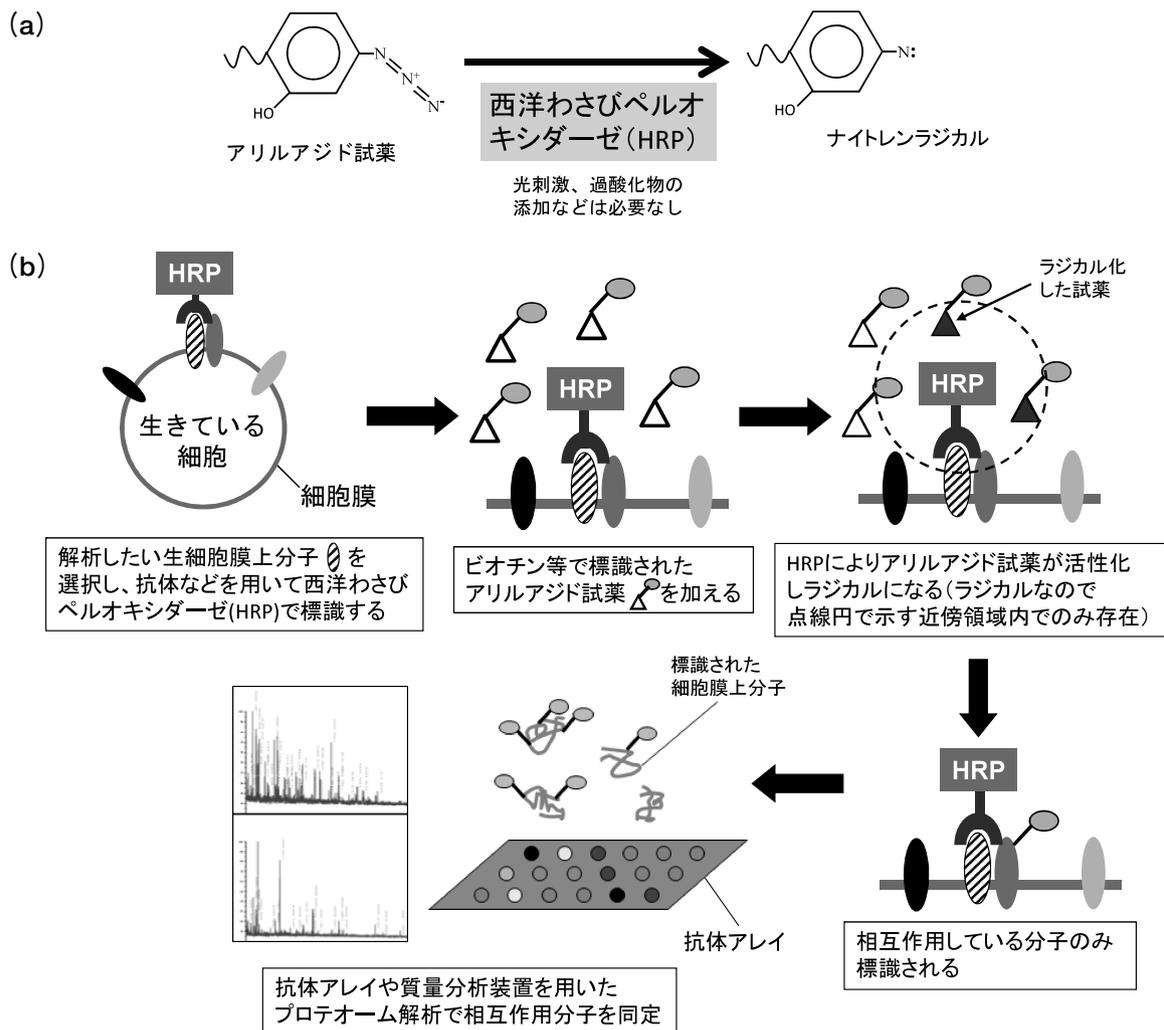


図 2 EMARS 反応と生化学的可視化法

(a) EMARS 反応の反応式。アリルアジド試薬が HRP によりラジカル化される反応であるが、光刺激や過酸化物の添加は必要なく生理的条件下で反応は進行し、発生したナイトレンラジカルはタンパク質の C-H 結合およびアミノ基と反応して共有結合をつくる。(b) 生化学的可視化法の概念図。自分が研究したい細胞膜上分子を HRP 標識抗体等により HRP 標識し、その後ビオチン基やフルオレセイン基が結合したアリルアジド試薬を添加すると、生理条件下で EMARS 反応が進行する。この場合、ラジカルは HRP から極近傍 (半径約 200-300 nm 以内) の領域にのみ存在できるため、相互作用している分子のみが標識される。

5. 生化学的可視化によるインテグリン—受容体型チロシンキナーゼ間の相互作用解析

次に、実際に筆者らが生化学的可視化法を用いて行った実験^{8,9)}について概説する。本稿では、子宮頸がん培養細胞 HeLaS3 細胞における細胞接着分子 β 1

受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の相互作用について解析した例⁹⁾を紹介する。

実験方法は、まず様々な細胞外マトリックス (フィブロネクチン, コラーゲン, ラミニン) を処理した細胞培養ディッシュに HeLaS3 細胞を播種し, 15分, 2時間, 1日それぞれ培養した。次に, HRP 標識した β 1

