

研究題目:

The role of Cullin5 in cell migration and invasion

浅井 麗伊

生命機能研究科 生命機能専攻 博士一貫課程 3年

派遣先:

Fred Hutchinson Cancer Research Center

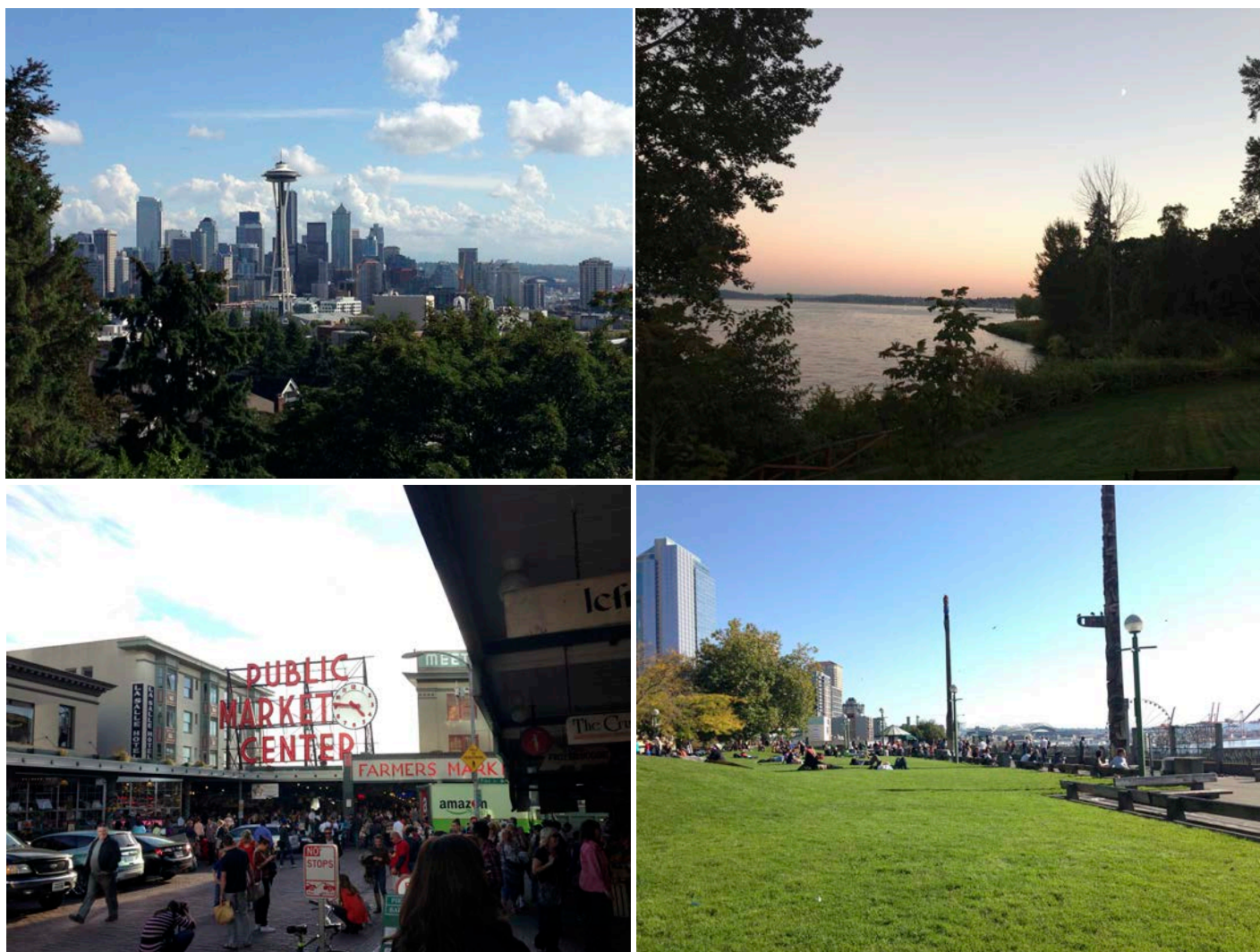
メッセージ:

