

細胞走化性の再構成に向けた PI3K の光操作と in vitro 再構成

松 林 英 明*

In vitro Reconstitution of PI(3,4,5)P3 Compass toward Chemotactic Artificial Cells

Hideaki MATSUBAYASHI*

Chemotaxis is a fundamental cellular behavior that relies on signal response and front–rear polarization. Reconstituting cell polarization in a defined in vitro system is essential for understanding its underlying molecular principles. In this study, we aimed to reconstruct the PI3K–PTEN phosphoinositide network responsible for polarity using giant unilamellar vesicles (GUVs). We applied the iLID/SspB optogenetic module to achieve light-dependent membrane recruitment of PI3K and inducible PI(3,4,5)P3 production in cultured cells. We also purified PH-domain probes and validated their lipid specificity in GUVs. PTEN activity was confirmed in vitro, whereas further optimization is required for PI3K purification. Ultimately, we seek to establish a light-controllable PI3K system in GUVs, reconstitute PI3K–PTEN-driven polarization in vitro, and elucidate its principles through a bottom-up approach.

1. 研究の背景と目的

細胞走化性は、細胞が外部の化学物質の濃度勾配に反応して方向性をもって移動する現象であり、免疫細胞による病原菌の追跡や、損傷治癒、神経回路網の形成など、多様な生命現象の基盤をなす細胞機能である。細胞走化性を分子レベルからボトムアップに構築できれば、濃度勾配に沿って生体内を自律的に探索し、診断や治療を行える人工デバイス（人工細胞）の創出も期待される。細胞走化性は、「シグナル応答」「極性化」「細胞運動」の3つの機能から構成される（図1）。我々はこれまでにアクチン細胞骨格の再構成を通じて「細胞運動」の再構成に関する成果を報告してきた(1,2)。本研究では、走化性反応の中核を担う「極性化」機構に着目し、in vitro（試験管内）再構成と、それを可能にするタンパク質光操作系の開発を目的とした。

走化性を示す多くの細胞では、イノシトールリン脂質である PI(4,5)P₂ と PI(3,4,5)P₃ が細胞膜上で前後方向に分布し、自律的な極性形成を実現している（図2）。細胞前方では、PI3KがPI(4,5)P₂をリン酸化してPI(3,4,5)P₃を生成する。一方、細胞後方では、PTENがPI(3,4,5)P₃を脱リン酸化してPI(4,5)P₂を生成する。両者が相補的にドメインを形成し、相互抑制的に作用することで膜上に安定した極性が生じると理解されている。本研究では、この反応ネットワークを細胞サイズの脂質膜小胞（GUV: Giant Unilamellar Vesicle）内で再構成することを目指し、関連因子の精製および光による外部制御系の構築を行った。

2. 培養細胞内での PI3K 光操作と最適化

まず、培養細胞を用いて PI3K による PI(3,4,5)P₃ 合成反応の光操作系を構築した。光操作には iLID/SspB 系を用いた（図3）。iLID は植物由来の光応答ドメインを含み、青色光刺激により構造変化を起こし、パートナー分子 SspB と結合する。

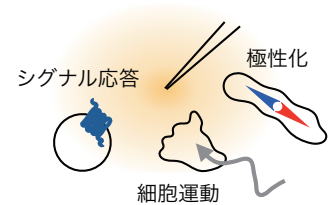


図1 走化性を構成する3つの要素。

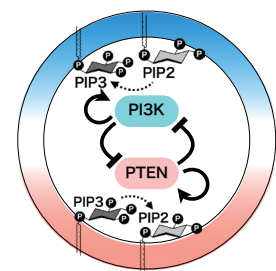


図2 PI3K-PTENによる細胞極性化。

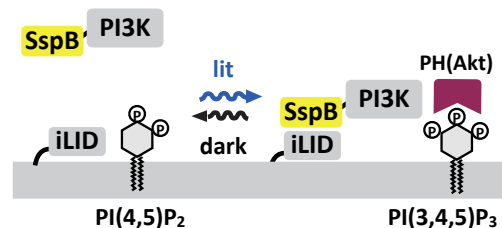


図3 iLID/SspBによるPI3Kの光操作とPI(3,4,5)P₃の生成。

ヒトクラス IA PI3K の制御サブユニット p85 由来の iSH2 ドメインは、触媒サブユニット p110 との結合に十分であることが報告されている (1)。この結合特性を利用し、SspB と融合した iSH2 (SspB-iSH2) を用いることで、青色光依存的に p110 を細胞膜へリクルートし、PI3K 活性を光操作可能とした。共焦点顕微鏡下で対象細胞に 458 nm の青色光を照射したところ、YFP-SspB-iSH2 が細胞膜へ移行することが確認された (図 4)。さらに、PI3K 活性化に伴う細胞膜の ruffling 形成や、PI(3,4,5)P3 産生を示す PH(Akt) の膜局在化も観察された。以上の結果から、iLID/SspB 系と青色光刺激を用いることで、PI3K 活性を光操作可能であることが示された。

