

発が有効である可能性を提示している。しかしながら、本稿で紹介した知見から推察すると、HIF発現の時空間的要素と強度を十分に加味することがその治療効果を上げるためには肝要であると言える。今後、酸素環境に基づく肝小葉構築と肝代謝機能発現に関わる分子機構のさらなる解明が進めば、様々な肝疾患の新たな予防や治療のみならず、人工臓器を用いた再生医療への応用へとつながることが期待される。

## 謝辞

本稿で紹介した研究成果の多くは、慶應義塾大学医学部の末松誠教授のご指導のもと、医学部医化学教室に配属された大学院生とともに行われたもので、この場を借りて改めて御礼申し上げたい。

- 1) Semenza, G.L. (2009) *Physiology*, 24, 97–106.
- 2) Jungermann, K. & Kietzmann, T. (1996) *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 179–203.
- 3) Kronen, A., Jungermann, K., & Kietzmann, T. (2001) *Endocrinology*, 142, 2707–2718.
- 4) Tajima, T., Goda, N., Fujiki, N., Hishiki, T., Nishiyama, Y., Senoo-Matsuda, N., Shimazu, M., Soga, T., Yoshimura, Y., Johnson, R.S., & Suematsu, M. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387, 789–794.
- 5) Ochiai, D., Goda, N., Hishiki, T., Kanai, M., Senoo-Matsuda, N., Soga, T., Johnson, R.S., Yoshimura, Y., & Suematsu, M. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415, 445–449.
- 6) Wang, X.L., Suzuki, R., Lee, K., Tran, T., Gunton, J.E., Saha, A.K., Patti, M.E., Goldfine, A., Ruderman, N.B., Gonzalez, F. J., & Kahn, C.R. (2009) *Cell Metab.*, 9, 428–439.
- 7) Rankin, E.B., Higgins, D.F., Walisser, J.A., Johnson, R.S., Bradfield, C.A., & Haase, V.H. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, 29, 4527–4538.
- 8) Minamishima, Y.A., Moslehi, J., Padera, R.F., Bronson, R.T., Liao, R., & Kaelin, W.G. Jr. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, 29, 5729–5741.
- 9) Gimm, T., Wiese, M., Teschemacher, B., Deggerich, A., Schödel, J., Knaup, K.X., Hackenbeck, T., Hellerbrand, C., Amann, K., Wiesener, M.S., Höning, S., Eckardt, K.U., & Warnecke, C. (2010) *FASEB J.*, 24, 4443–4458.
- 10) Krishnan, J., Suter, M., Windak, R., Krebs, T., Felley, A., Montessuit, C., Tokarska-Schlattner, M., Aasum, E., Bogdanova, A., Perriard, E., Perriard, J.C., Larsen, T., Pedrazzini, T., & Krek, W. (2009) *Cell Metab.*, 9, 512–524.
- 11) Nishiyama, Y., Goda, N., Kanai, M., Niwa, D., Osanai, K., Yamamoto, Y., Senoo-Matsuda, N., Johnson, R.S., Miura, S., Kabe, Y., & Suematsu, M. (2012) *J. Hepatol.*, 56, 441–447.

合田 巨人

(早稲田大学理工学術院)

HIF-mediated regulation of carbohydrate and lipid metabolisms in the liver

Nobuhito Goda (Faculty of Science and Engineering, Waseda University, 2-2 Wakamatsu-chou, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan)

## FRET バイオセンサーによって明らかとなった上皮構造維持における低分子量 G タンパク質 Racl の役割

### 1. はじめに

緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) を用いた低分子量 G タンパク質の活性を検出する FRET バイオセンサー Raichu が登場してから約 10 年が経過した。これまで困難であったバイオセンサーの恒常的発現が成功し、数日から数週間かかる極性形成過程の信号伝達を可視化することが可能となった。本稿では試験管内で構築した 3 次元構造における Rho ファミリー G タンパク質群の空間的活性分布、その意義について最近の知見を紹介する。