2013年9月6日から2013年12月1日までの約3ヶ月間、アメリカ合衆国ワシントン州シアトルにある Fred Hutchinson Cancer Research Center にて Visiting student として研究活動を行いました。ここでは、その研究内容とシアトルでの生活について報告します。

はじめに

大阪大学ヒューマウェアイノベーション海外インターンシッププログラム(試行)により、2013年9月6日から2013年12月1日までの約3ヶ月間、ワシントン州シアトルにある Fred Hutchinson Cancer Research Center において研究活動に従事する機会を頂きました。ここでは、その研究内容や現地での生活について報告します。

シアトル



イチロー選手が活躍されていたマリナーズの本拠地として、みなさんご存知ではないでしょうか。カナダとの国境も近い、アメリカ北西部に位置しています。ボーイングや Microsoft、amazon などの有名企業がひしめき合う IT・ハイテク産業都市としても有名です。スターバックス発祥の地でもあり、コーヒー好きが多く、街中でも研究所内でも多くの方がコーヒーを片手に歩いていました。"エメラルド・シティ"とも呼ばれるシアトルは、海や湖、レーニア山脈など豊かな自然に囲まれており、とても穏やかな時間が流れているように感じました。

派遣先：Fred Hutchinson Cancer Research Center



シアトルダウンタウン近くのユニオン湖に面している非営利の研究所です。がん研究所という名前ではありますが、がんだけにとどまらず、分子生物学や生化学に関して、基礎から応用まで幅広く研究が行われています。これまでにノーベル賞受賞者を3名輩出しており、その内のお一人、Linda Buck博士とは何度かすれ違うことができました。国際色豊かな研究所で、アメリカ国外出身の研究者・学生が数多く在籍しています。（お世話にな

った Cooper Lab でも、アメリカ人は大学院生1人のみでした。）そのためか、1人で飛び込んでも不思議と疎外感を感じることはありませんでした。研究所内のカフェではスターバックスのコーヒーが提供され、広々としたテラスでコーヒーを片手にくつろぐ人を多く見かけました。また、毎週金曜日の夕方5時から Happy Hour が設けられ、ビールやスナックが無料で振舞われるなか、PI やポスドク、学生などが身分関係なくディスカッションに花を咲かせていました。



ラボから眺めるレイク・ユニオン



Happy Hour の様子

研究内容

がん原遺伝子産物 **c-Src** は、様々なヒトのがんにおいて発現・活性が亢進しており、浸潤や転移などのがん悪性化形質の獲得に密接に関わっています。しかし、**c-Src** によるがん悪性化形質獲得のメカニズムや、**c-Src** の発現および活性の制御機構などの詳細は、未だ不明のままです。私は日本において、**miRNA** を介した **c-Src** によるがん悪性化の制御機構について研究を行っていましたが、今回の留学では、**Src** 研究の大御所である **Jonathan Cooper** 先生のもと、活性型 **Src** の発現を制御する **E3** ユビキチン化酵素 **Cullin5** の機能解析を行うこととなりました。

通常、**Src** はネガティブレギュレーターである **Csk** や他のホスファターゼによって不活化されており、細胞の異常な増殖、運動、浸潤等が起こらないよう保たれています。**Cooper Lab** では、これらの制御のほかに、**E3** ユビキチン化酵素である **Cullin5** が、活性型 **Src** の発現を制御することを見出しました。これまでに、ヒト正常乳腺上皮細胞 **MCF10A** において **Cullin5** をノックダウンすると、活性型 **Src** の発現が増加し、細胞運動能が促進され、ラメリポディアおよびメンブレンラッフルが増大することがわかっています。また、**Cullin5** は **c-Src** の基質のひとつである **Cas** を分解することにより、メンブレンラッフルの形成を制御することもわかっています。しかし、**Cullin5** が **MCF10A** 以外の細胞においても、それらの蛋白質や細胞運動能を制御しているかは明らかになっていませんでした。

