

表1 遺伝子導入法の種類と特徴

リン酸カルシウム法	正電荷をもつカルシウムイオンを負の電荷をもつDNAに結合させ、そこにリン酸を加えると、カルシウムイオンとリン酸が結合して複合体の沈澱が生じる。このリン酸カルシウムとDNAの複合体がエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ、その後、細胞核に移行することにより遺伝子発現に至ると考えられている。特殊な装置や技術を必要とせず、比較的簡単。
リポフェクション法	陽性荷電脂質などからなる脂質二重膜小胞(リポソーム)と導入するDNAの電気的な相互作用により複合体を形成させ、貪食や膜融合により細胞に取り込ませる方法。トランスフェクション効率が高く、オリゴヌクレオチド、二本鎖RNAの導入が可能で操作が簡単。特別な装置・設備は不要。
DEAE デキストラン法	本法による動物細胞内への遺伝子の取り込みや核内輸送メカニズムは、DEAE デキストランとDNAが複合体を形成して細胞表面に吸着し、エンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれるというモデルが考えられている。リン酸カルシウム法やリポフェクション法に比べて遺伝子導入効率が低く、細胞毒性がある。
エレクトロポレーション法	高電圧パルスより一過性に脂質二重層の細胞膜構造を不安定化し、DNAを取り込ませる方法。導入効率は電圧・電気パルスの長さ・温度・細胞およびDNAの濃度・バッファー組成の条件により左右される。操作が簡単で遺伝子導入効率が高いが、高価な専用機械が必要。
マイクロインジェクション法	1個の細胞に微細ガラス注入針を通じて試料を導入する方法。原理は簡単ながら、高度な技術を要する。トランスジェニック動物(マウス、ラットなど)の作製における常道で、受精卵に導入遺伝子を注入する。
ウイルスベクター法	レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどの生活環を応用し、標的の細胞に遺伝子導入する。組み換えウイルスを作製する必要があるため、封じ込めレベルでP2以上の施設が要求される。

され、自ら発色団を形成して発光する蛋白質であることが明らかになった。これにより、他の蛋白質のcDNAに融合させて細胞に導入すると、細胞内の任意の場所に蛍光をつくりだすことが可能であり、生きた細胞において特定の構造体、あるいは機能分子を蛍光ラベルするのに威力を発揮する¹⁾。このような融合蛋白質は発色団形成効率が向上した改変型GFP cDNAとして各社より入手可能であり、また励起光や検出波長の特性によって赤橙色、青色、黄色などの蛍光蛋白質との組み合わせにより、細胞機能を「色分け」することもできる¹⁾²⁾。

これらの蛍光蛋白質とは対照的なのが、発光蛋白質であるルシフェラーゼである³⁾。ルシフェラーゼは、発光バクテリアやホタルなどの生物発光において、発光物質が光を放つ化学反応を

触媒する作用をもつ酵素の総称である。ルシフェラーゼは酵素であるため、基質特異性をもつ。つまり多くの場合、ある発光生物のルシフェラーゼはその生物のルシフェリンとしか反応しない。せいぜい系統的に近縁な種類の生物のルシフェリンと反応をすることができ程度である。また、生物発光の光の波長(色)は、由来するルシフェラーゼに依存している³⁾。ルシフェラーゼ発光は単一細胞レベルでの観察には不向きであるが、その優れた光の組織透過性からマウスなどの小動物の個体内での組織動態を観察することが可能である。

遺伝子導入方法の種類と特徴

培養細胞への遺伝子導入法としては主に、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAE デキストラン法、

エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、ウイルスベクター法などがある。それぞれの一般的特徴を表1に示す。われわれの研究室では、ルシフェラーゼを安定的に発現するヒト癌細胞株ライブラリーの作製を行っているため、レトロウイルスベクターを用いた安定的遺伝子導入方法を実施している⁴⁾⁵⁾。

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

レトロウイルスの生活環(図1)は、まずエンベロープ糖蛋白と標的細胞の受容体との特異的結合を介して細胞膜に吸着し、RNAゲノムを含むウイルスコアを細胞内に放出する。細胞内に入ったRNAゲノムは自らの逆転写酵素によって二本鎖DNAに逆転写された後、宿主染色体に組み込まれてプロ

