

博士論文（要約）

蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）プローブを用いたHT22細胞における
c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化の可視化・定量化

唐沢 康暉

(背景)

虚血による神経細胞死では、酸化ストレスが重要な役割を果たしている。細胞内の内因性の活性酸素(Reactive Oxygen Species,ROS)の過剰な産生と、それを取り除く内在性の抗酸化機能のバランスの破綻により ROS が蓄積し、細胞内の蛋白質、脂質、ポリヌクレオチドなどが酸化され有害な現象がおこる。酸化ストレスによる細胞死において、シグナル伝達物質、MAP キナーゼの活性化、c-Jun N-terminal kinase (JNK)が関与するといわれ、治療のターゲットの一つとして期待されている。

HT22 細胞は、酸化ストレスによる細胞死の in Vitro の実験モデルとして、これまで多くの研究で用いられてきた。マウスの海馬由来の神経細胞で、グルタミン酸を投与すると内因性の ROS が蓄積し細胞死が誘導される。HT22 細胞はイオン型グルタミン酸受容体を持たないためグルタミン酸毒性による細胞死がおきず、高濃度のグルタミン酸を負荷した場合、細胞内へのシスチンの取り込みが減少し、システインの欠乏のため、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオン産生が抑制され、内在性 ROS が蓄積し細胞死を引き起こす。グルタミン酸を負荷すると、4~8 時間で ROS が蓄積し、8~12 時間で 80%以上の細胞が死ぬ。HT22 細胞は、初代培養神経細胞に比べ入手しやすく、低酸素負荷に比べ容易に再現性よく細胞死を誘導でき、取り扱いやすい優れた実験系であり、多くの知見が蓄積され、神経保護薬の効果の研究に多用されている。HT22 細胞にグルタミン酸を刺激した場合、ウェスタンブロット法では、MAP キナーゼがリン酸化されるか否かについて様々な報告があり、ERK が関与するという報告もあれば、JNK が関与するという報告もあり、その詳細な役割は分かっていない

酸化ストレスによる細胞死の研究において、混在した細胞集団から少数のタイムポイントで測定しただけでは、多様に満ちた真実を十分に解明できず、新たな研究手法が必要とされる。シグナル応答は短時間に起きる複雑で多様な現象であり、応答パターンが細胞ごとに異なるため、培養細胞を用いた細胞内分子のライブセルイメージングが適している。これまで、1 細胞レベルでの JNK の活性のダイナミクスは、明らかにされてこなかった。JNK の活性化が、どのタイミングで起こり、可逆性があるのかを解明することにより、細胞死での JNK の役割と、JNK が治療の対象となる可能性があるかどうかを知ることができる

細胞が生きている状態のままでシグナル伝達分子のダイナミックな変化を継続的に見ることが可能になった。そのためのバイオセンサーの一つが蛍光エネルギー移動を利用した FRET プローブである。

FRET (fluorescence resonance energy transfer)とは、2 種類の蛍光分子において、片方の蛍光スペクトルが、もう一方の励起スペクトルと重なりがあり、かつ 2 つの蛍光分子が近接している際に、励起した蛍光分子のエネルギーが、もう一方の蛍光分子へ移動する物理現象のことをいう。JNK の活性化(リン酸化)を反映する FRET プローブを用いて、マウスの海馬由来の HT22 細胞が酸化ストレスをうけて、JNK が活性化し細胞死にいたる過程を、刺激直後から細胞死の瞬間まで、1 細胞ごとに細かい時間間隔で、可視化・定量化した。JNK の活性化と細胞死の関連性を明確に示し、JNK の活性化の多様性を見ることができた。

(方法)

今回使用したプローブは、2009年にFosbrinkらが開発したJNKAR1というJNKのFRETプローブを、2011年小松らが改良したものである。長く柔軟につくられたEV linkerを用いることで、phosphataseによる基質ドメインへのアクセスが良くなり、従来のプローブより可逆性がよくS/N比が3倍になり、早期の軽度のJNKの活性化を捉えることができる。EV linkerの両側に、CFP,YFPの蛍光物質が配置されている。JNKによりJNK substrateのトレオニンがリン酸化されると、FHAにより認識されプローブの構造変化が生じる。二つの蛍光物質の距離が近接しFRET現象が生じ、発光する蛍光波長の比率が変化する。FRET効率(FRET ratio)は、同じ433nmの励起波長を照射したときの、530nmの蛍光強度(FRET-YFP)と480nmの蛍光強度(CFP)の比である。JNKの活性は、FRET効率により測定される。

$$\text{FRET ratio} = \text{FRET-YFP} / \text{CFP}$$

HT22細胞にPiggyBac Transposon Vector Systemで組み込み、酸化ストレスによる細胞死の過程でのJNKの活性化を1細胞ごとに詳細な定量データを取得できる、時間的、空間的分解能がすぐれた新たな実験系を確立した。自動追跡プログラムを開発し、1細胞ごとに時系列データを取得した。