この問題を明らかにするため、私はヒト子宮頸癌由来 **HeLa** 細胞において、**siRNA** を用いて **Cullin5** をノックダウンし、細胞運動能への影響を観察しました。細胞を引っ掻き、その傷を埋めようとする細胞の運動を観察するスクラッチアッセイを行ったところ、**Cullin5** をノックダウンした細胞はコントロール細胞よりも細胞運動能が増加することがわかりました。また、ウェスタンブロッティングによる解析から、**Cullin5** ノックダウン細胞では **MCF10A** と同様に、コントロールと比較してトータル **Src**、活性型 **Src(pY418)**、**Cas** の発現が増加していました。これらの結果から、**Cullin5** は **HeLa** 細胞においても **Src** および **Cas** の発現を制御し、細胞運動能を抑制することが明らかとなりました。

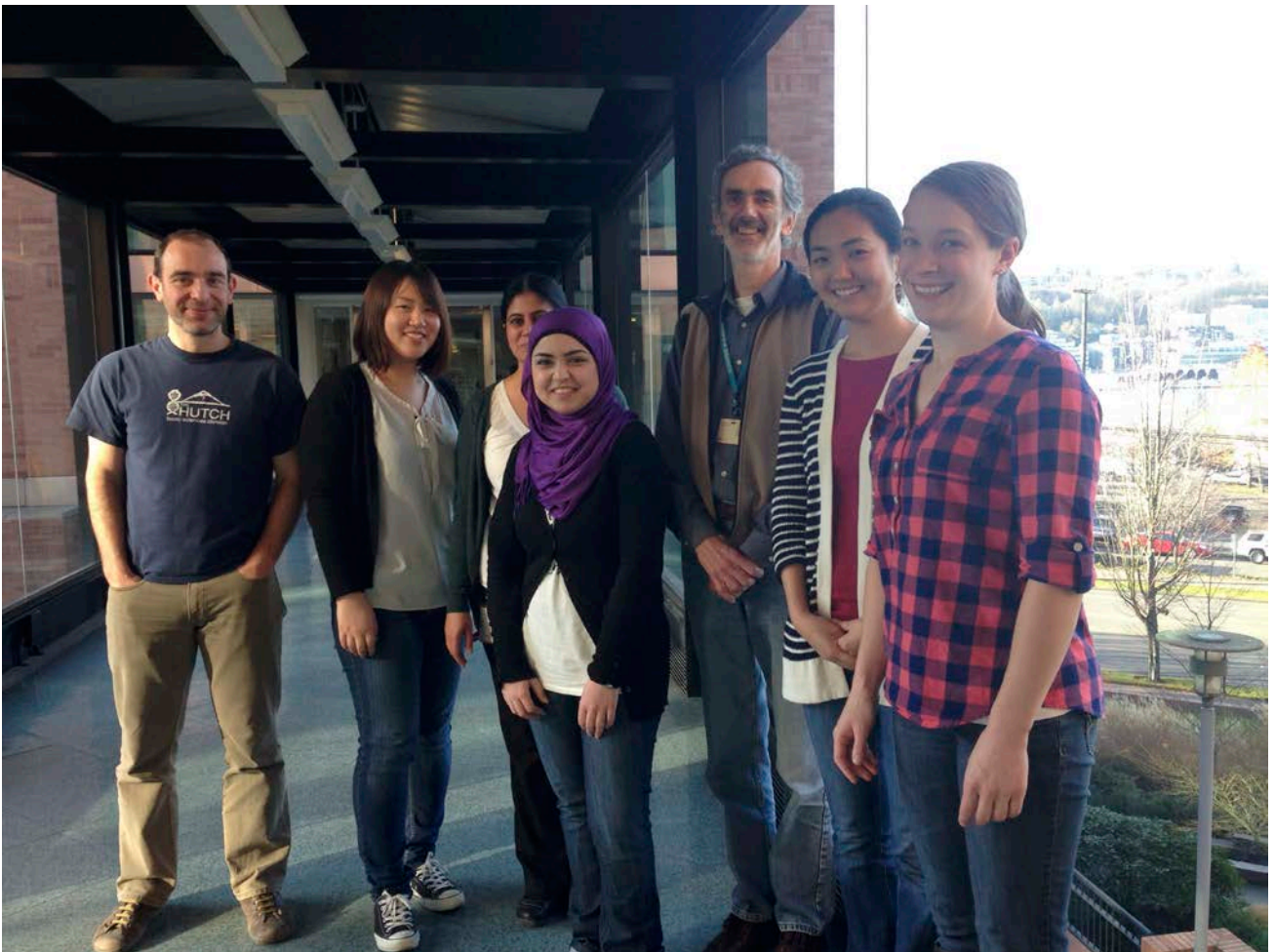
Cullin5 のアダプター蛋白質である **SOCS** ファミリーは、**SH2** ドメインなどの基質結合部位をもっています。**Cooper Lab** では **MCF10A** 細胞において、**SH2** ドメインをもつ **SOCS** ファミリー蛋白質すべて(**SOCS2,4,5,6**)をノックダウンすると、**Cullin5** をノックダウンした場合と同程度まで細胞運動が促進されることを見出しました。しかし、いずれの **SOCS** 蛋白質が細胞運動能の制御に重要であるかはわかっていません。これまでのスクラッチアッセイでは、細胞を直接チップで引っ掻くため、細胞にダメージが入る、傷ごとにサイズが異なるなどの問題があり、実験条件を完全にそろえることが難しく、細胞運動能の制御に重要な **SOCS** 蛋白質をスクリーニングすることができませんでした。そこで私は、**stencil** という器具を使い、細胞を引っ掻かずに細胞運動能を検証する手法を開発することにしました。シリコン製の **stencil** には 2 つの **well** があり、そこに細胞を播種する

