

皮膚老化・がん化を誘発するストレス性刺激を蛍光タンパク質断片の相互作用により検出するシステムの開発

金沢大学医薬保健研究域薬学系遺伝情報制御学研究室

山下 克美

Cdc25B is a cell cycle regulator that activates CDK/cyclin complex that leads to mitotic entry. Recently, we found that Cdc25B is degraded by cellular stresses that activate stress-activated MAP kinases p38 and JNK and that such stresses cell cycle retardation. We also indicated that the Cdc25B degradation is mediated by phosphorylation of Cdc25B by such kinases followed by ubiquitylation by SCF^{βTrCP}. We identified that the responsible sequence in Cdc25B for the interaction with SCF^{βTrCP} is in N-terminal 175 amino acids. Using such Cdc25B-derived peptide, we established a fluorescent protein-based bio-imaging system that enables us to detect the stress-specific interaction between the Cdc25B-peptide and βTrCP1, a substrate-recognition component in SCF^{βTrCP}. For this purpose, we applied the bimolecular fluorescence (BiFC) method. We made two fusion constructs; N-terminal GFP fragment was fused to N-terminal Cdc25B fragment and N-terminal deletion construct of βTrCP1 was fused to C-terminal GFP fragment. Such two constructs were further fused to make one artificial gene. Although such GFP-derived fragments do not emit green fluorescence when they are separated each other, the green fluorescence can be detected when two GFP-derived fragments were reconstituted through Cdc25B-βTrCP1 interaction that is induced by cellular stress to phosphorylate Cdc25B. We were not able to detect green fluorescence not only co-transfection of the Cdc25B-βTrCP1 Bi-FC probe with JNK1 but also after application of non-genotoxic stress, such as anisomycin and NaCl to probe-transfected cells. Furthermore, such stress-derived green fluorescence was detected by flow cytometry-based methods, where we used a tetracycline-controlled expression cell lines.

1. 緒 言

環境中の化学物質の中には細胞に対し毒性を有するものが数多く存在する。細胞に対する毒性の中には、細胞膜や微小管等の細胞骨格、さらには細胞内小器官を標的とし損傷を誘発する結果、細胞の機能低下が引き起こされる。このような化学物質に対する一般的な細胞毒性を検出する方法は数多く確立されており、実際の現場で広範に使用されている。化学物質の細胞毒性のうち重要なもののひとつに発がん性がある。化学発がん物質のうち、ゲノムDNAを標的とし、遺伝子損傷を誘発する遺伝毒性発がん性物質は、突然変異ひいては細胞がん化が誘発されることもある。一般に、化学物質の有する遺伝毒性発がん性は、突然変異誘発活性が有用な指標となるため、遺伝毒性化学物質の発がん性は、エイムテストをはじめとして数多く方法を用いて短期で推定可能である。一方で、これらの簡便な短期遺伝毒性試験で陰性を示すもののなかには長期動物実験で発がん性が検出されるものも多くある。

一般に、直接的、間接的にかかわらずゲノムの恒常性を脅かす刺激は発がん刺激となりうるため、このような刺激を受けた細胞はがん細胞の特徴であるゲノム不安定性を

有するようになる。発がん刺激はゲノム不安定性が引き起こされる前に必ず細胞周期制御のかく乱を引き起こすことから、細胞周期進行停止にかかわる生体内の反応を検知することで、遺伝毒性・非遺伝毒性刺激にかかわらずより広範な発がん性刺激を検出することが可能になる(図1)。

私達は、細胞周期制御因子のCdc25AとCdc25Bが非遺伝毒性細胞ストレスにより分解されることを発表した¹⁾。このうちCdc25Aは遺伝毒性ストレスによっても分解されることがすでに知られていたため^{2,3)}、Cdc25Bについて分解機構を解析したところ、(1)Cdc25Bの特異的なセリン残基が、ストレス応答性MAPキナーゼであるp38やJNKによりリン酸化されること、(2)そのリン酸化された部位にF-boxタンパク質として分類されるβTrCPを基質認