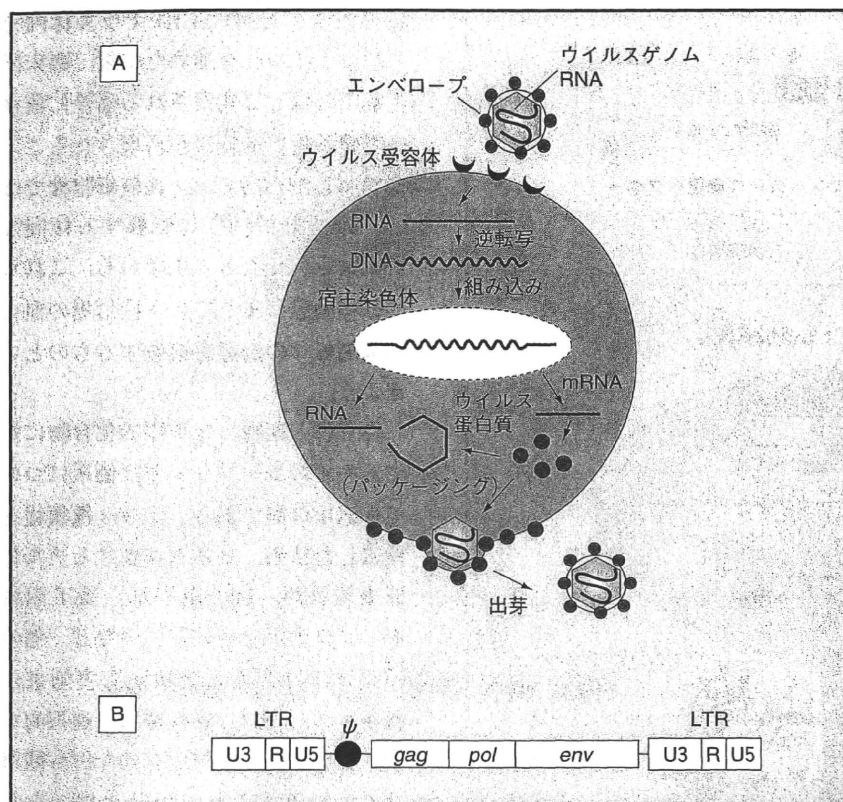


図1 レトロウイルスの基本構造と生活環

ψ: パッケージングシグナル

A: レトロウイルスの生活環。野生型レトロウイルスの感染では、染色体に組み込まれたウイルスゲノムから新たなウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。

B: レトロウイルスの基本構造。ウイルスゲノムは、*gag*, *pol*, *env* の3種類の必須ウイルス構成蛋白質のコーディング領域と両端のLTRから構成されている。LTRには、遺伝子の発現に必要なプロモーター、エンハンサー、ポリAシグナル等のエレメントが含まれている。

また、5'側のLTRの内側には、RNAウイルスゲノムがウイルス粒子の中に取り込まれるために必要なパッケージングシグナル(ψ)が存在する。

ψ配列を取り除いたプロウイルスDNA(ヘルパープラスミド)が導入された細胞では、プロウイルスから生成したRNAゲノムがウイルス粒子内に取り込まれないため、不完全なウイルス構成蛋白質しかつくり出されない。このような細胞はパッケージング細胞と呼ばれる。ウイルスゲノムDNAから両端のLTRとψ配列を残して目的の遺伝子を挿入したベクタープラスミドを、目的に応じたエンベロープ発現ベクターとともにこのパッケージング細胞に導入すると、ベクターDNAが細胞に組み込まれた後、転写によって生じたベクターRNAゲノム(ψ配列を含む)がウイルス粒子内に取り込まれてベクターウイルス粒子が生成する。このようにして作製されたウイルス産生細胞株(プロデューサー細胞)は、感染性のベクターウイルス粒子を生産して培地中に放出する(図2)。得られた組み換えレトロウイルスを標的細胞に感染させることにより、目的の遺伝子を容易に導入することができる。なお、組み換えウイルスは複製能を欠損しているため、ヘルパーウイルスが混入していない限り、感染標的細胞からウイルス粒子が新たに生産されることはない。

ウイルスDNAとなり、感染が成立する。プロウイルスDNAはRNAに転写され、一部はmRNAとして、また一部はRNAゲノムとして機能する。これらによって宿主細胞内部でウイルスコアが形成され、最終的にはエンベロープ糖蛋白を露出した細胞膜に被われながら細胞外に放出(出芽)されていく。

レトロウイルスの構造は、(+)-

本鎖RNAをゲノムとする約100nmの粒子で、感染した後、RNAゲノムがDNAに逆転写された後、宿主染色体に組み込まれる。ウイルスゲノムは、*gag*, *pol*, *env*の3種類のコーディング領域と両端のLTR(long terminal repeat)から構成されており、LTRには、遺伝子の発現に必要なプロモーター、エンハンサー、ポリAシグナルなどのエレメントが含まれている。

