

血管新生を制御する分子の機能イメージング

福原 茂朋・藤田 寿一・望月 直樹*

Functional Imaging of the Molecules Regulating Angiogenesis

Shigetomo FUKUHARA, Hisakazu FUJITA and Naoki MOCHIZUKI*

Bioimaging is an imaging technique visualizing (1) the changes of the localization, (2) the activation, and (3) the conformational change of the molecules in the living cells. Green fluorescent protein (GFP) and its related proteins from the sea have enable us to mark molecules as tagging proteins, donor/acceptor of fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes. We here introduce how we utilize GFP and its related proteins in order to monitor the activation of small GTP-binding proteins and the localization of signaling molecules, including adaptor proteins, cytoskeletal proteins, and transcription factors. By bioimaging we observe how the cells respond to the extracellular stimuli in terms of cell shape or cell movement as well as intracellular signaling cascade which is required for angiogenesis.

Key words: GFP, bio-imaging, FRET

1. なぜ GFP を用いた分子イメージングか

分子がどのような挙動を示すか。またその分子がいつ、どこで、活性化されるかをバイオイメージング（生きた細胞・動物での分子のイメージング）で検討することは、情報伝達研究に非常に有効な手段となっている。筆者らは、新生血管の構築のメカニズムをバイオイメージング技術を駆使して、その分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。

バイオイメージングには、クラゲ、イソギンチャク、サンゴなどの海洋生物から得られる green fluorescent protein (GFP, 緑色蛍光タンパク質) や red fluorescent protein (RFP, 赤色蛍光タンパク質) の発見が重要であった。これらの蛍光タンパク質の発見と改変・改良なくしてバイオイメージングの進歩はなかった。実際に、GFP は

- ① 分子にタグとして付加して分子の挙動を観察する
- ② internal ribosomal entry signal (IRES) の下流に GFP を挿入して、ある分子を発現する細胞をマークし、発現していない細胞との挙動の違いを区別する (IRES の配列を挿入することにより、目的分子と

GFP を同時に発現することが可能である)

- ③ 転写のレポーターとして用いて、プロモーターの活性化部位を調べる
- ④ fluorescence resonance energy transfer (FRET) という 2 蛍光間エネルギー共鳴移動のアクセプター/ドナーを用いることに使用されている

GFP を用いることは、生きた細胞に導入可能なだけでなく、細胞にとってプローブとしての負荷が少ないこともあげられる。光を照射することで GFP によりフリーラジカルが生成されることを除けば、CO₂ と温度を 37°C に管理するだけで長時間（数時間～終夜）の観察が十分に行えるので、非常に細胞にとってやさしいイメージング方法である。

細胞の情報伝達系は、細胞の増殖・分化・老化・運動などを調節する重要な制御機構である。細胞膜表面に存在する受容体と細胞外に存在するリガンドの結合により、細胞内の情報伝達系が活性化される。受容体は、増殖・分化に重要なチロシンキナーゼ受容体・7 回膜貫通型受容体などのほかに、インテグリン受容体のように細胞接着に特異的

な受容体, アポトーシスに重要な Fas などの受容体もある (Fas はアポトーシスという細胞死を細胞におこすときの細胞膜の受容体である)。それぞれの受容体の下流にはアダプター分子やキナーゼが機能し, 情報伝達を増幅・減衰することで調節を行い, 最後には転写までつかさどる情報伝達系が多い。本稿では, 細胞外刺激がどのように細胞内情報伝達系を活性化して, 血管新生を制御するシグナルを調節しているかを紹介し, 情報伝達のイメージングによって探り理解する研究を紹介する。

2. 分子の挙動の観察

細胞内には情報伝達にかかわる分子が多数存在するが, 細胞接着や細胞の転写にかかわる分子の移動を生きた細胞で観察した結果を紹介する。

2.1 細胞運動を調節する分子観察のためのタグとしての GFP

ephrin-Eph チロシンキナーゼ系活性化 (神経や血管の走行を決定するための情報伝達系で, ephrin が Eph チロシンキナーゼ受容体のリガンド) による細胞運動亢進時のアダプタータンパク質 Crk の機能の検討を, RFP タグ付き Crk と GFP タグ付きアクチンで検討した。ephrin-Eph 系は個体発生時の動脈・静脈の形成に重要である。細胞どうしの反発反応や接着誘導反応によりこの動脈形成が行われていると予想されているが, どのような分子メカニズムで細胞の運動が制御されているかは不明であった。Eph 受容体の細胞内ドメインにも Crk の Src homology domain 2 (SH2) が結合可能なチロシンが存在しているので, Eph の下流で Crk が機能する可能性があると考えた。