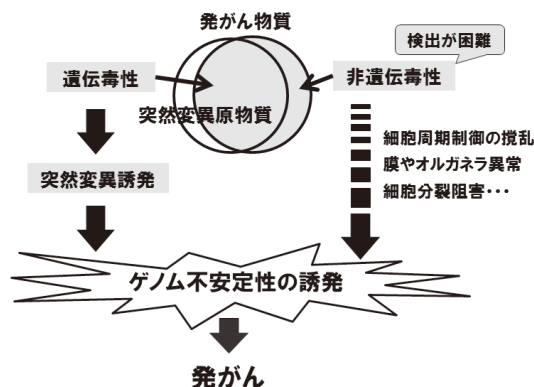


図1. 化学物質による発がん機構

遺伝毒性化学発がん物質は突然変異を誘発し、非遺伝毒性化学発がん物質は、細胞内のゲノム以外の成分を標的とすることで細胞機能をかく乱しゲノム不安定性を誘発することが、細胞の発がんにつながる。



Application of BiFC system to detect cellular stress that induces skin aging and cancers

Katsumi Yamashita

Laboratory of Cell Biology, Institute of Medical, Pharmaceutical, and Health Sciences, Kanazawa University

識サブユニットするユビキチン化酵素である SCF^{βTrCP} 4, 5) がリクルートされ、Cdc25B がユビキチン化されることが明らかとなった。さらに、このような細胞ストレスにより、細胞周期停止が引き起こされることが明らかになったため、細胞周期制御因子である Cdc25B の分解を誘発するような細胞ストレスは、発がん刺激となりうることが推測された。そこで本研究においては、これらの生化学反応を利用して、ストレス刺激特異的な Cdc25B と βTrCP の相互作用を、蛍光タンパク質を利用したバイオイメージングにより検出するシステムの構築を行った。本研究では、バイオイメージングとして、二分割し蛍光を発する能力を喪失した蛍光タンパク質断片が、再構成により再び蛍光を発する Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法^{6, 7)} を用いた。

2. 実験

2.1 BiFC プローブプラスミドの作成

Cdc25B は、p38/JNK により安定性に関わるリン酸化を受ける部位である 101 番目と 103 番目のセリン残基 (以下、S101 および S103 と略記) が含まれる、N-末端より 175 番目までの断片を使用した。βTrCP は、βTrCP1 と βTrCP2 のうち βTrCP1 を実験に使用した (Cdc25B のユビキチン化能は同程度であった)。βTrCP は、N-末端側約 200 アミノ酸までの領域に SCF 複合体構成に関わる F-box と呼ばれる領域を、約 300 アミノ酸より下流の C-末端側に、基質認識と結合に関わる WD-domain と呼ばれる領域を有する。本研究では、プローブタンパク質が SCF 複合体に取り込まれ、ユビキチン化されることがないように、N-末端領域の約 210 アミノ酸を決しつさせた、F-βTrCP1 を用いた。

Bi-FC の GFP 蛍光タンパク質としては MBL 社より発売の monomeric Kusabira-Green (mKG) をベースとした、CoralHue[®] Fluoro-chase Kit を利用した。本キットでは、mKG の N-末端側 170 アミノ酸断片 (mKGN) と C-末端側 52 アミノ酸断片 (mKGC) を使用する。

まず、mKGN の下流に FLAG タグを付加した Cdc25B-N175 断片を融合させた mKGN-FLAG-Cdc25B/N175 プラスミドと、F-βTrCP1 の下流に mKGC 融合させた F-βTrCP1-mKGC プラスミドを作成した。さらに両者を、GGG 配列を 5 個タンデムに結合させた断片をはさんで、N-末端側に mKGN-FLAG-Cdc25B/N175 を、C-末端側に F-βTrCP1-mKGC を融合させ、mKGN-FLAG-Cdc25B/N175-(GGG)₅-F-βTrCP1-mKGC がひとつのペプチドとして発現されるようなプローブプラスミドを作成した。

