

細胞形態と代謝を繋ぐシグナル軸の同定

大阪大学 蛋白質研究所 細胞システム研究室
岡田眞里子

1. はじめに

細胞内シグナル伝達系のアダプタータンパク質CRK遺伝子ファミリーは、*CRK*と*CRKL*の2つの最小ファミリーを構成し、それぞれが発生学上必須の遺伝子である。*CRK*と*CRKL*は細胞接着・増殖・分化・発生などのあらゆるシグナル伝達系に関与することから、この2つの遺伝子のダブルノックアウト細胞は細胞外情報の伝達能力を欠いた細胞系として近似することができる。申請者らは、細胞外と細胞内の情報のクロストークを理解するために、*Crk*および*Crkl*コンディショナルノックアウトマウス由来の線維芽細胞を用いて、転写物や代謝物などの網羅的計測を行い、これらのデータの情報統合解析を行なっている。これまでに、これらのデータの情報解析による細胞の機能予測とその検証実験により、*Crk/Crkl*のダブルノックアウト下において、細胞接着能の低下や細胞サイズの減少などの細胞形状変化、解糖系や核酸代謝の低下などを見出した。代謝活性や細胞サイズの現象は、細胞接着関連分子の発現により回復したことから、*Crk/Crkl*は、環境シグナルと代謝を細胞接着により結びつける重要な分子であることが示唆されている（図1）（論文準備中）。しかし、本遺伝子の代謝への寄与は明らかにされたものの、これまでの解析では、受容体などの具体的なシグナル経路の詳細を明らかにすることはできなかった。そこで、本研究では、この研究をさらに発展させるために、細胞形状をアウトプットとして、細胞形態の定量的自動化計測法と薬剤スクリーニングを組み合わせ、*Crk/Crkl*の代謝制御のシグナル経路を同定することを目的とした。

