

# 皮膚表皮細胞への生理活性タンパク遺伝子のデリバリーと分泌方向性の制御

京都大学大学院 薬学研究科

高倉 喜信

Epithelial cells, generally displaying cell polarity, are considered to be good targets for gene therapy because of their distribution of enormous surface area of various tissues and organs in animal bodies. Polarized epithelial cells possess two functionally and compositionally distinct cell surface domains that are separated from each other by tight junctions. They play fundamental roles in the specialized vectorial transport and secretion of proteins in tissue and organs.

Newly synthesized domain-specific membrane proteins are conveyed through the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi apparatus to the trans-Golgi network (TGN), and packaged into transport carriers for membrane integration. The destination of the membrane proteins seems to be determined by interrelation between some signal sequences on the protein and various cellular components playing roles in sorting and trafficking. Secretory proteins are also considered to be transported in the same manner as the membrane proteins. In spite of many investigations of the issue, the mechanisms regulating apical or basolateral sorting of secretory proteins remain elusive.

The green fluorescent protein (GFP) of the jellyfish *Aequorea victoria* and its variants are widely used in cell imaging applications to reveal the location of proteins. Results from those applications are providing new insights into protein function and cellular processes in the complex environment of the cell. The GFP-tagging technology is useful for directly investigating the intracellular localization, movement and fate of secretory proteins of interest in living cells.

We have recently examined the mode of secretion polarity of interferon (IFN)- $\beta$  expressed exogenously in several epithelial cell lines. The secretion of constitutive IFN- $\beta$  from the stable transformants was apparently unpolarized. Meanwhile, intriguingly, IFN- $\beta$  transiently expressed by gene transfection was predominantly secreted from the cell membrane side to which the transfection or the induction was carried out. In this study, we have investigated the subcellular localization of the cytokine using GFP-tagged IFN- $\beta$  under confocal laser scanning microscopy (CLSM). Our results suggested that IFNs expressed stably and transiently are transported via different post-TGN vesicles. The same secretory protein, at least as far as IFN is concerned, can be sorted to the apical or basolateral membrane side depending on the gene expression strategy, which deems to be regulated at the post-TGN stages.

## 1. 緒言

上皮細胞は体表面や体腔の表面を覆う極性を有する細胞で<sup>1,2)</sup>、広大な表面積を有しており遺伝子治療の重要なターゲットと考えられる。その形質膜はタイトジャンクションにより頂側膜 (apical) 側と基底膜 (basal) 側に物理的に隔てられ、膜を構成するタンパク質や、脂質の組成も異なっている<sup>3)</sup>。このように、性質の異なる形質膜ドメインを持つことで、上皮細胞は外から内、または内から外へと一方向性の物質の流れを生み出し<sup>4-6)</sup>、生体内の恒常性を保つ重要な働きを担っている。このような性質を利用して、上皮細胞にサイトカインなどの分泌性生理活性タンパク質をコードした治療用遺伝子を導入・発現させた後、方向選択的に分泌させることができれば、タンパク質医薬品の局所あるいは、全身循環へのデリバ

リーが可能になると考えられる。この際、遺伝子産物の分泌方向性、すなわち apical, basal どちら側に分泌されてくるかは、効果を左右する重要な因子となる。細胞生物学の分野では、発現したタンパク質は、それ自身のシグナルと細胞選別機構によって、存在するべき場所へと輸送されることが知られている。しかしながら、我々は既に多孔性フィルター上でモノレイヤーを形成した上皮細胞において、インターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) をモデルとした遺伝子導入実験を行った結果、IFN $\beta$  を構成的に発現させた場合には、極性を示すことなく apical 側及び basal 側にほぼ同量の IFN $\beta$  が分泌され、一過性に発現させた場合には、apical 側から遺伝子導入した場合には apical 側へ、basal 側から遺伝子導入した場合には basal 側への導入方向選択的な分泌が観察され、同一タンパク質であるにも関わらず、遺伝子発現様式に依存した異なる分泌方向性を示すことを見出している<sup>7)</sup> (Fig. 1)。そこで、Green fluorescent protein (GFP) とヒト IFN- $\beta$  との融合タンパク質発現ベクターを作製し、発現させた IFN のトランスゴルジネットワーク (TGN) 以降の小胞輸送過程について、イヌ腎上皮細胞株 MDCK 細胞を中心に用いて詳細な検討を行った。



Control of secretion polarity of bioactive protein after gene delivery to the skin

Yoshinobu Takakura

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

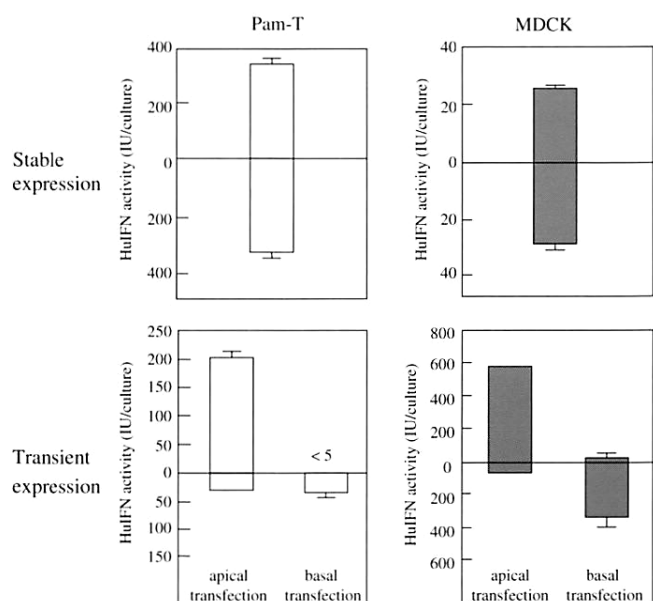


Fig. 1 Secretion polarity of stably or transiently expressed human IFN- $\beta$  in Pam-T and MDCK cells. Cells were culture on Transwell for 5 days. In transient expression experiments, human IFN- $\beta$  gene was transfected onto apical or basal side. Open bars and gray bars showed human IFN activities in Pam-T and MDCK cells, respectively. The values represent the mean of three determinations with S.D.

## 2. 実験

### 2.1 ヒトIFN- $\beta$ とGFPとの融合タンパク質 (HuIFN $\beta$ -GFP) 発現ベクターの作製

ヒトIFN- $\beta$  遺伝子をコードした pCMV-HuIFN $\beta$  のヒトIFN- $\beta$  cDNA 部位をPCRで増幅し、GFP発現ベクターのレポーター遺伝子のN末に組み込み、ヒトIFN- $\beta$  (HuIFN $\beta$ ) とGFPとの融合タンパク質 (HuIFN $\beta$ -GFP) を発現するベクター (pCMV-HuIFN $\beta$ -GFP) を作製した。

### 2.2 安定発現株の作製

播種後24時間培養した細胞に対し、ベクターとカチオン性リポソームであるLipofectAMINE2000<sup>TM</sup>との複合体を用いてトランスフェクションを行った。細胞を100mm培養皿に移し、抗生物質G418で培養した。G418耐性コロニーを回収して、さらに培養後、上清中のIFN量をバイオアッセイにより定量し<sup>8)</sup>、最も活性が高かったものを安定発現株として確立した。同様の方法を用いて蛍光の有無を指標にGFP安定発現株を樹立した。

### 2.3 分泌方向性の検討

安定発現株を、多孔性フィルター (Transwell<sup>TM</sup>) 上で5日間培養後、培地を交換し、24時間までに細胞層のapical側及びbasal側に分泌された細胞上清中のIFN量を

測定し、安定発現における分泌方向性を評価した。一方、一過性の遺伝子発現実験においては、プラスミドDNA (3  $\mu$ g/mL) とLipofectAMINE2000<sup>TM</sup> (10  $\mu$ g/mL) の複合体を、多孔性フィルター上で5日間培養した細胞のapical側及びbasal側から導入した。複合体を含むOpti-MEM培地で4時間培養後、通常の培地と交換し、導入後24時間までに各コンパートメント中へ分泌したIFN量を測定した。いずれの実験においても、IFNの細胞層を介した漏出の有無を調べるために、遺伝子導入したものとは異種のIFNをマーカーとして添加し、透過の有無を確認した。

### 2.4 遺伝子導入により発現した融合タンパク質の局在の観察

HuIFN $\beta$ -GFP及びGFP安定発現株は、フィルター上で5日間培養後固定した。固定前に5  $\mu$ g/mLのbrefeldin A (BFA) で30分間処理、もしくは20 $^{\circ}$ Cの10mM HEPES入りDMEMに培地を交換後20 $^{\circ}$ Cで2時間処理し、固定した。また、一過性の遺伝子発現実験においては、融合タンパク質発現ベクターを導入して、10時間後に固定した。固定前に、BFA処理、及び20 $^{\circ}$ C低温度処理を行った。固定、透過後、免疫染色により各オルガネラを染色あるいはpropidium iodide (PI) で核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一次抗体に小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク (TGN) のマーカータンパクであるprotein disulfide isomerase (PDI) (1D3)、Golgi-58K (58K-9)、furin convertase に対する抗体を用いた。いずれの場合も二次抗体に、Alexa Fluor 594 標識2次抗体を用いた。免疫染色後共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

### 2.5 シクロヘキシミド (CHX) 及び20 $^{\circ}$ C低温度処理のIFN- $\beta$ 分泌過程に与える影響

CHX及び20 $^{\circ}$ C低温度処理の融合タンパク質細胞内輸送に与える影響を観察するため、 $1 \times 10^5$ 個の融合タンパク質安定発現細胞をカバーガラス上に播種し、1日間培養した。その後、0、10、20  $\mu$ g/mLのCHXを含んだ20 $^{\circ}$ Cまたは37 $^{\circ}$ CのDMEMに培地を交換して2、4時間培養し、固定後共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。また、分泌に与える影響を調べるため $1 \times 10^5$ 個の融合タンパク質安定発現MDCK細胞を24穴プレートに播種し、0、10、20  $\mu$ g/mLのCHXを含んだ37 $^{\circ}$ CのDMEMに培地を交換して2時間培養後、CHXを含有しないDMEMに交換してさらに10、30、60、120分間培養した上清を回収し、IFN量を測定した。

### 2.6 TGN以降の小胞輸送過程の解析

カバーガラス上でMDCK細胞及び融合タンパク質安定発現細胞を1日間培養した。MDCK細胞に対しては、マウスIFN- $\beta$ 発現プラスミド (pCMV-MuIFN $\beta$ ) 及びpCMV-

HuIFN $\beta$ を同時に導入し、融合タンパク質安定発現細胞に対しては pCMV-MuIFN $\beta$ を導入した。導入後8時間から、10 $\mu$ g/mLの cycloheximide (CHX)、10mM HEPESを含んだDMEMで、20 $^{\circ}$ C 2時間培養した。その後、37 $^{\circ}$ Cの10 $\mu$ g/mLのCHXを含んだ培地に交換し、0、5、10、15、30分間培養後、固定した。固定後、一次抗体にマウスIFN- $\beta$ 抗体<sup>9)</sup>(6D-G8)、2次抗体にAlexa Fluor 546標識二次抗体を用いて、免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。画像解析はImage-Pro Plus ver. 4.5を用いて作製したFluorogramの対角線上の任意の場所を選び、コロライゼーション係数M1、M2を算出した<sup>10)</sup>。

### 3. 結果

#### 3. 1 融合タンパク質の分泌方向性の検討

まず、Pam-T細胞及びMDCK細胞において、融合タンパク質を安定に発現させた場合と一過性に発現させた場合の分泌方向性について検討した (Fig. 2)。その結果、安定発現株からは両方向にほぼ均等な分泌が見られたのに対し、一過性に発現させた場合には、遺伝子導入方向選択的な分泌を示した。これより、GFPと融合させた場合でもIFN- $\beta$ の活性は失われず、IFN- $\beta$ 単独の場合の一過性及び構成的な発現パターン (Fig. 1)と同様の細胞外への分泌方向性を示すことが明らかとなった。

#### 3. 2 融合タンパク質の細胞内オルガネラへの局在解析

遺伝子発現様式に依存したIFN- $\beta$ の分泌方向性の違いが細胞内のいずれの部位において生じるかを解明するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いてPam-T及びMDCK細胞に発現させた融合タンパク質の細胞内における局在をX-Z軸方向のスキャンにより観察した (Fig. 3)。その際、融合タンパク質を細胞内に蓄積させて観察を容易にするためBFA及び20 $^{\circ}$ C低温度処理を行った。BFAは、ゴルジ体を分解させる化合物としてよく知られており、タンパク質の分泌を阻害することが報告されている<sup>11,12)</sup>。20 $^{\circ}$ C低温度処理は新たに生合成されたタンパク質をTGNに蓄積させる方法として知られている<sup>13)</sup>。

まず、BFAを用いて観察を行った場合 (Fig. 3A)、GFP安定発現株では両細胞において細胞内全体に強いGFP由来のシグナルが局在していた。これに対し、融合タンパク質安定発現細胞では、融合タンパク質はPam-T細胞では核周辺に局在が認められ、その分布は核をはさんでapical側及びbasal側にほぼ均等に観察された。またMDCK細胞では、主として核に対してapical側にその局在が偏っている様子が観察された。一方apical及びbasal側から遺伝子導入後、一過性に発現させた融合タンパク質の細胞内局在は、各々の細胞の融合タンパク質安定発現株における局在パターンと同様であることが示された。以上

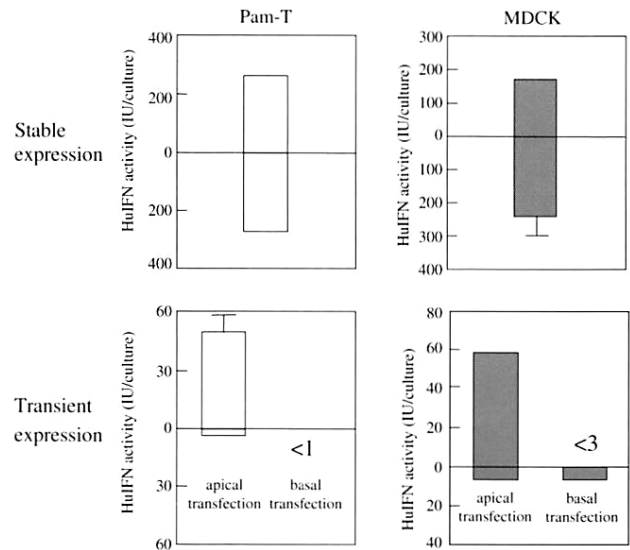


Fig. 2 Secretion polarity of stably or transiently expressed HuIFN $\beta$ -GFP in Pam-T and MDCK cells. Cells were culture on Transwell for 5 days. In transient expression experiments, HuIFN $\beta$ -GFP gene was transfected onto apical or basal side. Open bars and gray bars showed human IFN activities in Pam-T and MDCK cells, respectively. The values represent the mean of three determinations with S.D.

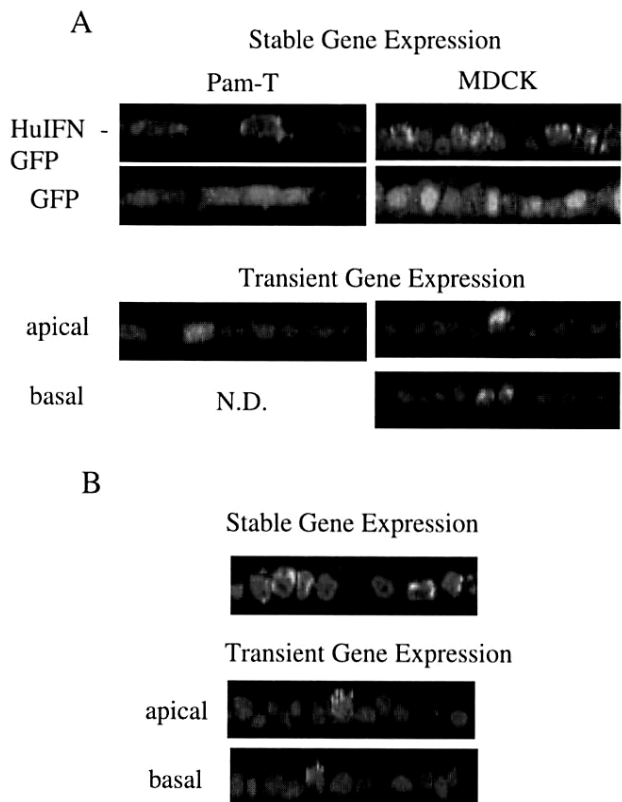


Fig. 3 Confocal microscopic observation of stably or transiently expressed HuIFN $\beta$ -GFP in Pam-T and MDCK cells (X-Z section). A shows the intracellular localization of stably or transiently expressed HuIFN $\beta$ -GFP in Pam-T and MDCK cells under BFA treatment. B shows that in MDCK cells under 20 $^{\circ}$ C temperature treatment. N.D. indicates not detection.

より、安定及び一過性に発現させた融合タンパク質の細胞外への分泌方向性は異なるにも関わらず、BFA 処理下の細胞内局在パターンは同様であることが示された。

BFA は MDCK 細胞における選別輸送を消失させることや、オルガネラに対し様々な形態変化を起すことが知られている。そこで MDCK 細胞については、20°C 低温度処理により融合タンパク質を TGN に蓄積させた場合についても検討した。しかしながら、この場合にも BFA 処理の時とほぼ同様の細胞内局在パターンを示した (Fig. 3B)。

次に、MDCK 細胞において発現させた融合タンパク質の細胞内オルガネラへの局在について解析した。その際、BFA 及び 20°C 低温度処理を行った場合についても検討した。まず、いずれの処理も行わずに検討した結果、融合タンパク質を安定に発現する MDCK 細胞 (MDCK (HuIFN $\beta$ -GFP)) では、融合タンパク質は主として核に対して apical 側にその局在が偏っており、オルガネラ染色との比較により、主に TGN/Golgi 体に局在していることが示された (Fig. 4A, control)。一方、apical 側からの遺伝子導入により、一過性に発現させた HuIFN $\beta$ -GFP も安

定発現株の場合と同様、主に TGN/Golgi 体への分布が観察された (Fig. 4B, control)。また、BFA 及び 20°C 低温度処理を行った場合にも同様の結果が得られた (Fig. 4, BFA, 20°C)。これより、HuIFN $\beta$ -GFP を安定に発現させた場合及び一過性に発現させた場合の細胞内局在は BFA、20°C 低温度処理の有無によらず同様であり、主として TGN/Golgi 体に局在していることが示された。

### 3. 3 異なる様式により発現させた IFN- $\beta$ の TGN 以降における小胞輸送過程の解析

次に、同一細胞において異なる様式により発現させた融合タンパク質とマウス IFN- $\beta$  の TGN 以降の小胞輸送課程について検討した。実験方法は、カバーガラス上で培養した MDCK (HuIFN $\beta$ -GFP) に対してマウス IFN- $\beta$  を一過性に発現、あるいは MDCK 細胞に対して融合タンパク質と、マウス IFN- $\beta$  を同時に一過性に発現させた。発現させた 2 種類の IFN- $\beta$  を CHX 含有培地で、20°C 低温度処理により TGN へ蓄積させ、その後 37°C で培養することにより TGN 以降の輸送を再開させ、経時的に細胞を固定し、

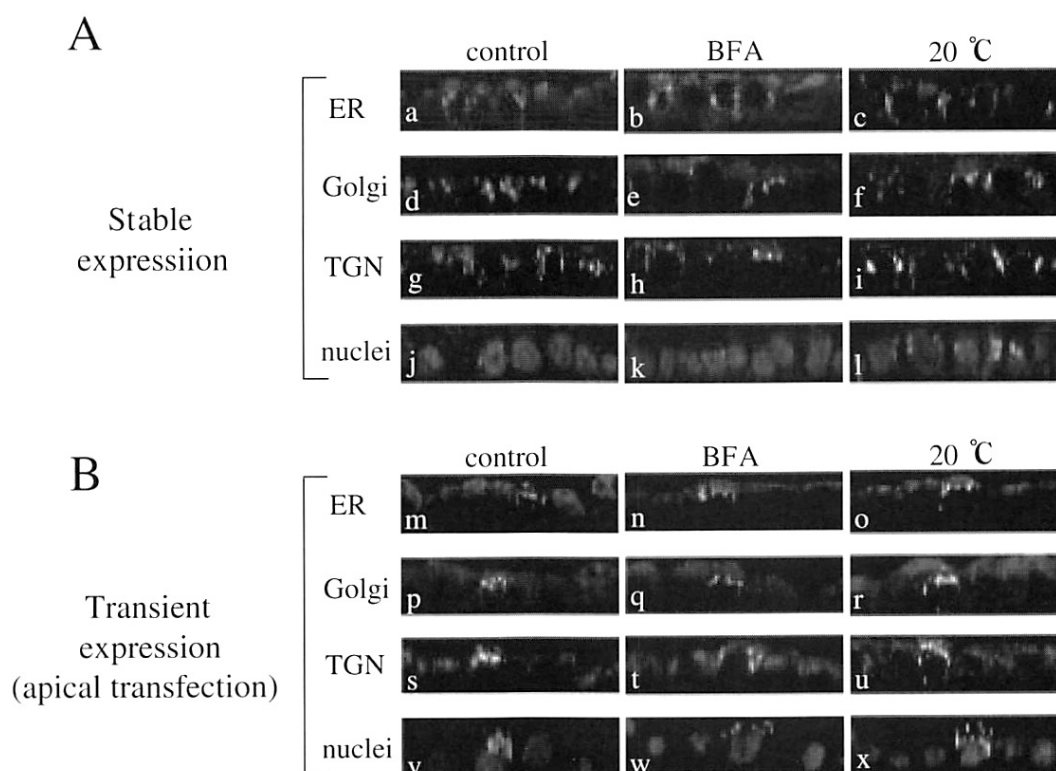


Fig. 4 Relative localization of HuIFN $\beta$ -GFP expressed in MDCK monolayers to various organelles. MDCK(HuIFN $\beta$ -GFP) (A) and parental MDCK (B) monolayers were grown on Transwell for 5 days. The latter monolayers were apically transfected with HuIFN $\beta$ -GFP gene and incubated for 10 h. Either monolayer was treated with 20°C for 2 h or with BFA (5  $\mu$ g/mL) for 30 min just prior fixation, followed by staining with the ER- (a-c, m-o), Golgi- (d-f, p-r), or TGN-specific antibodies (g-i, s-u) and appropriate secondary antibodies, or alternatively with PI for nuclei (j-l, v-x). In control experiments, no 20°C treatment or BFA treatment was carried out. Typical x-z sections of the confocal images are shown.

観察した。

まず、実験に先立ち、タンパク質合成阻害剤である CHX 及び 20°C 低温度処理の最適条件を検討した。MDCK (HuIFN $\beta$ -GFP) をカバーガラス上で培養し、0、10、20 $\mu$ g/mL の各濃度の CHX 存在下、20°C (Fig. 5A) 及び 37°C (Fig. 5B) で 2、4 時間培養し観察した。その結果、37°C において 10 $\mu$ g/mL 以上の CHX では 2 時間以上処理を行った場合、発現させた融合タンパク質が細胞内において観察されなかったのに対し (Fig. 5B, h, i, k, l)、20°C で培養した場合には、細胞内に蓄積した融合タンパク質が確認された (Fig. 5A, b, c, e, f)。以上より、発現させた融合タンパク質を TGN に蓄積させるための最適条件として、10 $\mu$ g/mL CHX 処理下、20°C、2 時間培養を選択し、以下の実験条件とした。また、

CHX 除去後の融合タンパク質の分泌について検討した結果、IFN- $\beta$  は新たに細胞内で合成されてから分泌されるまでに少なくとも 30 分を要することが示された (Fig. 5C)。

また、HuIFN $\beta$ -GFP とマウス IFN- $\beta$  を異なる様式から発現させた場合、それぞれ異なる分泌方向性が維持されるかどうかを検討するため、フィルター上で培養した MDCK (HuIFN $\beta$ -GFP) に対し、マウス IFN- $\beta$  を一過性に発現させた。その結果、両方向へほぼ均等に分泌する融合タンパク質の分泌方向性に影響を与えることなく、マウス IFN- $\beta$  は導入方向選択的な分泌を示すことが確認された (Fig. 6)。

Fig. 7 は、カバーガラス上で培養した MDCK (HuIFN $\beta$ -GFP) に対してマウス IFN- $\beta$  を一過性に発現、あるいは MDCK 細胞に対して GFP 融合タンパク質とマ

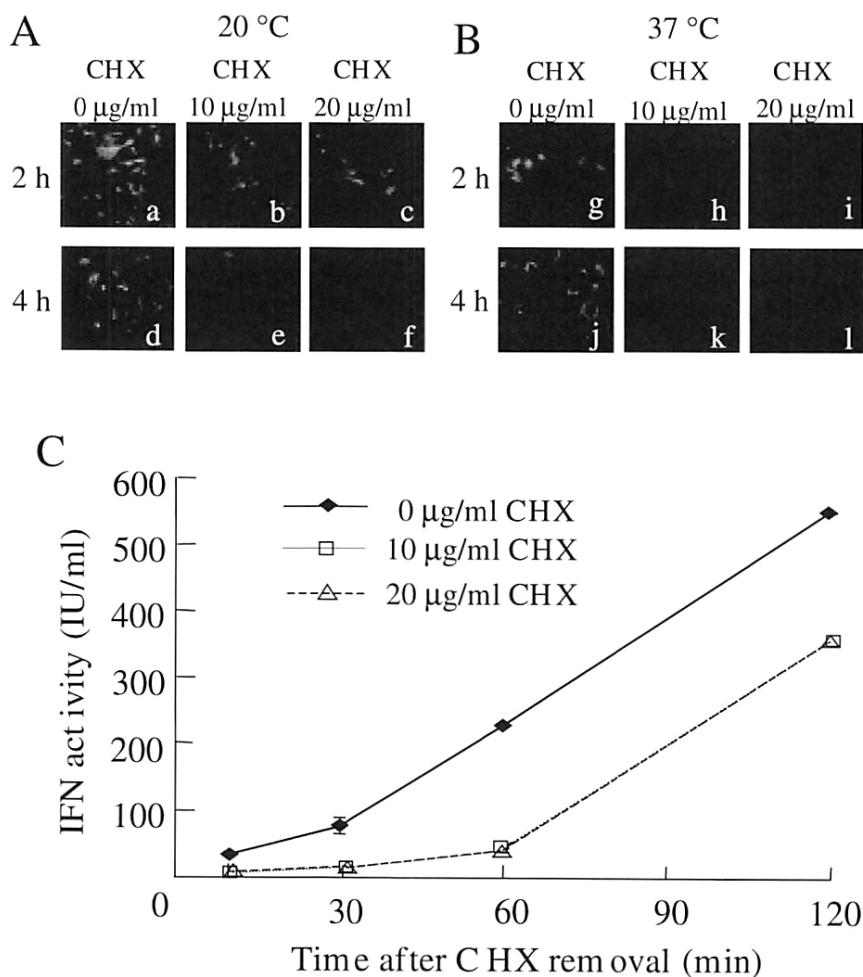


Fig. 5 Effects of CHX and temperature on cellular processing and secretion of HuIFN $\beta$ -GFP. Stable MDCK(HuIFN $\beta$ -GFP) cells cultured on coverslips were treated for 2 or 4 h with 0, 10 or 20  $\mu$ g/mL CHX at 20°C (A) or 37°C (B), followed by fixation and confocal microscopy. In parallel, secretion of the IFN activity from MDCK(HuIFN $\beta$ -GFP) (C) was examined; After treatment with 0, 10 or 20  $\mu$ g/mL CHX for 2 h, cells were incubated in regular medium without CHX at 37°C. During the incubation, aliquots of culture fluids were picked up at indicated time points and assayed for antiviral activity. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three separated experiments.

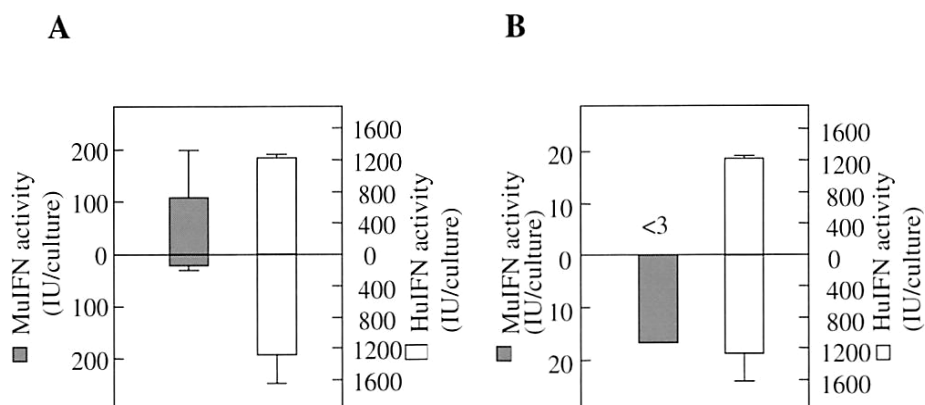


Fig. 6 Secretion of IFN- $\beta$  from MDCK(HuIFN $\beta$ -GFP) cells following transfection of the mouse IFN- $\beta$  gene. pCMV-MuIFN $\beta$  was applied to the apical side (A) or to the basal side (B). Shaded and open bars indicate mouse and human IFN activities, respectively. The values represent the means of three determinations with S.D.

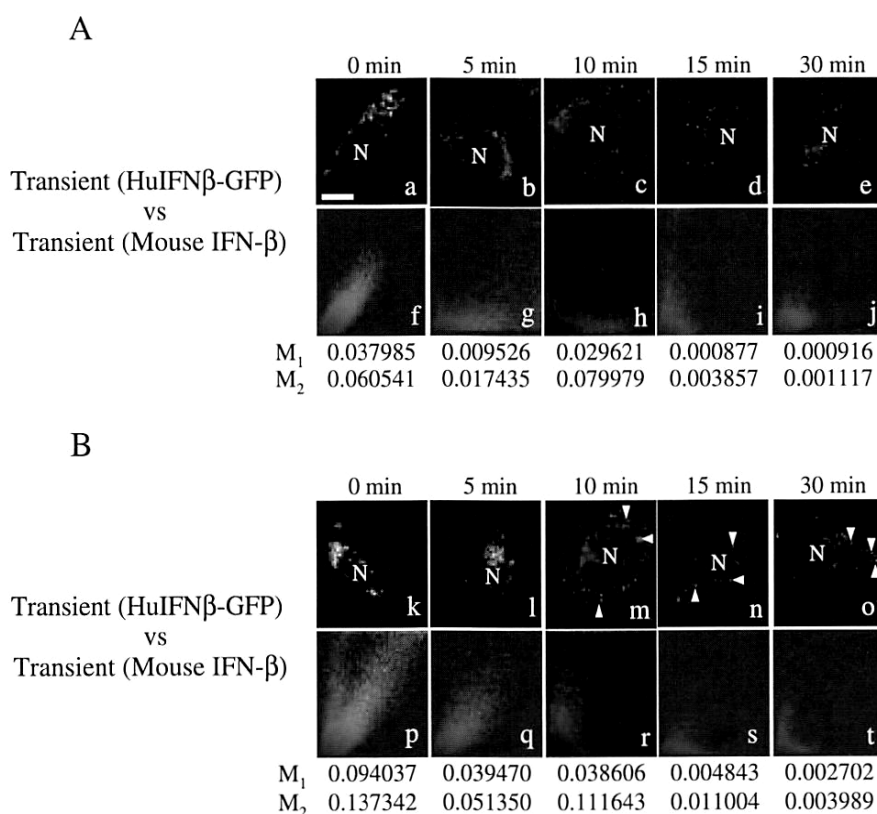


Fig. 7 Post-TGN localization of mouse IFN- $\beta$  and HuIFN $\beta$ -GFP expressed in MDCK cells. In A, stable MDCK(HuIFN $\beta$ -GFP) cells were transfected with MuIFN $\beta$  gene. In B, parental MDCK cells were co-transfected with pCMV-HuIFN $\beta$ -GFP and pCMV-MuIFN $\beta$ . After transfection, cells were incubated for 8 h and then subjected to 20 $^{\circ}$ C-treatment for 2 h. Thereafter, cells were warmed to 37 $^{\circ}$ C (time 0) (a, k) and incubated for 5 min (b, l), 10 min (c, m), 15 min (d, n) and 30 min (e, o), followed by fixation and immunostaining of mouse IFN- $\beta$  (red signal). N indicates the nucleus area. Notice that several orange-yellow spots are pointed by arrowheads in panels m-o. Scatter-plots of the pixel fluorogram (ordinate for green; abscissa for red) of the merged images (a-e, k-o) are shown in the respective lower panels (f-j, p-t), and colocalization coefficients,  $M_1$  (contribution of green) and  $M_2$  (contribution of red), which were computed for intensity ranges defined by arbitrary area of interest (AOI) along the diagonal line of each panel, are shown at the bottom of the panels. The scale bar in panel a represents 10 $\mu$ m.

ウス IFN- $\beta$  を同時に一過性に発現させた場合の結果で、赤いシグナルは免疫染色したマウス IFN- $\beta$  を、緑色が融合タンパク質を示している。上段は同一細胞において安定に発現させた融合タンパク質と一過性に発現させたマウス IFN- $\beta$  の分布を (Fig. 7A)、下段はコントロールとして、同一細胞において一過性に発現させた両タンパク質の分布を示している (Fig. 7B)。その結果、それぞれ 0 分においては両タンパク質が共に TGN に蓄積している像が観察されたが、時間の経過と共に、異なる様式により発現させた IFN- $\beta$  のそれぞれのシグナルは別々に分布した。一方、両タンパク質とも一過性に発現させた場合には、時間が経過しても、矢印で示すように、それぞれのシグナルが一部共存している様子が観察された。画像解析から求めた colocalization coefficients (M1, M2) も<sup>10)</sup>、これらの結論を支持していると考えられる。以上より、MDCK 細胞において異なる様式により発現させた IFN- $\beta$  は、TGN 以降異なる小胞輸送系により運ばれる可能性が示された。

#### 4. 考 察

我々は既に、外来性の IFN- $\beta$  遺伝子を特定の上皮細胞において発現させると、同一タンパク質であるにも関わらず、遺伝子発現様式に依存した異なる分泌方向性を示すことを明らかにしている。そこで、GFP をヒト IFN- $\beta$  の C 末端に結合させた融合タンパク質発現ベクターを作製し、発現させた融合タンパク質の細胞内における局在を可視化することで、一過性及び構成的に発現させた IFN- $\beta$  の異なる分泌方向性が細胞内のいずれの部位において生じるかを詳細に検討した。

発現させた融合タンパク質の細胞内局在について Pam-T 細胞及び MDCK 細胞を用いて検討した結果 (Fig. 3)、異なる様式において発現させた IFN- $\beta$  の分泌方向性は異なるにも関わらず、細胞内局在パターンは同様であることが明らかとなった。Pam-T 細胞と MDCK 細胞において細胞内融合タンパク質の局在パターンに違いが生じたのは、おそらく、これらの細胞におけるオルガネラの局在パターンが異なるためと考えられる。

また、分泌経路に関わるオルガネラを免疫染色し、発現させた HuIFN $\beta$ -GFP と細胞内オルガネラとの局在を比較検討した。MDCK 細胞を用いて解析した結果、HuIFN $\beta$ -GFP を安定に発現させた場合及び一過性に発現させた場合のいずれにおいても、融合タンパク質は主に TGN/Golgi 体に局在しており、BFA、20°C 低温度処理の有無によらず同様であった。よって、MDCK 細胞において発現させた融合タンパク質は、分泌方向性が異なっても同様の細胞内局在パターンを示したため、異なる様式により発現させた IFN- $\beta$  は小胞体で生合成後、TGN/Golgi 体まで見かけ上選別を受けることなく輸送され、他のタンパク質と同様に

TGN で選別を受けた後、遺伝子発現様式に依存した異なる経路を介して輸送されると考えられた。

この可能性について検討するため、同一細胞において融合タンパク質とマウス IFN- $\beta$  を異なる様式で発現させた場合の TGN 以降における小胞輸送過程を解析した。トランスウェル上で培養した細胞を用いた場合、遺伝子導入効率も低く蛍光のシグナルも弱いため、カバーガラス上で培養した非極性細胞を用いた。非極性状態の細胞においても、apical 側へ輸送されるタンパク質、basal 側へ輸送されるタンパク質はそれぞれ TGN 以降、異なる小胞によって輸送されることが報告されている<sup>14)</sup>。また、この実験にはマウス IFN- $\beta$  を用いたが、MDCK 細胞において一過性に発現させた場合には導入方向選択的に分泌されること、ヒト IFN- $\beta$  との間にはアミノ酸配列の相同性 (約 50%) があることから、ヒト IFN- $\beta$  と同様の分泌経路によって輸送されると考えられる。また実験に先立ち、MDCK 細胞の融合タンパク質安定発現細胞に対してマウス IFN- $\beta$  を apical 側あるいは basal 側から導入した場合、両方向にほぼ均等に分泌する融合タンパク質の分泌方向性に影響を与えることなく、マウス IFN- $\beta$  は導入方向選択的に分泌されることを確認しており、それぞれ異なる経路を介して輸送されている可能性が考えられる (Fig. 6)。検討の結果、MDCK 細胞に対して融合タンパク質とマウス IFN- $\beta$  を同時に一過性に発現させた場合、時間が経過してもそれぞれのシグナルが一部共存している様子が観察され、両タンパク質が TGN 以降共通の経路により輸送されている可能性が示唆された (Fig. 7B)。これに対し、融合タンパク質安定発現細胞に対してマウス IFN- $\beta$  を一過性に発現させた場合では、時間の経過と共に、異なる様式より発現させた IFN のそれぞれのシグナルが別々に分布している様子が観察され、両タンパク質が異なる経路を介して輸送されている可能性が示された (Fig. 7A)。

観察に使用した共焦点レーザー顕微鏡の実験条件における分解能の問題や、カバーガラスとトランスウェルでの培養条件の違い、生細胞におけるリアルタイムイメージングの必要性などはデータ解釈の際に留意すべき点ではあるが、得られた結果は MDCK 細胞において安定及び一過性に発現させた IFN- $\beta$  は、TGN 以降それぞれ異なる経路を介して輸送される結果、分泌方向性が異なる可能性を示すものである。

#### (引用文献)

- 1) Lau C, Soriano HE, Ledley FD, et al. Retroviral gene transfer into the intestinal epithelium. Hum. Gene Ther. 6, 1145-1151, 1995.
- 2) Lozier JN, Yankaskas JR, Ramsey WJ, et al. Gut epithelial cells as targets for gene therapy of

- hemophilia. *Hum. Gene Ther.* 8, 1481-1490, 1997.
- 3) Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725, 1989.
- 4) Casanova JE, Apodaca G, Mostov KE. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66, 65-75, 1991.
- 5) Rodriguez-Boulan E, Powell SK. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 395-427, 1992.
- 6) Pimplikar SW, Simons K. Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G protein. *Nature* 362, 456-458, 1993.
- 7) Nakanishi K, Watanabe Y, Maruyama M, et al. Secretion polarity of interferon-beta in epithelial cell lines. *Arch. Biochem. Biophys.* 402, 201-207, 2002.
- 8) Watanabe Y, Kawade Y. : Induction, production and purification of natural mouse IFN- $\alpha$  and - $\beta$ . In : Clemens MJ, Morris AG, Gearing AJH. (eds) : *Lymphokines and Interferons: a practical approach*. IRL Press, Oxford, 1987, 1-14.
- 9) Kawade Y, Watanabe Y. : Characterization of rat monoclonal antibodies to mouse interferon- $\alpha$  and - $\beta$ . In : Cantell K, Schellekens H. (eds) : *The Biology of the Interferon System*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1987, 27-29.
- 10) Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microscopy* 169, 375-382, 1993.
- 11) Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, et al. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 11398-11403, 1986.
- 12) Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, et al. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56, 801-813, 1989.
- 13) Wang E, Pennington JG, Goldenring JR, et al. Brefeldin A rapidly disrupts plasma membrane polarity by blocking polar sorting in common endosomes of MDCK cells. *J. Cell Sci.* 114, 3309-3321, 2001.
- 14) Rustom A, Bajohrs M, Kaether C, et al. Selective delivery of secretory cargo in Golgi-derived carriers of nonepithelial cells. *Traffic* 3, 279-288, 2002.