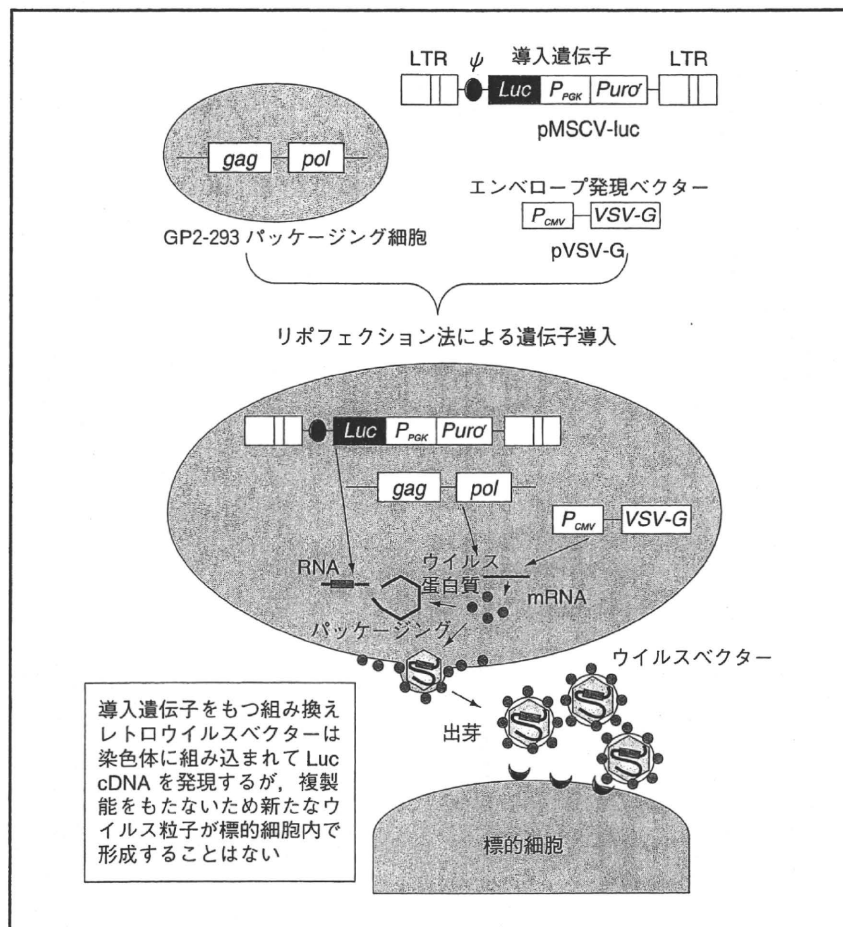


図2 レトロウイルスベクター pMSCV を用いた細胞標識の原理

ルシフェラーゼ (Luc) cDNA を組み込んだレトロウイルスベクター pMSCV-Luc をエンベロープ発現ベクター pVSV-G とともにパッケージング細胞 GP2-293 に遺伝子導入する。ウイルスの gag と pol を発現する GP2-293 細胞内で組み換えウイルスが産生され、培地中に放出される。この組み換えレトロウイルスは、標的細胞の染色体に組み込まれてルシフェラーゼを安定的に発現する。この組み換えレトロウイルスは複製能をもたないため、新たなウイルス粒子が標的細胞内で産生されることはない。

ルシフェラーゼを安定的に 発現するヒト癌細胞株 ライブラリーの特徴

ルシフェラーゼを用いた実験系の優れた点は、試験管内における評価に続いて生体内での経時的な発光イメージング観察ができることにある。細胞

内の ATP レベルを反映した「光」は、細胞生存と非常によく比例するため、ルシフェラーゼでラベルされた癌細胞は、腫瘍特異的リンパ球や各種抗癌剤・化合物による細胞傷害を迅速かつ簡便に評価することができる(図3)⁶⁾。われわれの研究室では作製中の癌細胞ライブラリーについて、それら細胞の

転移動態を NOD/SCID マウス体内でプロファイルを進めた結果、臨床固形癌でしばしば観察される癌種に依存した臓器選択的転移が再現されることが判明した。例えば、乳癌細胞株では脳、肺、骨(脊椎)に転移する傾向性が観察されている。すなわち、これらの転移動態はまさにヒト固形癌の血行性遠隔転移の動態を模倣するものといえよう。

さらに、薬物・分子標的化合物に対するハイスループット型評価系についても応用可能である。約 300 種類程を検索した結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、Jak2 阻害剤、AKT 阻害剤、プロテアソーム阻害剤など、癌の種類にほぼ共通した増殖阻害効果が観察された。また、癌の種類に選択的なシグナル伝達阻害剤が有効な例も観察されている。これらの結果は、ルシフェラーゼ発光を基盤としたアッセイ系が「*in vitro*」から「*in vivo*」に統一した細胞資源として有用であることを示すものであり、癌創薬促進の観点から極めて「有効かつ高度化された細胞資源」になると期待している。

謝辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業(生物資源研究)」によって成されたものである。また、本研究にご協力・ご助言いただいた諸先生方ならびにバイオイメーキング研究部の教室員の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) Lippincott-Schwartz J, Patterson