2.2 細胞への遺伝子導入

細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine2000 を用いた⁸⁾。また、テトラサイクリン誘導発現細胞株は、Tet-on プラ

スミドを安定的に発現する HeLa 細胞に、上記のプローブ遺伝子をテトラサイクリン応答性配列の下流に配したプラスミド DNA を導入して得た。すなわち、プラスミド上に存在するプラスミドサイレン耐性遺伝子を利用し、テトラサイクリン誘導性安定発現細胞株を分離した。

2.3 顕微鏡観察

JNK 及び化学物質処理細胞の蛍光は、キーエンス社の BZ-9000 蛍光顕微鏡を用いて観察した。

2.4 Flow Cytometry

テトラサイクリン誘導発現細胞を 1 μg/mL のドキシサイクリンで 24 時間処理しプローブタンパク質を発現させたのち、検定化学物質をさらに 24 時間処理した。その後、細胞を回収し、Flow cytometer (Becton-Dickinson, FACSCalibur) を用いて mKG に由来する緑色蛍光を計測した。

3. 結果

3.1 プローブ遺伝子と JNK の細胞への一過的発現による BiFC の検出

図 2 に、本研究の原理となる細胞ストレスにより活性化された p38 や JNK によりリン酸化された Cdc25B の SCF^{βTrCP} によるユビキチン化の模式図を示した。即ち、細胞ストレスによりストレス応答性の JNK や p38 が活性化され、Cdc25B の S101 と S103 がリン酸化される。そのリン酸化が引き金となり、ユビキチン化酵素である SCF^{βTrCP} 複合体の βTrCP タンパク質が Cdc25B の S101/S103 付近に結合し、Cdc25B がポリユビキチン化され、プロテアソームで分解される。

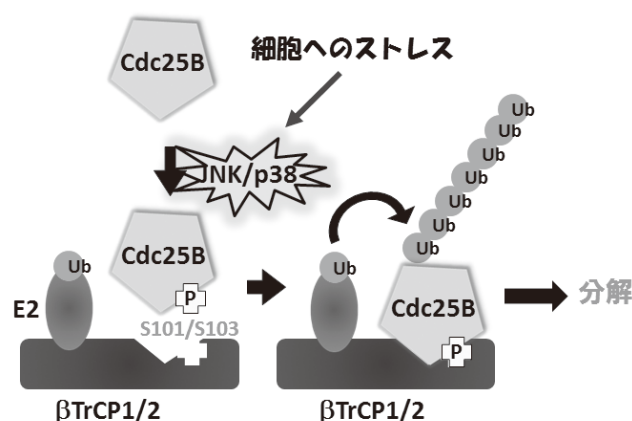


図 2. 細胞周期制御因子 Cdc25B が細胞へのストレスにより分解される機構

細胞がストレスを受けると JNK や p38 のストレス応答性 MAP キナーゼが活性化される。これらのキナーゼにより、Cdc25B の 101 番目と 103 番目のセリン残基がリン酸化されると、ユビキチン化酵素の SCF^{βTrCP} との相互作用が生じ Cdc25B がポリユビキチン化され、プロテアソームで分解される。

図3にはこれら一連の反応過程で起きるCdc25Bと β TrCPのストレス誘発性相互作用を利用したBiFCの模式図を示した。2. 実験の項に記載されているように、mKGN-Cdc25B/N175断片- β TrCP断片-mKGCというプローブペプチドを細胞で発現させる。この状態では、mKGNとmKGCは遠くの位置にあるため蛍光を発することはない。ストレスによりJNKが活性化されCdc25BのS101/103がリン酸化されると、Cdc25Bと β TrCP間に相互作用が起きるため、結果的にmKGNとmKGCが近接し、これらは自発的に再構成される。再構成されたmKGは再び蛍光を発するため、プローブ導入細胞が緑色蛍光を発することになる。