RFP-Crk をヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) に GFP-アクチンと共発現させて, Crk の局在を調べた。ephrin は細胞表面に発現しているために細胞接着依存性に Eph 受容体を活性化するが, Eph 受容体の刺激は ephrin-B1/Fc を用いた。図 1 に示すように, ephrin-B1 刺激前には Crk は, 細胞接着斑 (focal adhesion, fibrillar adhesion) に局在しているが, ephrin 刺激で細胞膜が進展するとともに, 細胞膜先端部の比較的小きな focal complex (小さな接着斑: 細胞と培養皿の接着箇所として観察される部位) に局在するようになった。そして, この focal complex が成長し focal adhesion (大きな接着斑) になることが, タイムラプス蛍光顕微鏡で観察できた²⁾。

2.2 タンパク質キナーゼの分子観察のためのタグとしての GFP

血管内皮細胞は, 細胞間接着に platelet and endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1) 分子どうしのホモフィ

リックな結合が重要である。筆者らは, PECAM-1 分子の細胞内ドメインのチロシンリン酸化キナーゼとして, Fer チロシンキナーゼを同定した。Fer チロシンキナーゼが, 細胞間接着分子である PECAM-1 をどのようにリン酸化するのかを調べた³⁾。

GFP-Fer を HAEC に発現させて, 自発的な運動 (血清存在下) のときにどのような挙動を示すかを観察したところ, 図 2 に示すように, 微小管に局在した Fer が細胞の進行方向の微小管におもに存在し, 運動に対しての細胞の後半部分の微小管からは Fer がはずれていくことがわかった。進行方向側の微小管に局在することで, 細胞-細胞の接着がおこるときに, Fer が接着部位の PECAM-1 のリン酸化をおこしやすいたことが予想された。

2.3 転写因子の核内外シャトルを観察

インスリンシグナルは糖代謝に重要であるが, 血管内皮細胞でもインスリン受容体は存在し, 内皮細胞の機能をつかさどっている。インスリンシグナルで特に重要な経路として, Akt キナーゼ-FoxO 転写因子がある⁴⁾。FoxO は生物の寿命を決定する因子としても重要であることが, 線虫を使った研究で明らかにされてきた。血管内皮細胞には Akt を活性化するようリガンド受容体系も存在し (たとえばスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P)-EDG 受容体系もそのひとつ), Akt 活性化による FoxO の制御を行っている可能性が予想された。そこで, GFP-FoxO を発現した HAEC を S1P 刺激して FoxO をイメージングした。図 3 に示すように, 血清飢餓後の細胞では GFP-FoxO は核内におもに存在するが, S1P 刺激により核内外の移行をおこすことがわかった。S1P 刺激は Akt 活性化による FoxO の核外への移動だけではなく, ほかのシグナルの活性化による核内移行も調節していることが示唆された。

3. 分子の活性化のイメージング

筆者らは, Ras ファミリー GTP 結合タンパク質の活性化の可視化プローブを作製して, 増殖因子刺激による時間的・空間的な Ras 分子の活性化を生きた細胞を用いて示した⁴⁾ (Ras 分子は活性化型つまり GTP 結合型では下流のシグナル分子と結合して, 情報伝達を活性化させる。このため, GTP 結合タンパク質といわれている)。このプローブの構造と原理を図 4 に示す。2 蛍光間の FRET を用いて, FRET の増減により Ras の活性化をモニターできるように工夫したプローブである。図に示す原理から, シアン蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein, CFP) の励起で黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein, YFP) の蛍光が増大して CFP からの蛍光が減弱すれば,

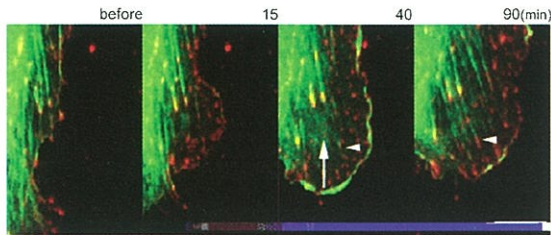


図1 Crkは細胞接着斑に局在する。ephrin-B1刺激によりCrkは細胞膜先端のfocal complexに局在する。刺激前はアクチンをつなぐ大きなfocal adhesionに局在しているが、刺激後は進展した膜のfocal complexに局在し、さらに成長してfocal adhesionとなる。矢頭は成長したfocal complex。矢印は消失した接着斑。