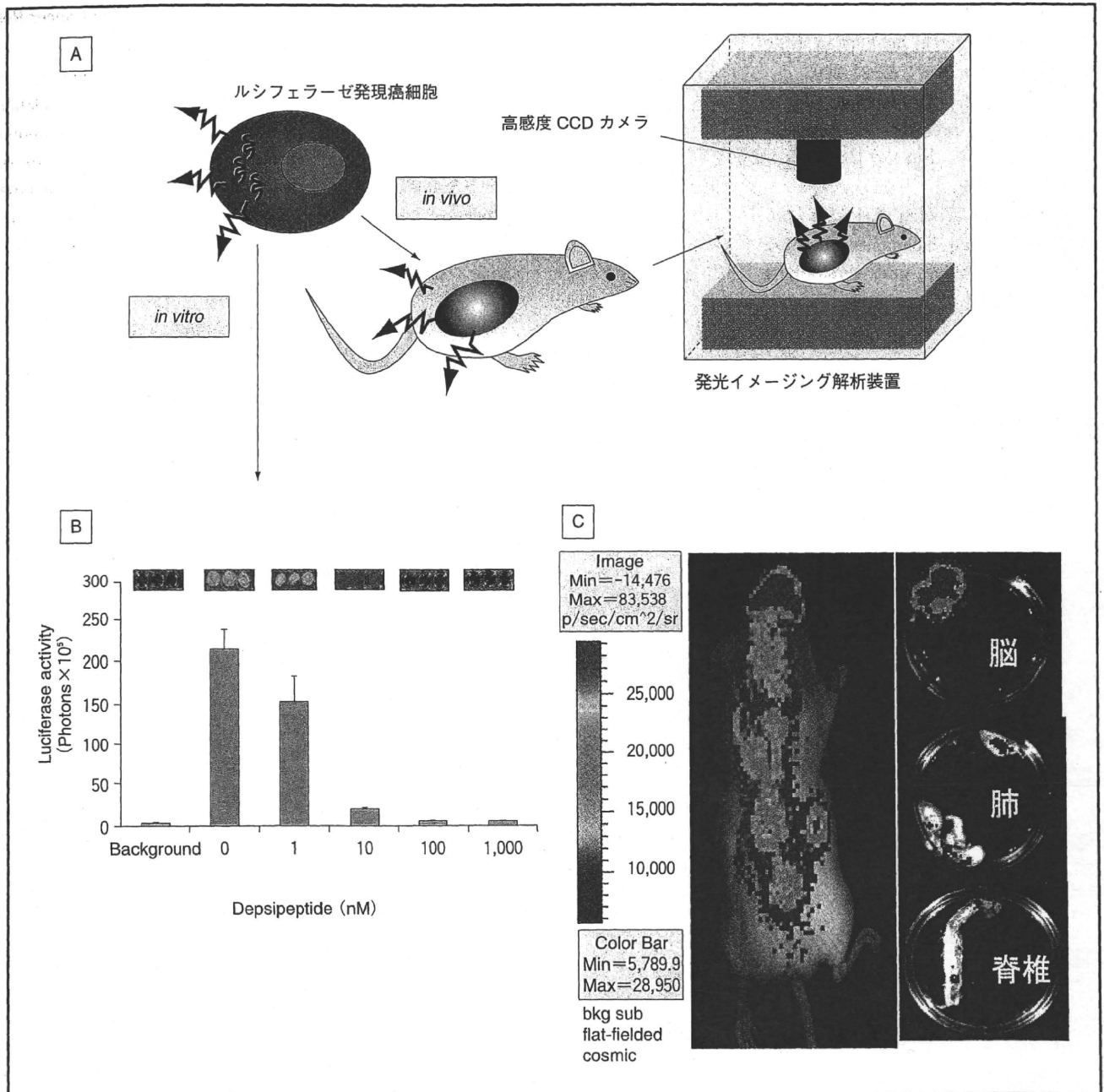


図3 ルシフェラーゼを安定的に発現するヒト癌細胞株の特徴

高感度 CCD カメラ搭載のイメージング装置での解析 (図3-A)。ルシフェラーゼを安定的に発現するヒト癌細胞株 MDA-MB-231-Luc を NOD/SCID マウスに散布すると約 30 日前後で脳, 肺, 骨転移が観察される (図3-C: また, ルシフェラーゼ発光を指標に薬剤感受性を試験すると, 抗癌効果のある化合物では容量依存的に発光量が減衰する (図3-B)。

(図3-B は文献6より引用)
(カラーグラビア p10 写真14参照)

- GH : Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300 : 87-91, 2003
- 2) Hoffman RM : The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer *in vivo*. *Nat Rev Cancer* 5 : 796-806, 2005
- 3) Negrin RS, Contag CH : *In vivo* imaging using bioluminescence : a tool for probing graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 6 : 484-490, 2006
- 4) Sato A, Ohtsuki M, Hata M, et al : Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol* 176 : 7686-7694, 2006
- 5) Yanagisawa S, Kadouchi I, Yokomori K, et al : Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Clin Cancer Res* 5 : 3014-3022, 2009
- 6) Murakami T, Sato A, Chun NA, et al : Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol* 128 : 1506-1516, 2008



TGACCTTGAATGAGTGCAGCGAGGTGCATGACGAAC

Luciferase Transgenic ラットを用いた迅速な組織内 ATP の評価法 —効果的な臓器保存液の開発のために—

1. 自治医科大学 分子病態治療研究センター バイオイメージング研究部
2. 自治医科大学 先端医療技術開発センター 先端治療開発部

菊地 健志^{1,2}・堀田 淳¹・村上 孝¹

Takeshi Kikuchi

Jun Hotta

Takashi Murakami

高橋 将文¹・小林 英司^{1,2}

Masahumi Takahashi

Eiji Kobayashi

(教授)

ACTGGAAGCTTAGTCAAGTCCGCTCCAGTACTGCTTG

Key Words 臓器保存液, Luciferase Transgenic ラット, ATP 評価法

はじめに

近年、臓器移植に対する関心が高まっている。脳死ドナーの倫理問題や、海外へ渡航しての臓器移植について新聞、テレビなどのメディアに取り上げられており、2009年の国会において臓器移植法の改正が行われたことも記憶に新しい。これらの背景にあるのは、移植医療の一般化に伴う世界的な移植臓器の不足である。特に、日本ではこの10余年、脳死ドナーの利用が進んでおらず、15歳以下では臓器提供も実質的に禁止されていたため、臓器の不足は一層深刻であった。このような中、国内での移植が望めない患者が海外へ渡り移植手術を受けてきた。2006年の厚生労働省の研究班（主任研究員：小林英司/自治医科大学教授）らの調査の結果、調査時点で少なくとも522人以上が海外で臓器移植手術を受けていることが明らかになっている。