まずモデルシステムとして、プローブ遺伝子をCos7細胞へ一過的に発現させる際に、同時にJNK（実験では赤色蛍光を発するmCherry遺伝子にJNK1融合させたものを使用）とその活性化遺伝子であるMKK7を導入し、BiFCが生じるか否かについて検討した。その結果、図4に示されるように、JNK1発現細胞特異的にBiFC、即ち緑色蛍光が観察され、プローブの有効性が確認された。

3.2 プローブ遺伝子を一過的に発現する細胞のNaCl処理によるBiFCの検出

JNKを用いたモデルシステムによりBiFCプローブの蛍光出現が確認されたため、次に薬剤処理によるBiFCプローブの応答を検討した。化学物質としては、JNKやp38の活性化を誘導することが知られており、私たちの研究でもCdc25B分解効果が確認されているアニソマイシン¹⁾と、胃がんの発がんプロモーターとして知られるNaClを用いた^{9,10)}。Cos7細胞へBiFCプローブを一過的に導入24時間後に、アニソマイシンの場合は50 ng/mLとなるように培地へ添加した。NaClの場合は、培地中のNaCl濃度を約

150 mMとし、その最終濃度が250 mMになるように添加した。そして、薬物処理24時間後に蛍光顕微鏡にてBiFC出現の有無を検討した。その結果、図5に示されるように、アニソマイシン（図ではAnisomycinと表記されている）、NaClの場合ともBiFCが観察された。また、プローブ導入細胞としてHeLa細胞を使用した場合でも同様の結果が得られたため、本プローブの一過的発現により非遺伝毒性化学物質誘発性の、Cdc25B分解を誘発する細胞ストレスが検出できるものと判断した。

3.3 プローブ遺伝子をテトラサイクリンにより誘導的に発現できる細胞のNaCl処理によるBiFCの検出とFACS利用した解析

これまでの研究でBiFCプローブの有効性が確認されたため、次に非遺伝毒性の強さの定量化を試みた。定量化には、BiFCによって生じる緑色蛍光をFlow cytometryにより検出することを計画した。細胞への一過的発現ではプローブ導入細胞数及び一細胞あたりに導入されるプローブ数にばらつきが生じるため、実験ごとに一定の数値が得られない懸念がある。そこで、プローブを安定的に発現する細胞の樹立を行った。

Cdc25B断片及び β TrCP断片の恒常的発現は、細胞に対し毒性を示すことが予想されたため、誘導的に発現できる方法を用いた。使用したのはテトラサイクリン誘導発現系であり^{9,10)}、テトラサイクリン誘導体であり安定なドキシサイクリン添加によりプローブ発現が誘導される。

分離された細胞を用いて250 mM NaClによるBiFCを蛍光顕微鏡にて観察した。細胞に5 μ g/mLのドキシサイクリンを添加し24時間後に培地の最終NaCl濃度が250 mMとなるようにNaClを添加し、24時間後にBiFCを観察した。一過的発現ほど強いシグナルではないが蛍光が観察さ

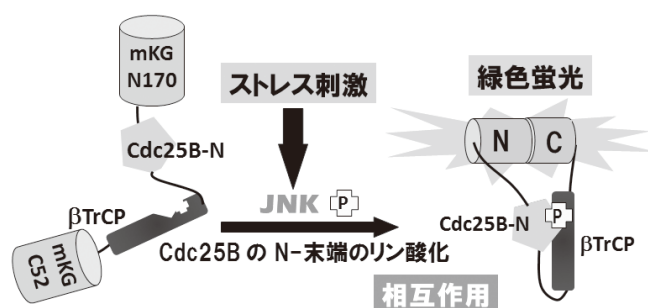


図3 Cdc25B- β TrCPの相互作用を利用したBiFC
Cdc25BのN-末端断片と β TrCPのC-末端断片を、図のように緑色蛍光タンパク質断片mKGN170とmKGC52との融合タンパク質として細胞で発現させる。その細胞へストレスが加わるとJNKがリン酸化され β TrCPとの相互作用を介して、mKG断片の再構成が起きる結果、細胞から緑色蛍光が発せられる。