### 2. FRET バイオセンサー

FRET とは、Förster resonance energy transfer (蛍光共鳴エネルギー移動と意識されている) の略で、励起された蛍光分子 (ドナー) からごく近傍にある蛍光分子 (アクセプター) へエネルギーが共鳴により移動する現象のことである。この原理に基づき、GFP を用いたバイオセンサー (以下、FRET バイオセンサーと略す) は、宮脇敦史博士が Tsien 博士と開発したカメレオンが第一号であり、細胞内カルシウム濃度を測定する。それ以降、様々なバイオセンサーが開発されているが、基本ユニットはほぼ同じで、2 種類の蛍光タンパク質と、タンパク質の全長あるいは一部が 1~2 個、それらをつなぐリンカーから構成される。

低分子量 G タンパク質は典型的な分子スイッチであり、GDP に結合している OFF の状態と GTP に結合している ON の状態とを取る。細胞内にはそれぞれの GTP 型を特異的に認識するタンパク質群 (= 標的タンパク質) が存在し、下流に信号を特異的に伝達する。従って、GTP 結合型の量を計測することが活性を測定することになる。現在

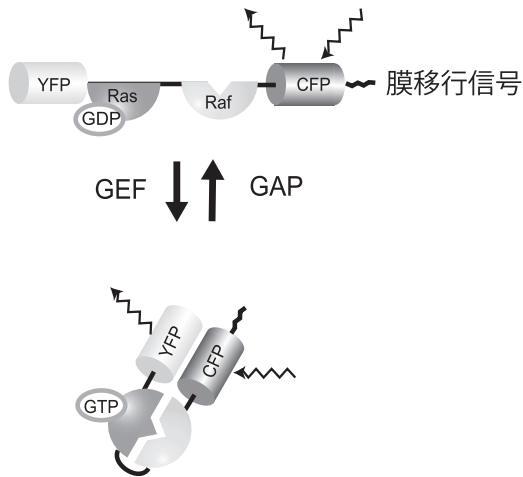


図1 低分子量Gタンパク質Rasの活性を計測するFRETバイオセンサーRaichuの構造と作動原理

RaichuはN末端より、YFP(黄色蛍光タンパク質)、Ras、RafのRas結合領域、CFP(シアン色蛍光タンパク質)、膜移行信号から成る。RasがGDPと会合している型(不活性化型・上段)ではFRETは起こらないが、GTPに会合している場合(活性化型・下段)ではFRETが起こる。活性化因子としてGEF(グアニンヌクレオチド交換因子)、不活性化因子としてGAP(GTP加水分解促進酵素)がある。

最も汎用されているのは、「プルダウン法」と呼ばれる方法である<sup>1)</sup>。GTP型Gタンパク質を認識する標的タンパク質の領域を用いてGTP型Gタンパク質を回収(プルダウン)し、定量する方法であるが、細胞内での空間的活性化パターンが不明であるのが欠点であった。これを克服したのがRaichu(Ras and the interacting protein chimeric unit)であった<sup>2)</sup>(図1)。Raichu-Rasは、RasおよびRasの標的タンパク質RafのRas結合領域を含んでいる。Rasとその下流分子を入れ替えることでRaichu-Ras以降、様々なGタンパク質のバイオセンサーが作製されており、各々のバイオセンサーによってユニットの並び方が最適化されている。各ユニットをつなぐには、数アミノ酸からなるリンカーを用いていたが、最近長鎖リンカーを用いて改良が行われた<sup>3)</sup>。

### 3. FRETバイオセンサーの恒常発現

我々がFRETバイオセンサーを発現する細胞株を樹立しようとしても、二つあるうちの片方の蛍光のみが見られる株しか取れなかったという実験結果から、二つの蛍光タンパク質の核酸配列が類似なため、相同組み換えによってどちらかが染色体から排除されてしまうのではないかと考えた。そこで、シアン色蛍光タンパク質CFPと蛍光特性が