Surgery Frontier 16(3) : 000-000, 2009

しかし、このように他国の臓器を必要とする移植（渡航移植）は問題であるとされ、2008年には国際移植学会によってイスタンブール宣言が採択されている。イスタンブール宣言では問題のある渡航移植を制限し、可能な限り自国内で移植が行われていくよう呼びかけている。さらに今年に入り、採択こそ延期されたものの、WHO総会においても渡航移植を制限する内容のガイドラインの案があがっている。

以上のような問題を背景としつつ、わが国では臓器不足緩和のため、年齢制限の撤廃などで提供できる臓器の範囲を広げた改正臓器移植法が2009年度の国会で成立した。また、学術面においてもこの臓器不足問題を解決するために、臓器不全治療のための再生医療研究や人工臓器の研究など、さまざまな研究が進み成果をあげている¹⁾⁻³⁾。しかし、今現在のところ臓器移植に代替できる治療法にはなっていない。よって現段階における効果的なドナー不足解消の手段は、使用できる臓器を

確実に利用することと考えられる。絶対的に数の少ない移植臓器を効率的に利用するためには、摘出臓器を Viability の高い状態に保つことが必須である。そこで摘出臓器をよりよい状態で長期間維持できる効果的な臓器保存法が必要となってくる。

臓器保存液

摘出臓器を損傷なく保存できるなら、時間的な制約が減るぶんその臓器の使い道は広がり、結果的に臓器の有効利用へとつながる。現在行われている摘出臓器の保存方法は臓器保存液を用いた浸漬保存法である⁴⁾。これは冷却した保存液に臓器を漬けて、臓器の代謝を抑えながら臓器を保存する方法である。当然、臓器を漬ける液の組成が重要になってくるため、現在までにさまざまな検討がなされ、多種多様な保存液が開発されてきた⁵⁾⁻⁸⁾。しかし、保存液の開発は簡単なものではなかった。その最たる理由は臓器保存効果の簡単な評価法がなかったためである。

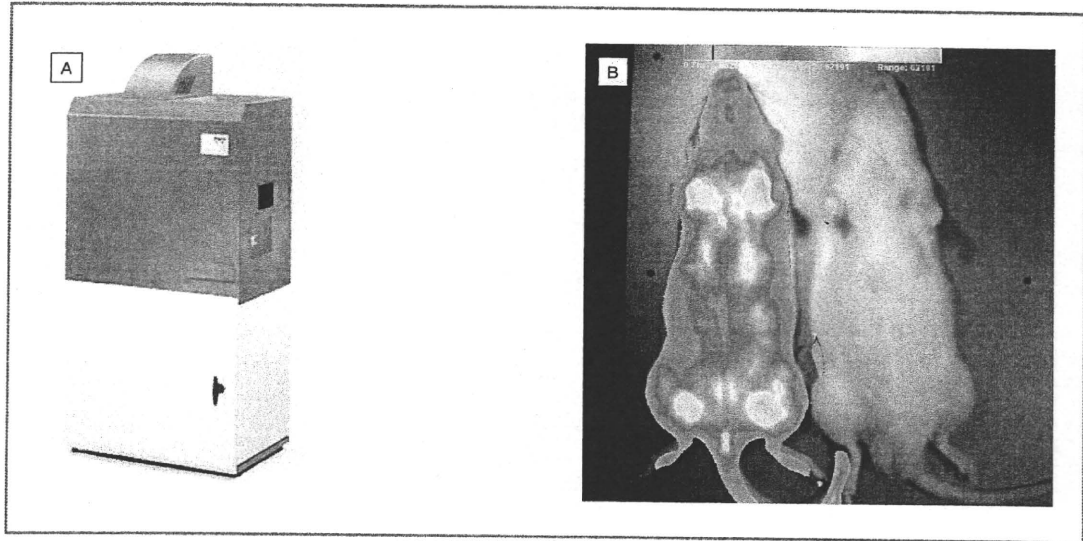


図1 Luciferase Transgenic (Luc Tg) ラットの発光

A : ラットの発光はイメージング装置で検出されイメージ化される。写真は Berthold 社製 *in vivo* イメージング装置 Night OWL。
 B : 基質 D-Luciferin を投与した Luc Tg ラット。右側はノーマルラット。

(カラーグラビア p ● 写真 ● 参照)

組織内 ATP 量評価法

臓器保存液の有効性を示すためには、最終的にその保存液で保存した臓器を移植して機能することを確かめなければならない。しかし、保存液の組成検討や添加物質などの探索段階で逐一実験的に臓器移植手術を行い評価するのはあまりに膨大な労力を必要とする。効果的な臓器保存液を開発するためには、臓器移植せずとも移植後の結果を推測できる簡単な保存臓器の評価システムがあることが望ましい。そこでわれわれは Luciferase (Luc) Transgenic (Tg) ラットを用いて、簡単・迅速な組織内 ATP 評価法を開発した⁹⁾¹⁰⁾。

本法のメインは組織内 ATP の評価を究極に簡便化したことにある。ATP は細胞のエネルギー源であるため、ATP が減少・枯渇すれば細胞は死んでしまう。そのため、保存した臓器内の ATP 量を測定することによって、保存臓器内の死にいく細胞・死んだ細胞を大まかに評価することができるのである。しかし、これまではこの ATP 測定操作自体が複雑で困難な作業であったために、臓器保存液の開発自体も困難なものになってしまっていた。

Luc Tg ラットを用いた ATP 評価法と従来の ATP 測定法の比較

これまで臓器保存液開発のための評価法として、保存した臓器・組織内の ATP 測定が不向きであった理由は、① ATP 測定操作自体の複雑さ、② その煩雑さゆえに平行した大量サンプルの処理が困難であったこと、③ ATP 測定のためにはサンプルの破砕が必要であったこと、があげられる。われわれが開発した Luc Tg ラットを用いた組織内 ATP 評価法では、以上の3点をクリアし簡単に保存臓器中の ATP を評価することができる。本システムにおいてはトランスジェニック技術に

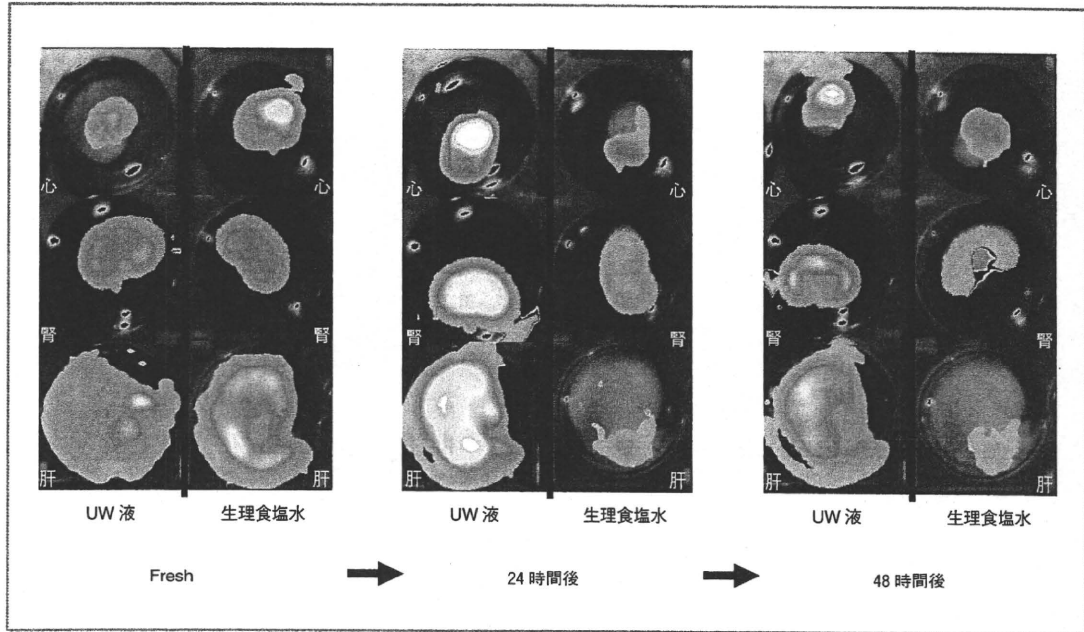


図2 Luc Tg ラット臓器の保存による発光輝度の変化

Luc Tg ラットの心臓・腎臓・肝臓を摘出し、異なる2液で保存して経時的に発光輝度を測定した。UW液による保存では臓器の発光は維持されているが、生理食塩水による保存では発光の減少が著しい。

(カラーグラビアp● 写真●参照)

よってホタルの発光酵素・*Luciferase* 遺伝子を導入した Luc Tg ラットを用いる。本ラットは全身に *Luciferase* 蛋白を発現しており、基質 D-*Luciferin* を投与することによって図1のように全身発光する¹¹⁾。この発光反応は *Luciferin*・*Luciferase* が十分量あるとき ATP 量に依存することが知られている¹²⁾¹³⁾。つまり発光の強さ・弱さからその組織内の ATP 量を簡単に評価することができるのである。図2では異なる臓器保存液中で Luc Tg ラットの臓器発光輝度が時間によって変化し

ていく様子を示した。

ここで前述した従来の ATP 測定法との簡単な比較を試みる。従来の ATP 測定法ではまず、保存した組織をホモジナイザーを使用して破碎し、臓器の破碎液にする。次にこの破碎液を遠心分離器にかけて不必要な組織片を沈める。そしてその上清に酸などを添加し ATP の抽出や安定化を行う。こうすることで後の操作中の ATP ロスを防ぐのである。最後に処理した溶液サンプル中の ATP をクロマトグラフィーや *Luciferin/Luciferase* 反応を

用いた発光反応測定器などを用いて測定する、という複数の手順にわたる操作が必要である(図3)。最近ではこれらの手順を効率化し、迅速に測定が行えるようにした優れたキットも存在している。しかし、それでも一連の操作には 30～60 分の時間が必要である。さらにホモジネートや遠心分離の手間を考えると、平行して処理できるサンプル数は数検体が限度である。対して Luc Tg ラットを用いた方法では、保存した Luc Tg ラットの臓器に *Luciferin* を添加して発光を測定する

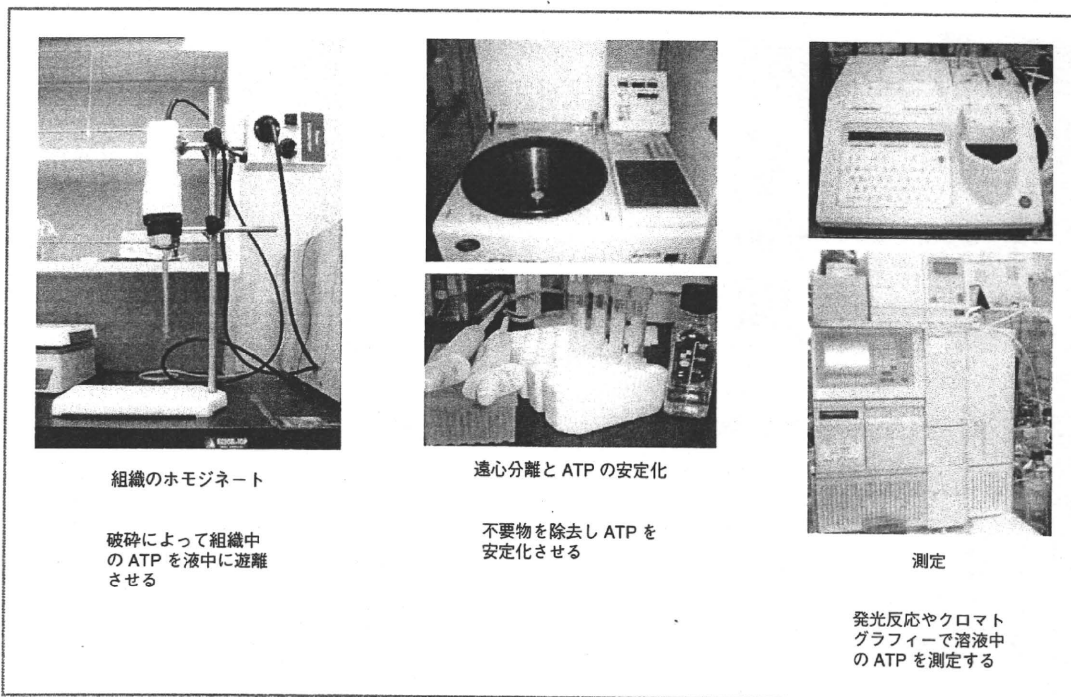


図3 従来の組織内ATP測定のための操作手順

のみである(図2)。もちろんこの発光輝度は数値化し定量することができる。そしてこの操作は数分もかからず終了する。さらに発光測定器にオートインジェクター付きプレートリーダーを用いて、あらかじめLuc Tgラット組織を96穴プレートに分割して保存しておくことで、一度に96サンプルの大量評価も可能である(図4)。また保存サンプルは、一度発光を測定しても保存液にLuciferinが添加されただけで全く侵襲がない。保存液を新しいものと交換し、何度でも同一サンプルの測定が可能である。これによって従来法

では非常に困難であった保存臓器の経時的なATP量の変化を労力なく知ることができる。また同一サンプルの繰り返し測定は労力の軽減だけでなく、使用する実験動物の総数を減らすというメリットもある。本システムは大量サンプルの処理が必要になるスクリーニング段階で非常に強さを発揮するシステムなのである。

おわりに

Luc Tgラットを用いた組織内ATP評価システムは組織内のATPを簡便かつ迅速に評価できる画期的な方法で

ある。今回はその性質を臓器保存液のスクリーニングという形で応用した例について述べた。しかし、本システムはその性質上、さまざまな分野の研究に用いることが可能である。本システムがさまざまな研究・開発におけるツールとして活躍し、役立てられることを期待する。