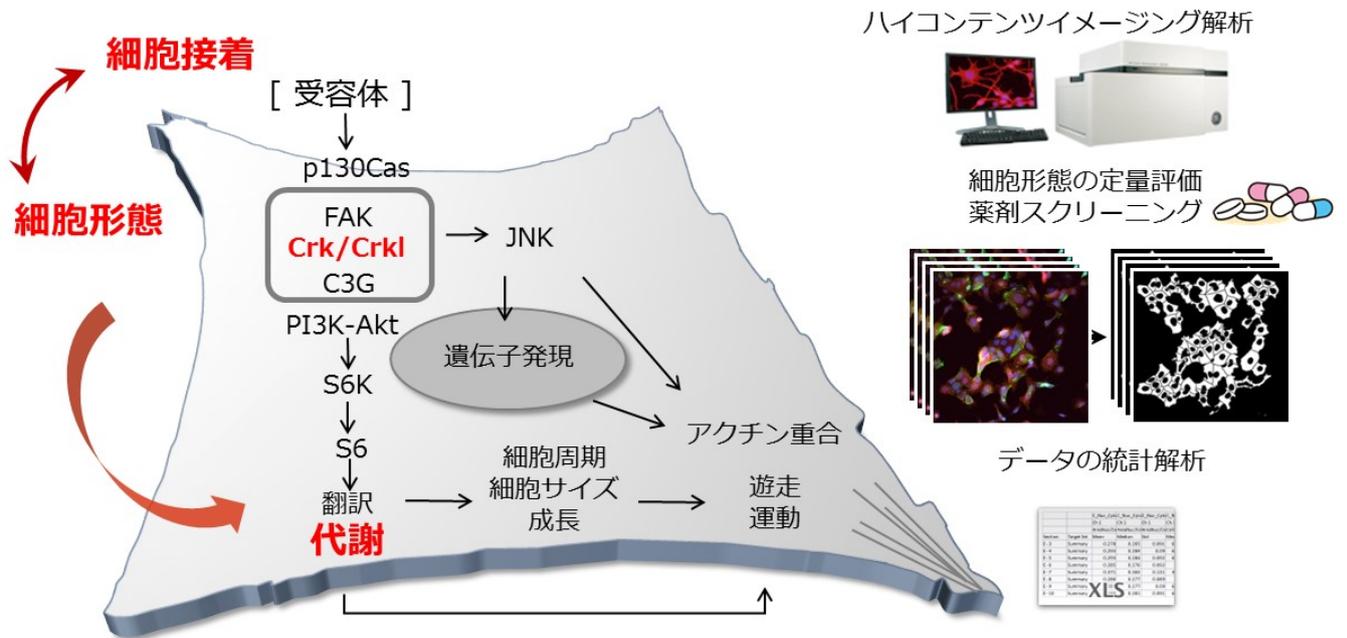


図1. 細胞のかたちを指標とした*Crk/Crkl*の細胞接着依存的な代謝制御経路の同定

2. 方法

本研究では、細胞形状の定量的解析手法の確立を行い、それにより得られた手法を用いて、薬剤スクリーニングを行った。

細胞形状については、ハイコンテンツイメージアナライザーにより、96ウェル上の対象細胞の個々の画像データを取得した。得られた細胞画像について、汎用画像解析ソフトCell Profilerを用いて、細胞形状パラメータ（真円率、細胞サイズ、核サイズ、細胞骨格の情報、輝度値など）を取得し、細胞ごとあるいはウェルごとの定量的解析を行った。Cell Profilerは細胞の幾何学近似を基礎としているので、このほかに、幾何学近似を介さずに細胞のかたち（輪郭）を直接数値化することができるフーリエ記述子法（Elliptic Fourier descriptors (EFDs)）（Iwata & Ukai, J. Heredity, 2002）を利用した。上記2つの細胞形態解析手法により得られた数値データに関して、主成分分析を行い、*Crk/Crk1*欠損下における細胞形状の違いを説明できるパラメータを同定した。

細胞に関しては、*Crk/Crk1*と個体発生の関連に関して共同研究を進めているシカゴ大学 今本氏より、*Crk^{-/-}/Crk1^{-/-}*タモキシフェン（4 OHT）誘導性コンディショナルノックアウトマウスの胎児由来線維芽細胞（MEF）を供与頂いた。この細胞を用いて、4 OHT投与前後の細胞形状の違いを説明できる細胞形状パラメータ指標を同定し、薬剤スクリーニングに用いた。

薬剤に関しては、これらの細胞を用いたRNAシーケンスのデータに基づき、絞込を行った。具体的には、ノックアウト下で発現が変動した遺伝子について、パスウェイ解析を行い、上流シグナル経路を情報学的に予測し、それらのシグナル伝達系に対する阻害剤を選択した。

3. 結果 研究成果

最初に、MEF野生株（MEF(-)）および*Crk*および*Crk1*遺伝子欠損（MEF(+)）により生じる細胞形態変化をCell Profiler（従来法）およびEFD法を用いて評価した。従来法の解析により、MEF(+)において、細胞面積の減少、真円率の増加などの変化を見出した。一方、EFD法の解析では、MEF(+)に比べてMEF(-)のほうが細長い形状をとることが示された。そこで、従来法およびEFD法をそれぞれ用いて、データ駆動的にMEF(-)とMEF(+)の分類を行った。1細胞レベルの数値データを従来法で解析し、主成分分析を行った結果では、MEF(-)およびMEF(+)の分類を行なうことは困難であった。EFD法においても、同様な結果を得た。しかし、96ウェルプレート上のウェルごとの細胞集団レベルでの解析では、従来法およびEFD法ともに良好な分類結果を得ることができた。これらの結果から、遺伝子欠損に起因する細胞形態の変化は、細胞集団レベルで検出・分類できる可能性が示唆された。

上記の結果を踏まえ、遺伝子発現のパスウェイデータに基づいて選択した6つのシグナル伝達阻害剤（U0126:MEK、LY294002:PI3K、Wortmannin:PI3K、SP600125:JNK、SB216763:p38、Cycloheximide:Protein Synthesis）について、細胞集団の細胞形態を解析し、両解析法の分類性能を比較した。その結果、MEF(-)およびMEF(+)いずれの細胞においても、**各種シグナル伝達阻害剤による形態学的指標の変化は、*Crk/Crk1*欠損の有無における変化と比較して小さく、分類がやや困難であることが示唆された。**実際に、従来法を用いた解析では、これらの違いを見出すことができなかったが、EFD法を用いることにより、MEF(-)に対するCycloheximideやSP600125の効果、MEF(+)に対するLY294002の効果を確認することができた。すなわち、これらの解析により、細胞形態に対する**薬剤効果を検出するためには、幾何図形への近似を行わずに細胞のかたちを直接定量化するEFD法の方がより適した手法であることが示唆された。**

MEF(-)およびMEF(+)に阻害剤を添加したデータの主成分分析において、*Crk/Crk1*欠損MEF(+)のと類似した形態を示す阻害剤はなく、本研究で用いた阻害剤においては、*Crk/Crk1*遺伝子欠損がどのシグナル伝達系を阻害して形態変化を生じているのかを明らかにすることはできなかった。一方、SP600125やU0126を添加したMEF(+)は、MEF(-)に類似していたことから、*Crk/Crk1*遺伝子欠損による細胞形態変化は、JNKやMEKの阻害により回復される可能性が示唆された（図2）。