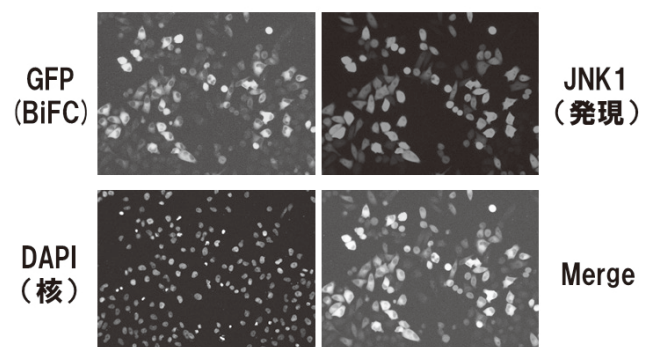


図4 細胞へのBiFCプローブの一過性発現によるJNK1誘導性の緑色蛍光の出現

Cos7細胞へプローブとともにCdc25Bをリン酸化するJNK1およびその活性化酵素遺伝子のMKK7を同時に一過的に発現させ、BiFC効果を観察した。ほとんどのJNK発現細胞において緑色蛍光が検出されBiFCが生じていることがわかる。

れた。また、一過的発現の場合とは異なり、顕微鏡の視野中にあるすべての細胞で蛍光が観察された。次に、Flow cytometry 解析を行った。その結果が図 6 に示されている。この実験では、250 mM NaCl 存在下、12 時間、24 時間、48 時間後に細胞を回収し、Flow cytometry を行った。ドキサイクリン (図では Dox と表示されている) の添加前にはシグナルはほとんど検出されないが、ドキサイクリン添加によりプローブを発現させただけで強いシグナルが出現することがわかる。これは、プローブ分子間の非特異的な相互作用に由来すると考えられる (考察においてもう一度述べる)。一方、NaCl 処理により明らかなシグナルの増強が見られる。また NaCl 処理によるシグナルは、NaCl 処理時間とともに増加傾向にあることがわかり、Flow cytometry により BiFC の検出が可能であることが判明した。

4. 考 察

化学物質の遺伝毒性を短期間にかつ簡便に検出する方法は樹立されており、突然変異原性を指標にした発がん性評

価が行われている。一方、突然変異原性を示さないにもかかわらず、動物実験において長期かつ高用量投与により発がん性が検出される、非遺伝毒性化学発がん物質が数多く存在する。非遺伝毒性化学発がん物質は、細胞内標的がひとつではなく、決まった生物活性を示すわけではないために、発がん性評価が困難であり、簡便な短期検定法は存在しないのが現状である。

発がんは必ずゲノム異常を伴う。ゲノムを直接の標的としない非遺伝毒性発がん物質 (刺激) においてもそれは例外ではないと考えられる。一方、ゲノム異常の初期過程においては、細胞周期の亢進や停止が検出される。遺伝毒性刺激による細胞周期チェックポイントでは、細胞周期の一時的な進行停止が誘発される。非遺伝毒性ストレスにおいては、ゲノム以外の細胞構成成分に損傷が誘発されと考えられるが、このような非ゲノム性の損傷は細胞機能の低下を誘発し、一時的な細胞周期進行遅延の原因となる可能性がある。