ことで、細胞間に 100 μ m あるいは 400 μ m の間隔が空くようになっています。私は MCF10A 細胞を用いて、100 μ m あるいは 400 μ m のどちらの間隔が良いか、細胞数、ディッシュコートの有無、培養時間など、様々な条件検討を行いました。その後、Cullin5 が stencil アッセイにおいても、細胞運動能を抑制するかを検証しました。結果、shRNA を用いて Cullin5 をノックダウンした MCF10A 細胞では、コントロール細胞に比べて 2.5 倍ほど細胞運動能が促進されることを見出しました。また、shCullin5 を導入した細胞では、ラメリポディアおよびメンブレンラフリングの増大が見られました。この結果から、Cullin5 は細胞にダメージがない状況においても、細胞運動能およびラメリポディア、メンブレンラフリングの形成を抑制していることが示唆されました。次に、スクラッチアッセイの時と同様に、siRNA を用いて SOCS ファミリー蛋白質すべてをノックダウンした場合に、Cullin5 をノックダウンした場合と同程度まで細胞運動能が促進されるかを検証しました。その結果、shCullin5 を導入した細胞では、stencil アッセイにおいてもコントロールに比べて細胞運動能が増加していたにも関わらず、siCullin5、および siSOCSs を導入した細胞では細胞運動能に変化は見られませんでした。これについては、2つの理由が考えられました。1 つは、shRNA と siRNA の違い、もう 1 つは細胞ダメージの有無です。shRNA を用いたある遺伝子のノックダウンでは、薬剤耐性によるセレクションを行うため、用いる細胞集団は全てノックダウンされた状態と考えられます。しかし、siRNA を用いたノックダウンでは、薬剤耐性によるセレクションを行わないため、ウエスタンブロッティングによりノックダウンが行われていることを確認できても、細胞集団のなかにはきちんとノックダウンされていない細胞も存在すると考えられます。細胞運動は、細胞がまとまってシート状に動くため、このノックダウン効率の差が何かしら影響していることが推察されます。実際、Cooper Lab における以前のデータを見ても、shCullin5 によるノックダウンにおいてはコントロールに比べて 6 倍程度、細胞運動能が増加するのに対し、siCullin5 によるノックダウンにおいては 2 倍程度の増加にとどまっています。stencil アッセイでは、shCullin5 によるノックダウンにおいても 2.5 倍程度しか細胞運動能が増加していなかったことから、siRNA によるノックダウンの効果がより得られにくかったと考えられます。また、stencil アッセイでは細胞のダメージがないことから、細胞運動促進のための何らかの因子やシグナルが十分ではなかった可能性も考えられます。以上のような結果から、SOCS 蛋白質スクリーニングに stencil アッセイを用いるのは適当ではない、との結論になりました。