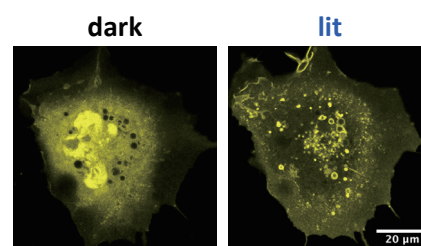


図 4 Cos7 細胞内での PI3K の光操作。

3. PI3K-PTEN 再構成系の構築

PI3K および PTEN によるイノシトールリン脂質変換反応を in vitro で再構成するため、関連因子の発現・精製および機能評価を行った。まず、PI(4,5)P2 および PI(3,4,5)P3 を可視化するプローブとして、PH(PLC δ) および PH(Akt) を大腸菌発現系から精製した。BL21(DE3) RP 株を用い、グルコースおよびラクトースを含む autoinduction 培地により発現誘導を行い、アフィニティタグを利用した精製法を確立した (図 4)。また、SNAP タンパク質を融合することによる蛍光標識とその確認を行った。

次に、PH ドメインの脂質結合特異性を検証するため、GUV 封入実験を行った。イノシトールリン脂質はクロロホルム：メタノール：水

(20 : 9 : 1) など特殊な溶媒条件を必要とするため、その物理化学的特性を考慮した GUV 作製法を検討・確立した。この方法により、PI(4,5)P2 あるいは PI(3,4,5)P3 を含む GUV を作製し内部にプローブを封入したところ、PH(PLC δ) は PI(4,5)P2 依存的に、PH(Akt) は PI(3,4,5)P3 依存的に膜へ特異的に結合することが確認された (図 5)。これにより、GUV 内で脂質組成が適切に再構成されていること、およびプローブの特異性が保持されていることが示された。

PTEN および PI3K については、バキュロウイルス-昆虫細胞 (Sf9) 発現系を用いて精製を行った。PTEN はアフィニティ精製法を確立し、GUV 内において PI(3,4,5)P3 を PI(4,5)P2 へ脱リン酸化する活性を確認した。一方、PI3K については可溶性発現条件を見出し、挿入した SpyTag を介して mCherry-SspB-SpyCatcher と共有結合形成が可能であることを確認した。しかしながら、精製過程で目的タンパク質の回収率が低下する問題が生じており、今後さらなる精製条件の最適化が必要である。

4. まとめ

本研究では、細胞極性化の中核を担う PI3K-PTEN 系の in vitro 再構成を目指し、関連因子の発現・精製および脂質可視化系の構築を行った。培養細胞において iLID/SspB を用いた PI3K 光操作系を確立し、その有効性を検証した。さらに、イノシトールリン脂質を含む GUV 作製法および PH ドメインによる特異的検出系を確立した。今後は、SpyTag-SpyCatcher を介して SspB を融合した PI3K を GUV 中で光操作する実験系を確立し、PI3K-PTEN による細胞極性化機構を in vitro で再構成すること、および、その原理をボトムアップに解明することを目指す。

REFERENCES

- 1) S. Razavi, *et al.*, *Sci. Adv.*, **10** (2024) eadk9731.
- 2) H. T. Matsubayashi, *et al.*, *BioRxiv.*, 2024, doi: 10.1101/2024.10.14.617543.
- 3) H. T. Matsubayashi, *et al.*, *Nat Commun.*, **15** (2024) 2612.

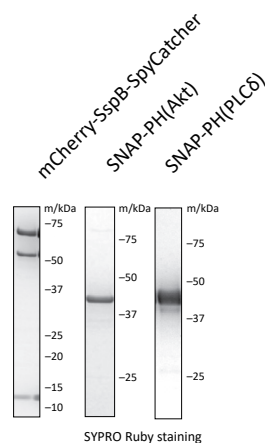


図 5 精製したタンパク質のゲル電気泳動結果 (SDS-PAGE)。

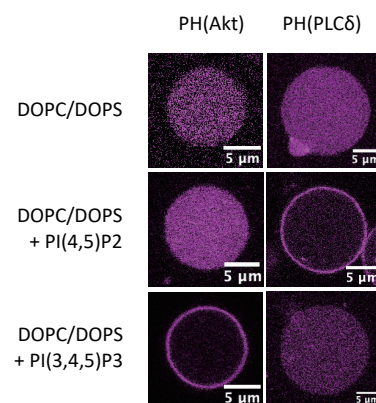


図 6 PH ドメインタンパク質によるイノシトールリン脂質への結合の評価。