私達は、まさに細胞周期制御因子である Cdc25A と

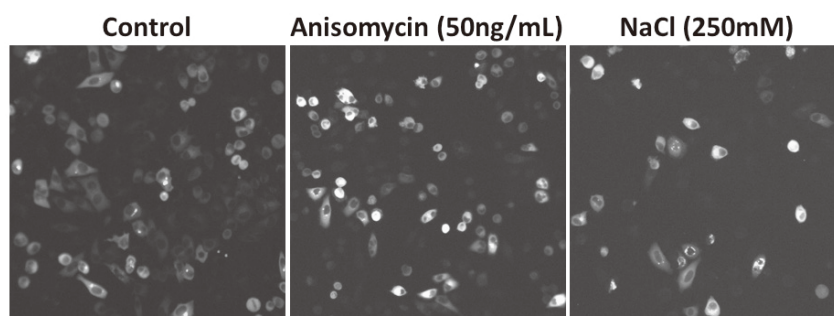


図 5 BiFC プローブの一過性発現による非遺伝毒性化学物質誘発性の緑色蛍光の出現

図 4 と同様に、Cos7 細胞へ BiFC プローブを一過的に導入し、24 時間後にそれぞれの化学物質を加えた。さらに 24 時間後に細胞の蛍光観察を行った。

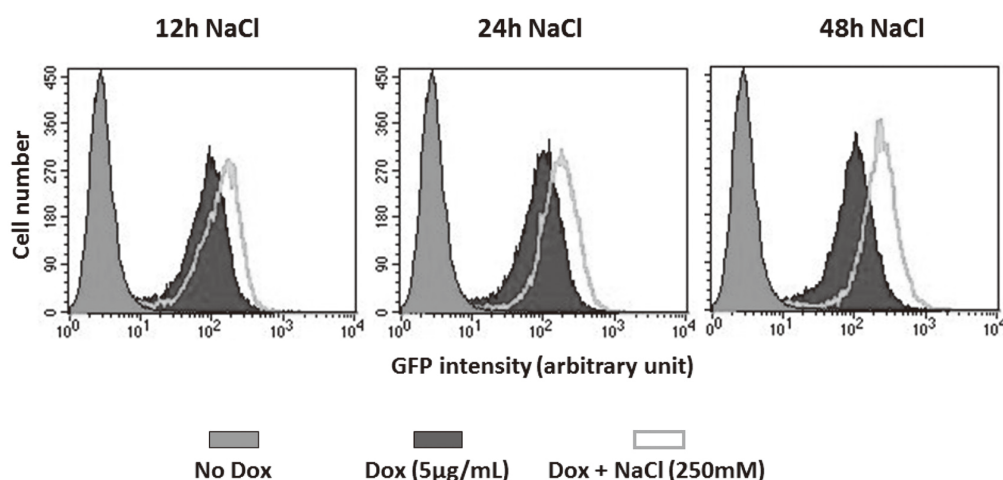


図 6 BiFC プローブ誘導発現細胞を用いた Flow cytometry による緑色蛍光の検出

BiFC 誘導発現 HeLa 細胞を 5μg/ml のドキソルビシン (Dox) で 24 時間処理し、BiFC プローブの発現を誘導した後、培地の NaCl 濃度が 250 mM になるように加え、さらに細胞を培養した。それぞれの NaCl 処理時間で細胞を回収し Flow cytometry (FACS) 解析を行った。

Cdc25Bが非ゲノム損傷性のストレスにより分解され、そのようなストレスは細胞周期遅延を誘発することを明らかにした。従って、このようなCdc25AやCdc25B分解を誘発するストレスは、非遺伝毒性発がん刺激である可能性がある。

本研究は、このようなコンセプトの基に、非遺伝毒性発がん刺激を検出する方法の構築を目指したものである。特に、これまでの研究成果としてCdc25Bが非遺伝毒性刺激特異的にSCF^{βTrCP}によりユビキチン化を受けたのち分解されることがわかっていたために、Cdc25B分解システムを利用した方法を確立した。