類似であるが、軟体サンゴ *Clavularia coral* 由来で核酸配列の相同性が低い teal fluorescent protein (TFP)<sup>4)</sup>をもつバイオセンサーを作製したところ難なく両方の蛍光を発する細胞株を樹立することができた<sup>5)</sup>。理由はわからないが、ショウジョウバエではYFP-CFPペアのバイオセンサーを発現する個体が取れるようだ<sup>6,7)</sup>。もっと最近になって、piggyBac配列やTol2配列などのトランスポゾンシステムを含むベクターを構築し、転移酵素を含むプラスミドと一緒にトランスフェクションすることで、YFP-CFPペアのバイオセンサーの恒常的発現に成功した<sup>3,8)</sup>。今後はバイオセンサーを長期に発現させる細胞・個体の樹立にはこの方法が主流になっていくと思われる。

### 4. 類器官における低分子量Gタンパク質Rac1活性観察とその意義

甲状腺・乳腺・肺・腎臓などの上皮系の臓器は3次元の立体構造を取っており、周囲環境が培養細胞よりも軟らかい。細胞の硬度が高まるほどに細胞の悪性度が高まることが報告されており<sup>9)</sup>、生体環境下での信号伝達の可視化が望まれていた。上皮細胞を生体内と同等の硬度を持つゲル内で培養すると単層の細胞から成るボールのような嚢胞構造を作り、細胞の一つ一つが極性を持っている(図2A)。この構造は類器官と呼ばれ生体の上皮腺組織のモデルとされている。様々な細胞が類器官を取ることが報告されている(表1)。

Rhoファミリー低分子量Gタンパク質はアクチンの再構成を促すことで細胞骨格を制御しており、2次元で移動する細胞内の前後軸で活性が異なる<sup>10,11)</sup>。そのなかのRac1はタイトジャンクションあるいはアドヘレンスジャンクションの形成に重要であり、カドヘリンの会合によって活性化を受けることが報告されている<sup>12)</sup>。MostovらはMDCK細胞の類器官ではRac1がラミニンの輸送を制御していることを明らかにした<sup>13)</sup>。この系にCdc42の下流分子であるWASpのCdc42との結合領域をGFPとの融合タンパク質として発現させ、それが頂部に集積すること、また、Rac1・Cdc42のGFPとの融合タンパク質が順に側部・頂部に局在することから、類器官では、Cdc42の活性は頂部で高いことも報告している<sup>14)</sup>。しかし、この方法は上述のプルダウン法の変法であり、発現させた下流分子が量によっては優勢劣性型として機能してしまうことは想像にかたくなく、定量性も乏しい。そこで我々は上述のTFPをRhoファミリーのFRETバイオセンサーにも適用し、3次元構造における活性化パターンを観察したところ、各々

