

# 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

## 目的・背景

細胞は、環境中の化学物質などからのストレスに常にさらされている。これらのうち、細胞のゲノムに影響を及ぼすものは皮膚老化やがん化を引き起こす。ゲノムに直接的な損傷を引き起こすストレス刺激は、結果的に突然変異を誘発しがんや老化の原因となるが、ゲノムに直接的な損傷を誘発しないが、細胞がん化を引き起こすストレスも存在する。これらは、多様な細胞内小器官の機能低下を引き起こす結果、細胞のホメオスタシスがかく乱され、細胞ががん化すると考えられる。

細胞がん化は、細胞周期進行異常とそれに続くゲノム不安定性が伴う。即ち、ゲノムに対する直接的な損傷の有無に関わらず、細胞周期進行異常を誘発する細胞ストレスは、最終的にゲノム不安定性を誘発する可能性がある。私達は、細胞中の細胞周期制御遺伝子の Cdc25A と Cdc25B が、ゲノムに直接的な損傷を誘発しない化学物質処理で分解されることを発見した。このうち、Cdc25B の分解誘発はこれまで報告がなかったため、その分子機構を詳細に解析した結果、①ストレス応答性 MAP キナーゼの JNK が Cdc25B をリン酸化し、②その部位へユビキチン化酵素 SCF<sup>·TrCP</sup> が結合し、③Cdc25B のユビキチン化とそれに続く分解が引き起こされることが判明した。

本研究では、この一連の生化学反応のうち、Cdc25B のリン酸化に伴う SCF<sup>·TrCP</sup> の結合をバイオイメージングにより検出し、発がん性ストレスを迅速かつ簡便に検出するシステムの開発を行った。

## 結果・考察

本研究では、バイオイメージング法として、緑色蛍光タンパク質 GFP を 2 分割し、それら断片の再会合に伴う緑色蛍光の回復を利用した Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法を用いた。ここでは、Cdc25B と SCF<sup>·TrCP</sup> 複合体の構成因子である<sup>·</sup>TrCP 間でストレス誘発性リン酸化依存的な相互作用が生じ、緑色蛍光タンパク質断片の再会合が促進されることが期待される。即ち、この方法により細胞がストレスを受け、Cdc25B 分解反応が進行する過程が緑色蛍光の出現としてバイオイメージングにより検出される。

Cdc25B の・TrCP との結合に関わるリン酸化部位は Cdc25B の N-末端側 175 アミノ酸を含む断片にあるため、これを GFP の N-末端と融合させ、・TrCP1 の N-末端側の複合体結合ドメインを欠損させた断片を GFP の C-末端ドメインと結合させ、さらにそれらを 1 本のペプチドとして細胞内で発現される分子をプローブとして作成した。

そのプローブを細胞で一過的に発現させ、同時に・TrCP のリクルートに関わる Cdc25B のリン酸化を行う JNK1 を発現させたところ、BiFC による緑色蛍光が検出された。その蛍光は、JNK1 のキナーゼ活性欠損型の変異体の発現では検出されなかったことから、JNK1 特異的であることが判明した。次に、実際の化学物質によるストレスにより BiFC が検出されるか否かについて検討した。プローブ遺伝子を一過的に細胞へ導入し、プローブタンパク質が十分に発現する 24 時間後に JNK や p38 の活性化を誘導するアニソマイシンや NaCl (それぞれ、50 ng/mL と培地中の NaCl 濃度として 250 mM) を添加したところ、24 時間後に両刺激により BiFC が検出されることがわかり、本システムの有効性が証明された。

次に、プローブ遺伝子を条件的に発現できる「誘導発現細胞株」を樹立した。この系では、テトラサイクリンの培地への添加によりプローブ遺伝子を発現させ、BiFC の検定に利用する。テトラサイクリンの 24 時間処理によりプローブタンパク質の発現を誘導し、NaCl を 24 時間処理した。その結果、蛍光顕微鏡かで弱いながら BiFC が観察された。さらに、細胞を FACS 解析したところ蛍光強度の高い細胞集団が出現したことから、より定量性の高い FACS への応用が可能であることが判明した。さらに FACS を用いて、非遺伝毒性化学発がん性が証明されているかんきつ類の防かび剤オルトフェニルフェノール (OPP) と、発がん性が明確でない酸化防止剤 BHT について解析したところ、OPP は陽性、BHT は陰性という結果となった。

以上のことから、本研究で開発した Cdc25B と・TrCP のストレス誘導性相互作用を、BiFC ベースバイオイメージングにより検出することが可能となった。今後は、より実用的な方法とするために、感度上昇やノイズの低下等の工夫が必要であるが、簡便かつ迅速に細胞ストレスを検出する方法の原理が確立された。