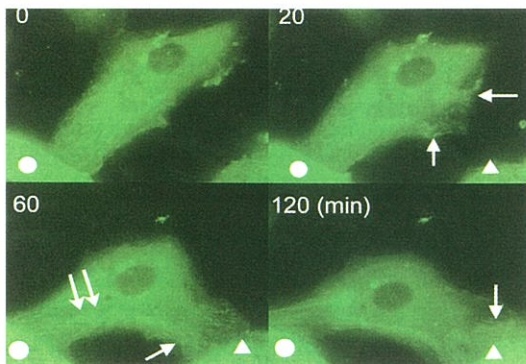


図2 Ferは形成されつつある微小管に局在する。GFPタグ付きFerをHAECに発現させ、タイムラプス蛍光顕微鏡でFerの局在を観察した。○で示す細胞に向かって形成されている微小管にFerは局在しているが、進行方向を変えて△で示す細胞に向かって新たに形成される微小管に移動するのがわかる(一本矢印)。このとき後ろ側の微小管からはFerが消失していくのが観察される(二本矢印)。

FRETが起きていることになる。CFPとYFPが5nm以下の距離に近接するとFRETがおこるので、Rasが活性化したことをFRETの増減で知ることが可能である。YFP蛍光強度/CFP蛍光強度を擬似カラー表示して、FRETの増減を表示することが可能である。

3.1 Rap1のS1Pによる走化性における活性化

Rasファミリー分子のひとつであるRap1分子が、細胞の極性変化に関係するかどうかを検討した⁵⁾。Rap1の可視化プローブは、RasをRap1に入れ替えたものを用いている。Rap1もRafと結合することから、このプローブによりRap1はS1P刺激で活性化されるが、その機能は不明であった。スフィンゴシン1-リン酸(S1P:S1Pは血小板で生成され、血管内皮細胞の7回膜貫通型受容体S1P受容体を活性化する)をマイクロピペットの先端から放出して、血管内皮細胞におけるRap1の活性化と細胞の運動について検討した(図5)。S1Pは細胞の運動に不可欠な細胞膜進展と波状運動をおこし、Rap1の活性化がみられることを示している(図中で赤で示すところがFRETの

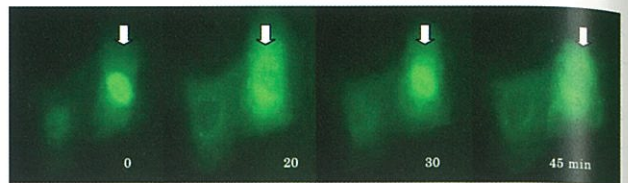


図3 S1P刺激はFoxOの核内外のシャットリングを誘導する。↓で示すように核内に局在したFoxOがS1P刺激で核外に移行し、さらに核内に戻ることを示している。時間はS1P刺激後の時間。

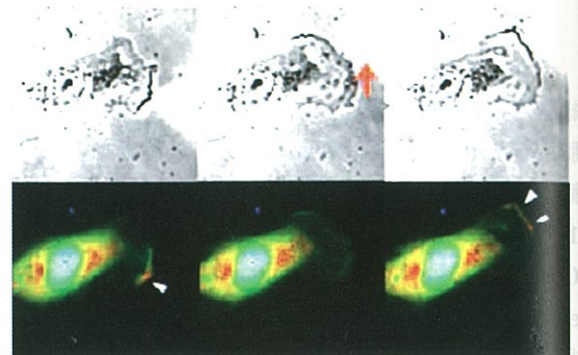


図5 S1P刺激によるRap1の活性化の可視化。マイクロピペット(赤)を用いてS1Pで細胞を刺激すると、矢頭(白)で示すようにRap1の活性化が観察できた。はじめにS1Pを細胞の右下方から細胞に与えると、そこでRap1の活性化が観察できた(矢頭)。ところが、ピペットを赤で示すように移動させてS1Pを投与すると、矢頭2つで示すような部位でRap1の活性化が観察できた。

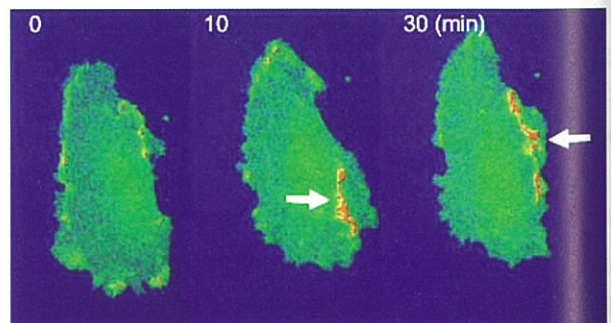


図6 血管内皮細胞間接着部位でのRap1の活性化。Rap1活性化可視化プローブを発現する細胞が細胞接着をおこすときに、赤で示すようなRap1の活性化がみられる。血管内皮細胞は自発的に動いているので、時間をおって見ていると、細胞接着をおこすのが観察できる。

増加部位、すなわちRap1の活性化部位である)。

3.2 Rap1の細胞接着における活性化

筆者らは、細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMPによるRap1の活性化が細胞接着、特に血管内皮特異的発現カドヘリン(VE-cadherin)の接着を増強して、細胞間の透過性を調節していることを報告した⁶⁾。cAMPの刺激以外にも、細胞の接着でRap1の活性化がおこることを見

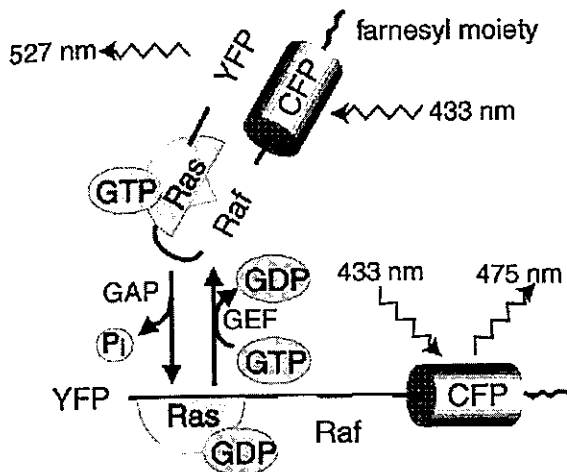


図4 Raichu (Ras and interacting chimeric unit, Ras 活性化可視化プローブ) の構造と原理. Raichu は YFP をアミノ末端に CFP をカルボキシル末端に配置し, その間に Ras と Ras の会合分子 raf を挟み込んでいる. Ras がグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) により GTP 結合型になると Raf と結合するので, YFP と CFP の距離が近づき, CFP-YFP の FRET により CFP の励起で YFP からの蛍光 (527 nm) が観察される. 逆に GTPase 活性化タンパク質 (GTPase activating protein, GAP) により GDP 結合型になると, FRET は観察されず CFP からの蛍光のみ観察され, FRET がおこっていないことがわかる.

いだししている. 血管内皮細胞を培養して, Raichu-Rap1 を発現する細胞を FRET 顕微鏡で観察した (図6). 細胞間接着が生じている部位で, 赤で表示されるように, Rap1 が活性化していることがわかる.

4. 考 察

本報告では, GFP と関連蛍光タンパク質がどのように情報伝達の研究に役立つかを例示した. 血管新生には血管内皮細胞の運動が不可欠であり, また細胞の寿命を決定する機構も関与している. さらに, 細胞を接着させたり, 細胞を動かすときの細胞骨格の変化を捉えたり, その変化を誘導するメカニズムを可視化によって明らかにすることを試みてきた. これはいずれも生きた細胞でなければ得られない情報であるため, パイオイメージングが有効であると考えている.

蛍光タンパク質はタグとしてだけでなく, FRET のドナー/アクセプターとして使用可能である. 現在, CFP/YFP を組み合わせて使用しているが, これからさらに発見されたり改良される蛍光タンパク質を用いることで, より FRET 効率の高い分子プローブの開発もおこなわれて

いくものと予想している.

また, 蛍光タンパク質の中には, 蛍光消退や蛍光変換をおこすきわめて興味深いものも報告されており^{7,8)}, これらを用いた生物学研究はますます増加していくと予想している. いずれにしても, 励起による蛍光取得というステップが必要なために, 光学系技術の進歩によりいかに励起を少なくし, 検出感度を上げられるかが, 今後の光学系に期待するところである. 現在の解像度がさらに上がり, 微細な細胞構造内での分子の移動の変化や活性化の変化などが捉えられるようになることを願っている.

文 献

- 1) K. Nagashima, A. Endo, H. Ogita, A. Kawana, A. Yamagishi, A. Kitabatake, M. Matsuda and N. Mochizuki: "Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells," *Mol. Biol. Cell*, 13 (2002) 4231-4242.
- 2) N. Kogata, M. Masuda, Y. Kamioka, A. Yamagishi, A. Endo, M. Okada and N. Mochizuki: "Identification of Fer tyrosine kinase localized on microtubules as a platelet endothelial cell adhesion molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells," *Mol. Biol. Cell*, 14 (2003) 3553-3564.
- 3) L. P. Van Der Heide, M. F. Hoekman and M. P. Smidt: "The ins and outs of FoxO shuttling: Mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation," *Biochem. J.*, 380 (2004) 297-309.
- 4) N. Mochizuki, S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki and M. Matsuda: "Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1," *Nature*, 411 (2001) 1065-1068.
- 5) H. Fujita, S. Fukuhara, A. Sakurai, A. Yamagishi, Y. Kamioka, Y. Nakaoka, M. Masuda and N. Mochizuki: "Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAP1, a Rap1-associating molecule, localizes," *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 5022-5031.
- 6) S. Fukuhara, A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa and N. Mochizuki: "Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway," *Mol. Cell Biol.*, 25 (2005) 136-146.
- 7) R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno and A. Miyawaki: "An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (2002) 12651-12656.
- 8) R. Ando, H. Mizuno and A. Miyawaki: "Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting," *Science*, 306 (2004) 1370-1373.

(2005年8月26日受理)