がんの進行に伴い、がん細胞は原発巣から抜け出し、基底膜を破って浸潤し、血管を通過して他の臓器へと転移します。この過程において、細胞運動は重要なステップの 1 つです。これまでに、Cullin5 が細胞運動能を抑制することがわかっていますが、浸潤能への関与については一切明らかになっていませんでした。そこで、Cullin5 の浸潤能における機能を明らかにするため、マトリゲルを用いた浸潤アッセイを行うことにしました。MCF10A 細胞を用いて、マトリゲルの濃度、培養時間、細胞誘因用ミディアムなどの条件検討を行った後、コントロールの細胞と shCullin5 を導入し Cullin5 をノックダウンした細胞で浸潤能の違いを検証しました。結果、コントロールの細胞はほと

んど浸潤しなかったのに対し、Cullin5 をノックダウンした細胞では浸潤が見られました。この結果から、Cullin5 は浸潤能を抑制していることが明らかとなりました。

以上のように、3ヶ月の研究を通して Cullin5 が HeLa 細胞においても細胞運動能を制御すること、新規細胞運動能の評価法(stencil アッセイ)の開発、Cullin5 が浸潤能を抑制すること、という3つの成果を得ました。条件検討を慎重に行っていたこともあり、詳細なメカニズム解析まで行うことはできなかったのですが、効率よく実験を行うための計画の立て方、ディスカッションの仕方、質問の仕方、そしてそれらをためらわないことなど、多くのことを学ぶことができました。日本でもこれらのことを積極的に行い、研究に活かして行きたいと思います。



Cooper Lab のみなさんと

シアトルでの生活

シアトルでの生活は、本当に快適でした。治安も良く、気を付けてさえいれば、身の危険を感じることもほとんどありませんでした。アメリカというとファストフードやステーキのイメージが強く、渡航前は食事が合うか少し不安だったのですが、自然に恵まれているワシントン州は野菜・果物・魚介類が豊富で、いずれも美味しいものばかりでした。また、シアトルには日系スーパーの宇和島屋があり、そこでお米や緑茶、お味噌などの日本の食材を買うことができたのも助かりました。私はホームステイをしていたのですが、ホストファミリーにみそ汁やお好み焼きを作って振舞ったところ、大好評でした。

滞在中、Halloween と Thanksgiving という2つのイベントを体験することもできました。Halloween の際は、初めて Jack-o'-lantern(カボチャのランタン)づくりに挑戦したほか、仮装した近所の子供たちが"Trick or treat!"と言って訪ねてきてくれました。Thanksgiving には、ホストファミリーの友人達と一緒に、七面鳥の丸焼きやマッシュポテト、パンプキンパイなどを囲んで盛大にパーティを楽しみました。

おわりに

私が出会った人たちは、みなさん本当に素敵な人たちで、とても幸せな3ヶ月でした。まさに「人種のるつぼ」なアメリカで、様々な国から来た人々と、研究に関するだけでなく、それぞれの文化や背景についてなど、たくさん議論を交わすことができたのは本当に貴重な体験でした。いかに自分が世界のことについて無知であったかを思い知ることができたと同時に、今までは頭に入って来なかった世界史や世界情勢が一気にリアリティを増して感じられるようになりました。

また、もともと英語や海外に対する憧れが強かったのですが、今回の留学を通して、感情をストレートに、そして前向きに表現できる英語が改めて好きになりました。気軽に声をかけることができる Hi!、どんなに小さなことでも、ありがとうと感謝の気持ちをすぐに伝えることができる Thank you.、それ以外にも Have a nice day!や Congratulation!などなど。そしてそれらの言葉を惜しげもなく言ってくれる人達……。些細な一言に励まされる瞬間が多々ありました。

以上のように、人々とのつながりを多く感じることでできた3ヶ月でした。

最後に、お世話になった Jon Cooper 先生、研究面から生活面までサポートして下さった Cooper Lab のみなさん、たくさんの愛情とたくさんの人達との出会いの機会を作ってくださったホストファミリー、そしてこのような貴重な体験をさせて頂くことができた大阪大学ヒューマンウェアイノベーション海外インターンシッププログラムに感謝を申し上げます。