MEF Control

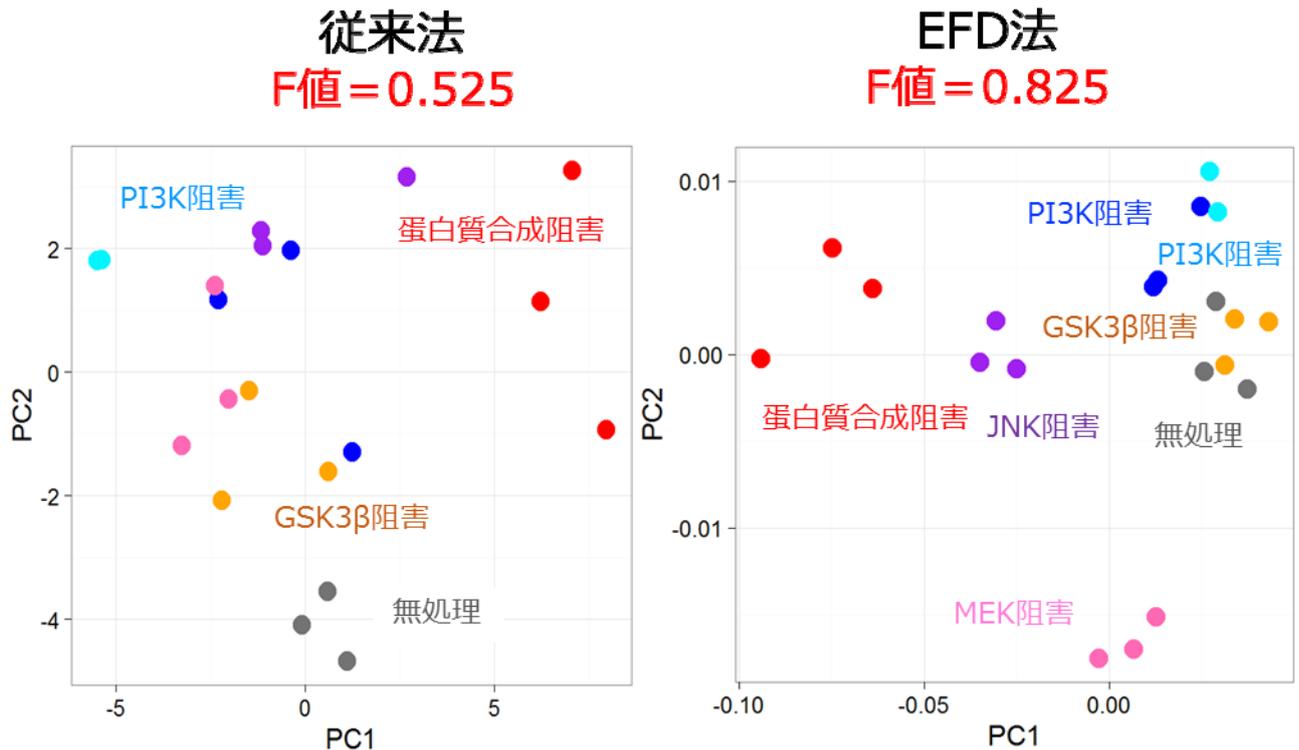
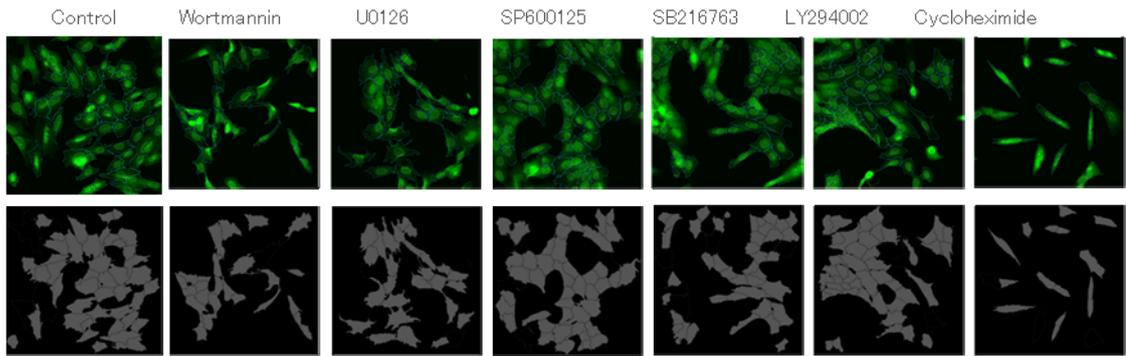


図2. 細胞形態による阻害剤の評価(F値が高いほど良好な分類性能を意味する)

4. 考察 まとめ

本研究により、遺伝子欠損およびシグナル阻害剤の影響を、細胞のかたちの定量解析により、データ分類できることが示された。その際に、幾何学近似よりも細胞のかたちを直接定量評価するほうが、小さな変化を検出できる可能性を見出した。

また、*Crk/Crk1*の細胞形態は、JNKおよびMEKなどのいくつかの主たるキナーゼ阻害剤により変化を受けることから、上流の受容体阻害剤に対する細胞形態解析を今後行っていく予定である。

5. 発表論文、参考文献

*Crk/Crk1*による代謝制御に関する論文を現在、投稿準備中である。また、本研究課題の中心である細胞形態スクリーニングに関しても、論文化の準備を進めている。