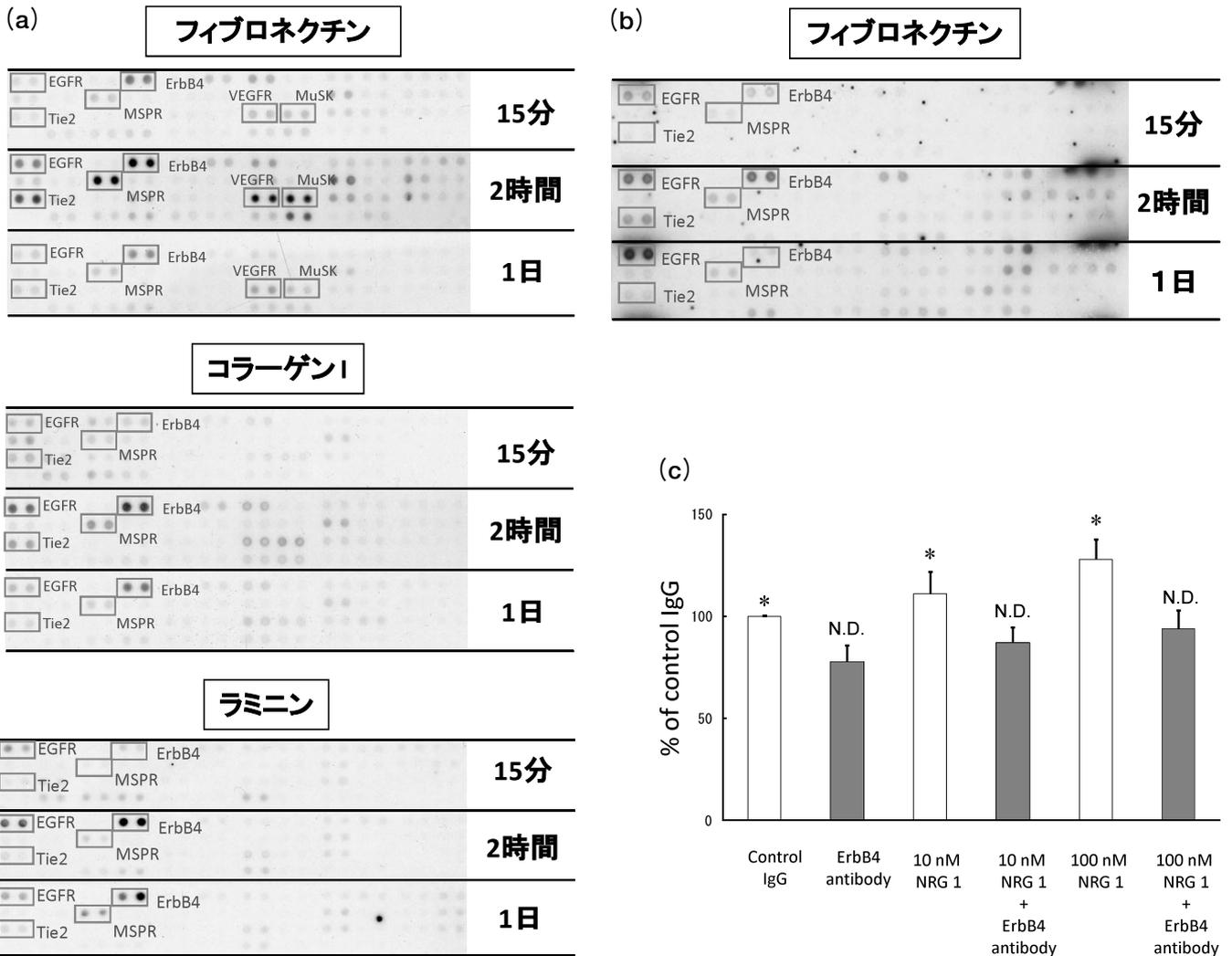


図3 生化学的可視化によるインテグリン—受容体型チロシンキナーゼ間の相互作用解析

(a) 細胞外マトリックス (フィブロネクチン, コラーゲン, ラミニン) を処理した細胞培養ディッシュで 15分, 2時間, 1日培養した HeLaS3 細胞において, β 1

インテグリンの相互作用分子を EMARS 反応で標識した後, RTK 抗体アレイ (R&D 社製) にて分析した。EGFR, Tie2, および ErbB4 などの RTK が β 1

インテグリンの相互作用分子として検出された。(b) (a) においてフィブロネクチンの抗体アレイ解析に用いた試料と同一のものを別の抗体アレイに処理し, 抗チロシンリン酸化抗体にて各 RTK の自己リン酸化を分析した。その結果, ErbB4 は相互作用が最大になる 2時間において自己リン酸化も最大になり相関関係が認められたが, EGFR は相互作用が 2時間で最大になるものの, 自己リン酸化は 1日経過した場合が最大であった。(c) HeLaS3 細胞に ErbB4 のリガンドである Neuregulin 1 (NRG 1) および ErbB4 阻害抗体 (ErbB4 antibody) を処理し, 各処理細胞の細胞走化性をポイデンチャンバーにより測定した。各結果は分散分析 (ANOVA) により有意差検定を行った。