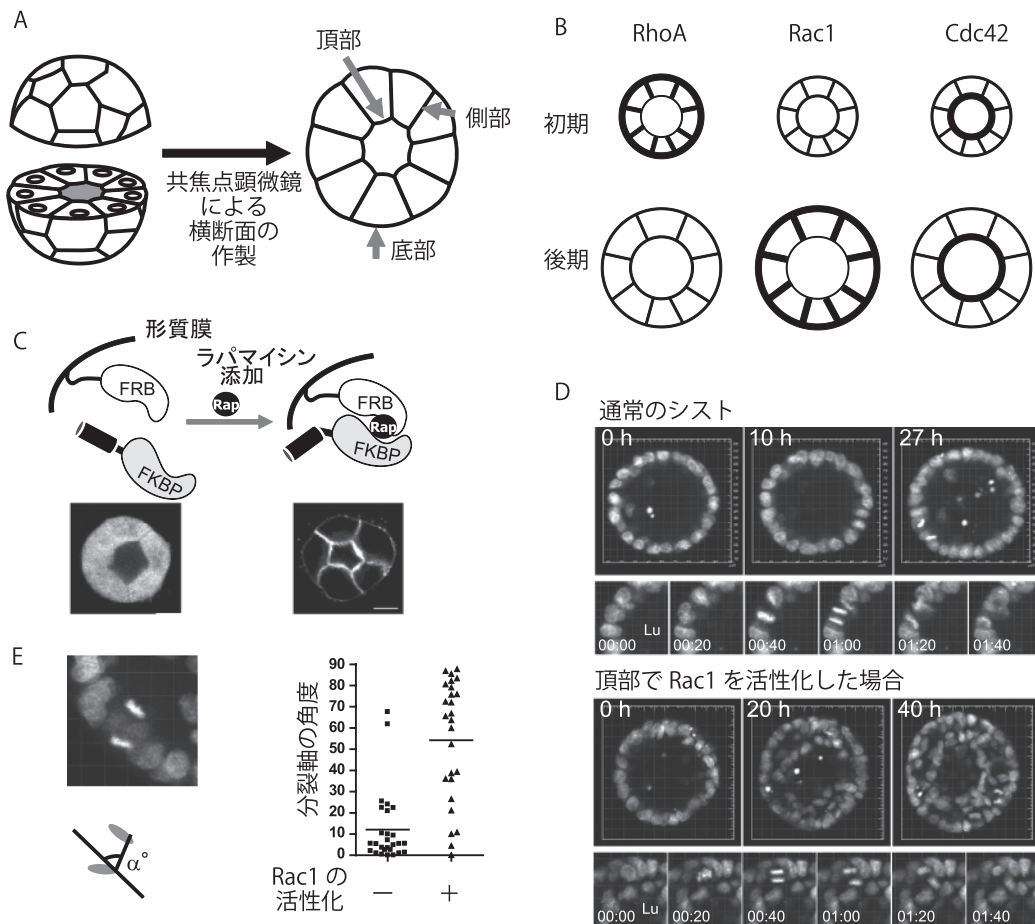


図2 上皮細胞の立体構造における Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性化パターン

(A) イヌ腎尿細管細胞 MDCK をゲル内で培養すると内腔が液体に満ちたボールのような嚢胞構造をとる (左). 共焦点顕微鏡を用いた嚢胞の横断面像では (右), 細胞の一つ一つが極性を持って整列しているのが観察される. 内腔面に面した部分を頂部, 細胞間を側部, 基質との接点を底部と呼ぶ.

(B) 嚢胞における RhoA, Rac1, Cdc42 の活性化パターン. 活性が高い部を太線で記している. 培養日数が浅く, 構成する細胞数が少ない時を初期, 1 週間程度培養を続けた場合を後期として記している.

(C) 任意のポイントで活性を制御する FRB-FKBP システム. Lyn の N 末端の脂質修飾部位を付加した FRB は元々細胞形質膜に局在している. 一方 FKBP は細胞質に局在している (左). ラパマイシン (Rap と記載) を添加することで FRB と FKBP が会合し FKBP が形質膜にリクルートされる. 下のパネルは FKBP に黄色蛍光タンパク質の一種 Venus を付加したものを発現させた細胞から成る類器官の写真で, 細胞質と核に FKBP-Venus が存在しているが (左), ラパマイシンを添加することで (右), 形質膜に移行しているのがわかる.

(D) DNA 結合タンパク質であるヒストン H1 に蛍光タンパク質 Keima を付加したものを発現する細胞株を構築し観察した. この細胞株には Lyn-FRB と, Rac の活性化因子である Tiam1 が FKBP との融合タンパク質として発現している. ラパマイシンを添加しない状態では (上段・通常のシスト), 細胞分裂は嚢胞壁と平行に起こるが, ラパマイシンを添加した状態 (下段) では, 細胞分裂の方向が乱れ, 細胞が内腔に満ちているのがわかる. 数字は時間 (h) と時間:分, Lu は内腔 (lumen) を示す.