細胞の明視野画像およびFRET効率の蛍光画像(CFP,FRET-YFP)、細胞死の確定のためのPI染色の画像を撮影した。細胞死の過程の形態学的変化とFRETの効率の変化、細胞死を明確に関連づけることができる。FRET ratioの画像はMetaMorphを用いて作成。JNKの活性化と細胞死の様子を可視化した。撮影した画像の蛍光信号を自動認識し、オートトラッキングプログラムを用いて、1細胞ごとに、定量化し、時系列データを取得した。オートトラッキングは、CellprofilerおよびPythonを用いた。

顕微鏡は、オリンパスIX83(倒立型蛍光顕微鏡)。対物レンズは、10倍。1分間隔で、1000分撮影した。刺激は、グルタミン酸0mM, 0.3mM, 1mM, 3mM, 10mM、アニソマイシン1500ng/ml。刺激は、撮影開始後9～10分に行われた。

(結果)

生存した細胞では、FRET ratio 比の変動は、0.9～1.1 の狭い範囲で推移し、JNK の活性化がみられなかった。1 分間隔で蛍光照射しても細胞が生存し、FRET 効率の変化がなく安定して 12 時間以上の観察ができた。

<生存細胞の Normalized FRET/CFP ratio >

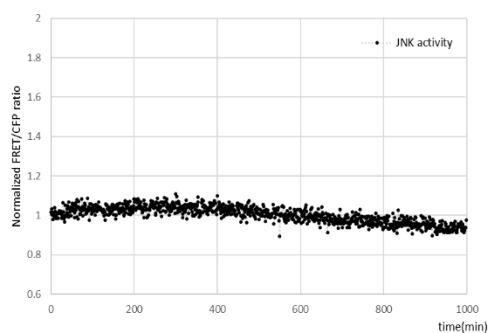


図 1-1 1 細胞の結果

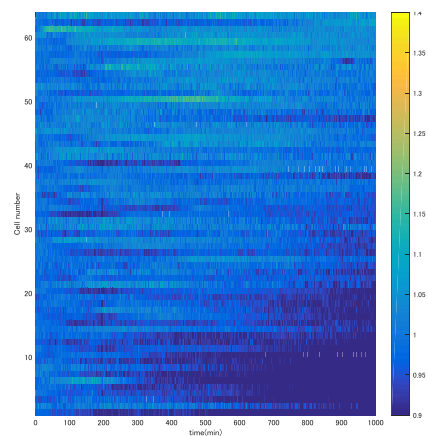
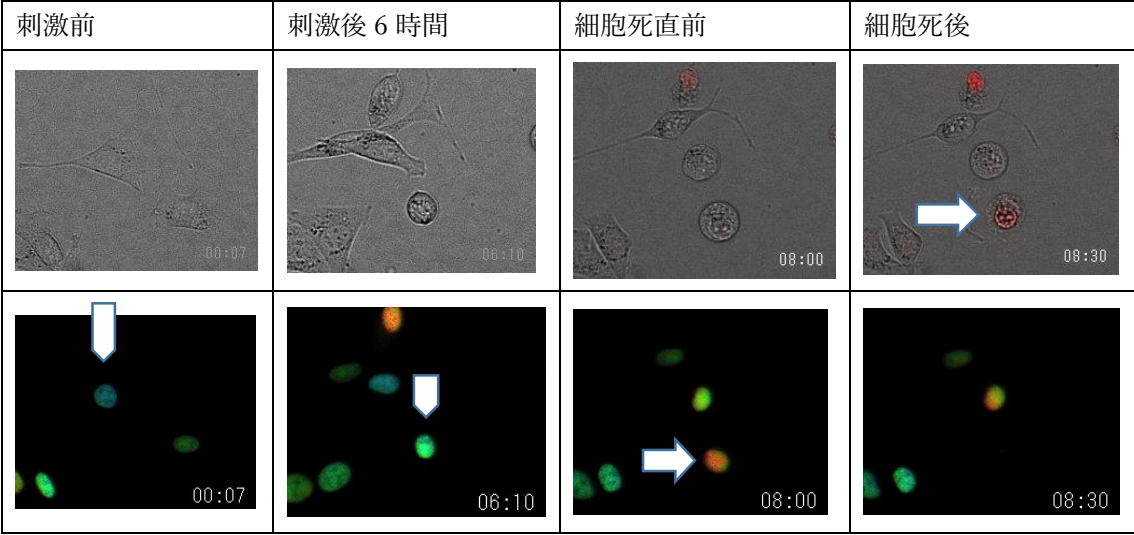