* で示した結果群では $p < 0.005$ で有意差が認められたが, N.D. で示した結果群では $p = 0.06628$ で有意差は認められなかった。従って, NRG1 は細胞走化性を促進させること, ErbB4 阻害抗体は逆に細胞走化性を阻害することが分かった。

抗体を処理し、EMARS 反応を誘導した。相互作用した RTK を簡便に同定するために、反応後の試料を 42 種類の RTK が解析できる市販の抗体アレイで分析した。その結果、 $\beta 1$ インテグリンと RTK の相互作用は細胞外マトリックスおよび細胞培養時間依存的に変化することが分かった (図 3a)。また、フィブロネクチンを処理した細胞培養ディッシュで培養した場合、 $\beta 1$ インテグリンと相互作用する RTK の一つである ErbB4 において細胞播種後 2 時間で相互作用と自己リン酸化がともに最高となるという時間的相関関係が認められた (図 3b)。さらに、Neuregulin 1 (NRG 1) および ErbB4 阻害抗体を用いた migration assay により、細胞播種後 2 時間後に $\beta 1$ インテグリンと ErbB4 の相互作用が細胞走化性に関与している可能性が示された (図 3c)。これらの結果は、細胞膜上分子間相互作用が何らかのシグナル伝達機構を介して細胞機能に影響を与えていることを示唆している。