(E) (D)での細胞 (左上段) を染色体の中心と, 嚢胞壁の交わる角度  $\alpha$  を計測したところ (左下段模式図), Rac1 の頂部での活性化がない状態では 0 度近い, つまり嚢胞壁と平行に分裂しているが, Rac1 を活性化した場合では角度の偏差が大きくなり, 90 度, つまり嚢胞壁と垂直な分裂軸に近づくことがわかった.

表1 これまで報告のある類器官培養

細胞株	動物種	由来	ルーメン形成・備考	文献
MDCK	イヌ	腎尿細管	hollowing (マトリゲル) cavitation (コラーゲン)	Hall, H.G. (1982) <i>PNAS</i> , 79, 4672-4676.
MCF10A	ヒト	乳腺	cavitation	Debnath, J. (2003) <i>Methods</i> , 30, 256-268.
EPH4	マウス	乳腺	hollowing	Montesano, R. (2002) <i>J. Cell Sci.</i> , 115, 4419-4431.
HMT-3522	ヒト	乳腺	hollowing	Weaver, V.M. (1997) <i>J. Cell Biol.</i> , 137, 231-245.
Caco-2	ヒト	大腸がん	lumen coalescence	Jaffe, A.B. (2008) <i>J. Cell Biol.</i> , 183, 625-633.
II型肺胞上皮	ヒト	肺組織	lumen coalescence	Yu, W. (2007) <i>Mol. Biol. Cell</i> , 18, 1693-1700.
上皮幹細胞	マウス	小腸組織	hollowing?	Sato, T. (2009) <i>Nature</i> , 459, 262-265.
	マウス	乳腺組織	塊で培養. 細胞は重層	Ewald, A.J. (2008) <i>Dev. Cell</i> , 14, 570-581.
	マウス	胎仔唾液腺組織 肺組織	budを培養. 枝分かれ構造を観察	Wei, C. (2007) <i>Tissue Eng.</i> , 13, 721-735. Del Moral, P.M. (2010) <i>Methods Mol. Biol.</i> , 633, 71-79.
	ゼブラフィッシュ	腸組織	lumen coalescence 体内での観察	Bagnat, M. (2007) <i>Nat. Cell Biol.</i> , 9, 954-960.

異なる時空間活性パターンを示した<sup>15)</sup>(図2B). 成熟した類器官では Rac1 は頂部で活性が低く抑えられているのに対し, RhoA の活性は空間的差異はなく, Cdc42 は頂部で高かった.

ではこの Rac1 の空間的活性化パターンの意味するところは何なのだろうか? 散発例のがんは成人のがんの大部分を占め, 一旦組織が構築され形態が維持されているところに, 遺伝子変異などが導入されがん化する. 我々は, 組織が成熟してから細胞内の情報伝達の異常を導入するために, FKBP12-rapamycin-binding domain (FRB)-FK506-binding protein (FKBP) のヘテロオリゴマーの系を用いた(図2C). これはラパマイシンを添加することで二つのタンパク質が会合するという性質を利用したもので, FKBP との融合タンパク質として Rac の GEF あるいは GAP を発現させる. 類器官を形成してからラパマイシンを加えて頂部での Rac1 の活性を上昇させると, 本来単層である細胞が重層化し, 内腔が埋まるという形態変化を示した(図2D). 良性・悪性問わず腫瘍では, 腺腫様の構造を取るなど正常組織から逸脱した構造を取ることによって肉眼的に異常が検出され, 顕微鏡的にも形態が病理診断の指標となる. 実際に腎がん, 乳腺や大腸の前がん病変あるいはがんでは Rac1 活性化が示唆されていることを考え合わせると, Rac1 の異常な活性化による発がんがあり, 我々はその形態を試験管内で再現する系の構築に成功したといえる. またこの結果は, Rac1 の活性が頂部で低いことが組織の