非遺伝毒性ストレス検出のために、より簡便な方法としてタンパク質相互作用を利用したBiFC法を応用した。本方法では、ストレス依存的なJNK/p38の活性化によりCdc25BとSCF^{βTrCP}複合体のβTrCP分子間で相互作用が起きることを利用し、蛍光タンパク質断片を再会合させる。再会合した断片は自発的に再構成され、蛍光が出現する。

私たちの結果では、一過性発現系ではストレス刺激に伴う再会合の結果、強い蛍光シグナルが検出されたことから、基本原理としては完成されたものと考ええる。一方、誘導発現性安定細胞株を用いた実験では、プローブタンパク質の発現に伴い、かなり強い蛍光の出現が認められた。この細胞では、ストレス刺激に伴い蛍光の増強が認められたため、ストレス検出系としては利用可能であると考えられるが、今後より実用的なシステムにしていくためにはプローブの発現に伴う蛍光の抑制が課題である。BiFCではタンパク質分子間の非特異的な相互作用はあまり強くないと考えられてきたが、本研究では、プローブ発現自体で高い相互作用が認められた。この蛍光は、βTrCPとの相互作用が極めて低い突然変異型のCdc25B断片を使用した場合にも認められたため、BiFC系が有する内在的な欠陥である可能性がある。今後の検討が必要である。

本研究でFlow cytometryを利用した蛍光検出が可能であることが判明した。Flow cytometryにより蛍光強度の定量化が可能になることから、化学物質の非遺伝毒性ストレスの強度を定量化でき、ひいては発がん強度の定量化も可能となることも期待される。プローブ発現によりバックグラウンド上昇を抑制することができれば、非遺伝毒性発がん物質の短期検出法として有用であることが期待できる。

5. 総 括

皮膚は、化粧品をはじめとする多くの化学物質に恒常的に暴露されている。化学物質による皮膚ストレスは皮膚老化や皮膚がんの原因となる。皮膚ストレスを誘発する化学物質は必ずしも突然変異を誘発するわけではない。皮膚細胞の細胞分裂を抑制するような化学物質を簡便かつ迅速に検出するシステムの確立が必要である。本研究で開発した

方法は、そのような皮膚ストレスを誘発する非遺伝毒性化学物質を検出する方法となりうることが示された。今後は、本方法の改良及びこの科学的原理を応用した方法の開発により、皮膚に対し危険な化学物質を排除し、安全性の高い化粧品や添加物が開発されることが期待される。

(引用文献)

- 1) Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, et al.: Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinases c-Jun-NH2-Terminal Kinase and p38 Targets Cdc25B for Degradation. *Cancer Res.* 69, 6438-6444, 2009.
- 2) Busino L, Donzelli M, Chiesa M, et al.: Degradation of Cdc25A by β-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* 426, 87-91, 2003.
- 3) Jin J, Shirogane T, Xu L, et al.: SCF^{β-TrCP} links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev.* 17, 3062-3074, 2003.
- 4) Latres E, Chiaur D S, Pagano M.: The human F box protein β-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of β-catenin. *Oncogene* 18, 849-854, 1999.
- 5) Winston J T, Strack P, Beer-Romero P, et al.: The SCF^{β-TrCP}-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* 13, 270-283, 1999.
- 6) Hu CD, Chenenov Y, Kerppola TK.: Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* 9, 789-798, 2002.
- 7) Hu CD, Kerppola TK.: Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotech.* 21, 539-545, 2003.
- 8) Uchida S, Kuma A, Ohtsubo M, et al.: Binding of 14-3-3β but not 14-3-3σ controls the cytoplasmic localisation of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localisation of CDC25B. *J. Cell Sci.* 117, 3011-3020, 2004.
- 9) Ohgaki H, Kato T, Morino K, et al.: Study of the promoting effect of sodium chloride on gastric carcinogenesis by N-methyl-N'-nitrosoguanidine in inbred Wister rats. *Gann* 75, 1053-1057, 1984.
- 10) Takahashi M, Nishikawa A, Furukawa F, et al.: *Carcinogenesis* 15, 1429-1432, 1994.