6. 生化学的可視化法の今後

生化学的可視化法は既存法にはない特徴を有する細胞膜上分子間相互作用解析法であり、前述したように分子間相互作用と細胞機能の関係について全く新しい知見を提供するツールになる可能性がある。しかし、本解析法には改良すべき問題が残されており、i) アリルアジド化合物の細胞内への透過に伴って惹起される非特異的の反応の阻止、ii) 相互作用分子の解析・同定法の改良、の 2 点について現在検討を行っている。i) については、細胞内に存在する酵素 (内在性ペルオキシダーゼなどが想定される) によるアリルアジド化合物の非特異的ラジカル化が原因だと推測しており、これを阻止するために細胞内に透過しにくいアリルアジド化合物を開発している。ii) については、生化学的可視化法を行った試料に含まれる標識された相互作用分子を質量分析装置によるショットガンプロテオミクスによって網羅的に分析できる方法を開発しており、前述の抗体アレイによる同定のように特定の分子に限られた同定法に依存せず相互作用分子が解析可能となりつつある。

このような改良に加え、細胞膜上分子の遺伝子発現ベクターを用いて、抗体等を使用しなくても EMARS 反応を起こす方法や細胞内タンパク質の相互作用にも EMARS 反応を適応できる方法などを研究中である。これらを踏まえて、生化学的可視化法を基盤とした相互作用解析「EMARS-based interactome」を展開し、現在未知な点が多く残されている分子間相互作用研究に一石を投じられればと考えている。

7. おわりに

脂質ラフトや細胞膜上分子間相互作用についての研究に挑戦している研究者は他の様々な分野の研究者と比較すると未だ少ない。これには前述の解析法の難しさや実際の細胞機能、ひいては生体機能との関係が未だはっきりしないという点が影響しているものと推察される。前者においては、筆者らが開発した生化学的可視化法のように比較的簡便な解析法を確立し、多くの研究者が相互作用解析を行うことのできる環境が必要であると考えられる。また、後者に関しては最近生理的に分子間相互作用を作り出して細胞機能の変化等を解析する手法が登場している¹⁰⁾。今後これらの課題が解決され、この分野に挑戦する研究者が増加していけば、既存の遺伝子解析等からは解明できなかった新たなシグナル伝達機構や生体メカニズムなどが発見されていく可能性があり、これを標的としたバイオ創薬等への発展なども期待できるのではないかと考えている。

- 1) Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) *Science*, **175**, 720-731.
- 2) Brown, D.A. & London, E. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 111-136.
- 3) Carter, W.G. & Hakomori, S. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 6953-6960.
- 4) Kenworthy, A. & Edidin, M. (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 69-84.
- 5) Sako, Y., Minoguchi, S., & Yanagida, T. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**, 168-172.
- 6) Sheets, E.D., Lee, G.M., Simson, R., & Jacobson, K. (1997) *Biochemistry*, **36**, 12449-12458.
- 7) Kotani, N., Gu, J., Isaji, T., Udaka, K., Taniguchi, N., & Honke, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7405-7409.
- 8) Ishiura, Y., Kotani, N., Yamashita, R., Yamamoto, H., Kozutsumi, Y., & Honke, K. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **396**, 329-334.
- 9) Yamashita, R., Kotani, N., Ishiura, Y., Higashiyama, S., & Honke, K. (2011) *J. Biochem.*, **149**, 347-355.
- 10) Kennedy, M.J., Hughes, R.M., Peteya, L.A., Schwartz, J.W., Ehlers, M.D., & Tucker, C.L. (2010) *Nat. Methods*, **7**, 973-975.

小谷 典弘, 本家 孝一

(高知大学医学部先端医療学推進センター)

A novel approach for the cell surface molecular interactome using enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) reaction

Norihiro Kotani and Koichi Honke (Center for Innovate and Translational Medicine, Kochi University Medical School, Kohasu, Okocho, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan)