

生きたマウスにおけるがん遺伝子産物活性化の観察

大場 雄介

1. 研究のねらい

蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) の技術を利用したプローブ分子を用いて、生きた細胞と生きた個体における分子の活性化に関する時空間的情報を得ることにより、細胞内局所における細胞内情報伝達のメカニズムを解明する。

2. 研究成果と考察

分子内 FRET を利用した Ras と Rap1 の活性化モニター分子を開発・改良し、増殖因子依存性の活性化について時空間的に解析した。その結果、Ras や Rap1 の活性化は細胞内で平坦に起こるわけではなく、勾配が存在すること、この活性化の勾配は GTP 水解促進因子(GAP)が制御していることを明らかとした。実際に細胞内の GAP 活性に勾配が存在することを、画像データと反応速度論的解析の融合という新しい手法により証明した。生きた個体レベルでは、小型魚類であるゼブラフィッシュを用いて、生体内における 1 細胞レベルでのイメージングに成功し、Rho の活性化が発生初期胚での細胞運動に必須であること、活性と移動速度に相関があることを見出した。一方、分子間 FRET を利用したプローブ分子の開発も進め、アダプター分子 MyD88 と転写因子 IRF-7 が細胞内の特定のドメインで相互作用し、これが核移行に引き続くインターフェロン産生に重要な役割を果たすことを示した。一連の研究から、細胞内局所での分子の活性化が生理的な応答に重要であること、すなわち時空間的制御機構が細胞応答を既定することが明らかになりつつある。今後もさきがけ研究での成果を発展させ、情報伝達の生理的役割の解明を目指したい。

成果リスト

論文

1. Sakakibara, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M. and Hattori, S. : Novel function of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway- mediated Rap1 activation. **J. Cell Sci.** 115(Pt 24): 4915-4924, 2002
2. Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. and Matsuda, M. : Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. **Mol. Cell. Biol.** 22(18): 6582-6591, 2002
3. Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R. E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima K., and Matsuda, M. : Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. **J. Cell Biol.** 162(2): 223-232, 2003
4. Ohba, Y., Kurokawa, K. and Matsuda, M. : Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. **EMBO J.** 22(4): 859-869, 2003
5. Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C. and Taniguchi, T. : Role of a transductional- transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 101(43): 15416-15421, 2004
6. Miyagi, C., Yamashita, S., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Matsuda, M., and Hirano, T. : STAT3 noncell-autonomously controls planar cell polarity during zebrafish convergence and extension. **J. Cell Biol.** 166(7): 975-981, 2004
7. Yoshizaki, H., Ohba, Y., Parrini, M.C., Dulyaninova, N.G., Bresnick, A.R., Mochizuki, N., and Matsuda, M. : Cell Type-specific Regulation of RhoA Activity during Cytokinesis. **J. Biol. Chem.** 279(43): 44756-44762, 2004
8. Takaya, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., and Matsuda, M. : Ra1A Activation at Nascent Lamellipodia of EGF-stimulated Cos7 cells and Migrating MDCK Cells. **Mol. Biol. Cell** 15(6): 2549-2557, 2004
9. Kurokawa, K., Itoh, R.E., Yoshizaki, H., Ohba, Y., Nakamura N. and M. Matsuda. : Co-activation of Rac1 and Cdc42 at Lamellipodia and Membrane Ruffles Induced by Epidermal Growth Factor. **Mol. Biol. Cell** 15(3): 1003-1010, 2004

総説

10. 大場雄介、松田道行：細胞増殖と細胞死。 病理と臨床【臨時増刊号】 22: 75-80, 2004
11. 大場雄介、松田道行：がん遺伝子産物 Ras の情報伝達とその可視化。生化学 76(1): 16-28, 2004
12. 大場雄介：生きた細胞を使った癌遺伝子研究ーその新しい動きー 医学のあゆみ 203(4): 248-250, 2002

口頭発表

13. 大場雄介：FRET イメージングと画像解析による細胞内情報伝達の時空間的解析。
第 1 回 Live Cell Imaging 研究会 東京 (2004)
14. 大場雄介：Ras の時空間的活性制御機構の解析。第 93 回日本病理学会 札幌 (2004)
15. 大場雄介、沢野朝子、宮脇敦史、松田道行：Ras 活性化の時空間的解析。
第 26 回日本分子生物学会 神戸 (2003)
16. 大場雄介：FRET を用いた細胞内情報伝達のイメージング。
第 26 回日本分子生物学会 神戸 (2003)
17. Ohba, Y., Sawano, A., Miyawaki, A. and Matsuda, M. : Spatio-temporal activation of Ras. **Nineteenth Annual Meeting on Oncogene** Frederick, MD, USA (2003)
18. Ohba, Y., T., Kurokawa, K. and Matsuda, M. : Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. **Keystone Symposium 2003, Optical Imaging: Applications to Biology and Medicine** Taos, NM, USA (2003)
19. 大場雄介、松田道行：Ras ファミリー蛋白質の時空間制御機構。
第 25 回日本神経科学会 東京 (2002)
20. 大場雄介、望月直樹、長嶋和郎、松田道行：Ras と Rap1 の時空間活性化の観察とその制御機構の解析。第 91 回日本病理学会 横浜 (2002)

謝辞

さきがけ研究を行うにあたり様々なご助力をいただいた、大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス分野・松田道行教授、東京大学大学院医学系研究科免疫学講座・谷口維紹教授、理化学研究所脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム・沢野朝子先生、宮脇敦史先生、大阪大学医学系研究科腫瘍病理・宮城智恵美先生、山下晋先生、平野俊夫教授、に深謝致します。