図 1-2 65 細胞の結果

酸化ストレスによる細胞の場合、細胞死の 2 時間前から、JNK の強い活性がみられ、核が増大し、核が崩壊するとともに、蛍光が消失し、その数分後に PI が陽性に変化した。定量データでも、同様の結果を示した。JNK の強い活性化と、酸化ストレスによる細胞死が生じた時間の関係性が明確にわかった。



<酸化ストレスによる細胞死での Normalized FRET/CFP ratio>

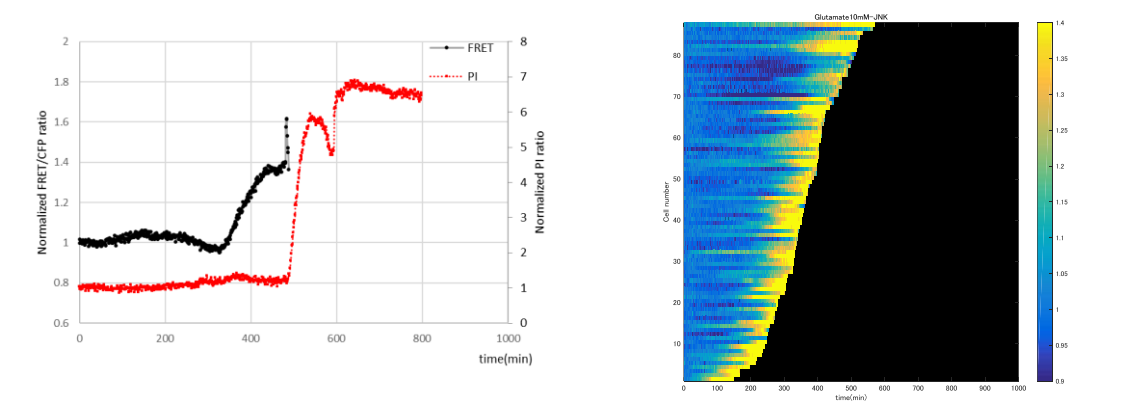


図 2-1 1 細胞の結果

図 2-2 6 5 細胞の結果

(考察)

今回の研究では、新規に改良された JNK-FRET プローブを、酸化ストレスの細胞死の研究で汎用されている HT22 細胞に組み込み、安定発現株を樹立した。1000 分(約 16 時間)にわたって、細胞の明視野画像および FRET 蛍光画像、細胞死の確定のための PI 染色による蛍光画像を撮影した。撮影した画像の蛍光信号から核を自動認識し追跡するオートトラッキングプログラムを開発し、蛍光強度の定量化を自動化した。酸化ストレスによる細胞死の過程で、1 細胞ごとに JNK の活性化を可視化し、定量化できる時間空間分解能にすぐれた実験モデルを構築した。詳細な時系列定量データから、JNK の活性化と細胞死の時間的関連性を明確に示すことができた。

動く、分裂する細胞をオートトラッキングで追跡し、蛍光強度を自動的に取得する画期的な技術である。これまでの細胞死の研究に用いられてきた、ウェスタンブロット法や MTS 法よりも、時間解像度が大幅に改善した。顕微鏡の撮影も自動化されており、実験に要する研究者の負担も少ない。

応用としては、刺激を徐々に増加させる実験系や、刺激を一度投与した後に、再度刺激を抜くパルス実験、刺激後に JNK の活性化させた上で、阻害剤や治療薬を投与する実験を行うことによって、JNK の活性化のコントロールと細胞生命決定の関係例をしめす予定である。今後、動物モデルでも、JNK のコントロールが細胞の生死の運命決定することを明確に示すことができれば、脳梗塞の治療のターゲットの一つとして発展が期待できるのではないかと考えられる。