形態を維持するのに必要であることを示しているが, その機序についても観察を続けた. まず, 極性マーカーを蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させると, 二つのタンパク質が, 頂部と側部に分かれずに, 形質膜に均一に広がることを見いだした. そこでフェンス機構が崩壊し, 極性が乱れ, 分裂軸方向が異常になるという作業仮説を立て, タイトジャンクションの構成タンパク質であるオクルジンが正しく局在しないことを観察した. またヒストン H1 を蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させ観察すると, 通常では囊胞壁に対して平行に分裂するのに対し, Rac1 の活性化パターンを乱した細胞では, 分裂軸が乱れ囊胞壁に垂直方向に向かっているものが多く観察された(図2E). Rac1 の頂部での活性化がタイトジャンクションを制御する分子機構や, 分裂軸の変化を司る分子機構に関しては今後の課題である.

## 5. おわりに

タンパク質の活性化が異なるという観察を元に, 細胞が内腔に満ちるといった形態変化がどのように引き起こされるのかを, ライブイメージングで明らかにした. 形態変化の観察が機能の推察に結び付けるのが病理診断であるが, ライブで見ることが形態の仕組みを明らかにするのに重要という一例である. 今後, 疾患に関連する形態変化の機構を知ることで新たな診断基準, 診断薬の開発につながるものと期待している.

## 謝辞

本研究は、京都大学大学院生命科学研究所・生体制御学、および京都大学大学院医学研究科・病態生物医学松田道行研究室において、大学院生の八木俊輔氏と共に行った成果であります。深く御礼申し上げます。

- 1) de Rooij, J. & Bos, J.L. (1997) *Oncogene*, **14**, 623–625.
- 2) Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., & Matsuda, M. (2001) *Nature*, **411**, 1065–1068.
- 3) Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., & Matsuda, M. (2011) *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4647–4656.
- 4) Ai, H.w., Henderson, J.N., Remington, S.J., & Campbell, R.E. (2006) *Biochem. J.*, **400**, 531–540.
- 5) Yoshiki, S., Matsunaga-Udagawa, R., Aoki, K., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., & Matsuda, M. (2010) *Mol. Biol. Cell*, **21**, 1088–1096.
- 6) Koto, A., Kuranaga, E., & Miura, M. (2009) *J. Cell Biol.*, **187**, 219–231.
- 7) Kamiyama, D. & Chiba, A. (2009) *Science*, **324**, 1338–1340.
- 8) Kamioka, Y., Sumiyama, K., Mizuno, R., Sakai, Y., Hirata, E., Kiyokawa, E., & Matsuda, M. (2012) *Cell Struct. Func.*, **37**, 65–73.
- 9) Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D.A., & Weaver, V.M. (2005) *Cancer Cell*, **8**, 241–254.
- 10) Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., & Matsuda, M. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 6582–6591.
- 11) Kurokawa, K. & Matsuda, M. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 4294–4303.
- 12) Ehrlich, J., Hansen, M., & Nelson, W. (2002) *Dev. Cell*, **3**, 259.
- 13) O'Brien, L.E., Jou, T.S., Pollack, A.L., Zhang, Q., Hansen, S. H., Yurchenco, P., & Mostov, K.E. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 831–838.
- 14) Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V., & Mostov, K. (2007) *Cell*, **128**, 383–397.
- 15) Yagi, S., Matsuda, M., & Kiyokawa, E. (2012) *EMBO Reports*, **13**, 237–243.

清川 悦子

(金沢医科大学医学部病理学 I)

Role of Rac1 suppression at the apical membrane to maintain the cyst structure

Etsuko Kiyokawa (Department of Oncologic Pathology, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada, Kahoku-gun, Ishikawa 920-0293, Japan)