謝辞

大量サンプルのスクリーニング法開発につきましては、香山不二雄先生(自治医科大学環境医学部門教授)のご協力に心から感謝いたします。

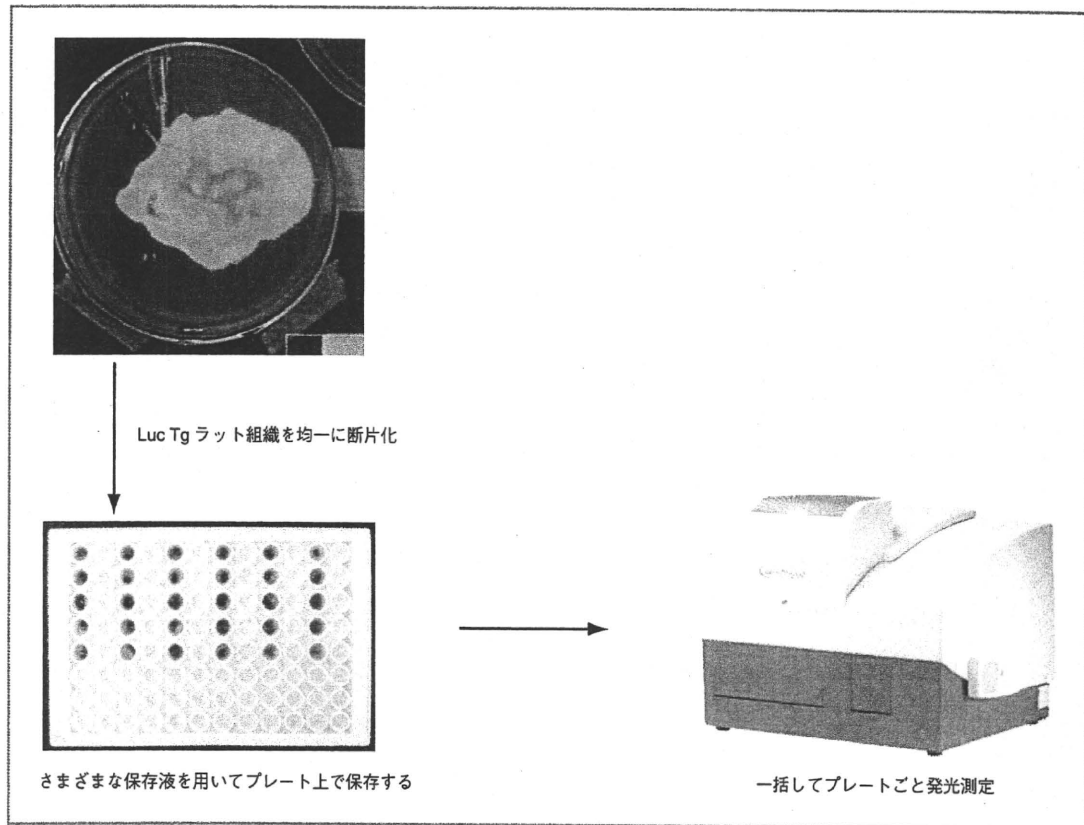


図4 Luc Tg ラットを用いた臓器保存液の大量スクリーニング法

プレート上にて Luc Tg ラットの組織を保存しておくこと、プレートリーダーを用いて大量のサンプルを一括して評価することが可能である。本法では保存組織に侵襲がなく、何度でも繰り返し測定が可能。

(カラーグラビア p ● 写真 ● 参照)

文 献

- 1) Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, et al : Generation of a transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplantation* 85 : 1654-1658, 2008
- 2) 畑 俊行, 上本伸二, 小林英司 : 自己肝細胞によるキメラ肝臓移植. *日本外科学会雑誌*. 109 : 419, 2008
- 3) Sekine H, Shimizu T, Hobo K, et al : Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation* 118 : S145-152, 2008
- 4) Zhou YC, Cecka JM : Preservation. *Clin Transpl* : 383-390, 1992
- 5) Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI : Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 2 : 1219-1222, 1969
- 6) Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, et al : Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW

- solution. *Transplantation* 46 : 191-196, 1988
- 7) Hölscher M, Groenewoud AF : Current status of the HTK solution of Bretschneider in organ preservation. *Transplant Proc* 23 : 2334-2337, 1992
- 8) Chen F, Nakamura T, Wada H : Development of new organ preservation solutions in Kyoto University. *Yonsei Med J* 45 : 1107-1114, 2004
- 9) 菊地健志, 堀田 淳, 小林英司 : Luciferase Transgenic ラットを用いた臓器保存液スクリーニングシステム. *Bio Industry* 7 : 78-82, 2008
- 10) 菊地健志, 堀田 淳, 村上 孝他 : 臓器保存液開発における画期的システム : Luciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法. *Organ Biology* 16 : 225-235, 2009
- 11) Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E : "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation* 81 : 1179-1184, 2006
- 12) Ando Y, Niwa K, Yamada N, et al : Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nature Photonics* 2 : 44-47, 2007
- 13) Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, et al : Increased level of extracellular ATP at tumor sites : in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE* 3 : e2599, 2008

Bio-luminescent imaging and characterization of organ-specific metastasis of human cancer in NOD/SCID mice

Nicole A.L. Chun^a & Takashi Murakami*^a

^aDivision of Bioimaging Sciences, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan 329-0498

ABSTRACT

Many clinical evidences demonstrate that the sites of distant metastasis are not random and certain malignant tumors show a tendency to develop metastases in specific organs (e.g., brain, liver, and lungs). However, an appropriate animal model to characterize the metastatic nature of transplantable human cancer cell lines has not been reported well. Recent advances in bio-luminescent imaging (BLI) technologies have facilitated the quantitative analysis of various cellular processes in vivo. To visualize the fate of tumor progression in the living mice, we are constructing a luciferase-expressing human cancer cell library (including melanoma, colon, breast, and prostate cancer). Herein we demonstrate that the BLI technology in couple with a fine ultrasonic guidance realizes cancer cell-type dependent metastasis to the specific organs. For example, some melanoma cell lines showed frequent metastasis to brain, lungs, and lymph nodes in the mouse model. Notably, reflecting the clinical features of melanoma, breast, and prostate cancer, some of the cell lines showed preferential metastasis to the brain. Moreover, these cellular resources for BLI allow a high throughput screening for potential anti-cancer drugs. Thus, this BLI-mediated additional strategy with the luciferase-expressing cancer cell resources should promote many translational studies for human cancer therapy.

Keywords: Cancer metastasis, human cancer cell line, luciferase, ultrasound, luminescent imaging, cardiac injection

1. INTRODUCTION

The metastasis of tumor cells represents the primary source of clinical morbidity and mortality in the large majority of solid tumors. Appropriately, the word "metastasis" (from the Greek for "change in position") refers to cell movement: the migration of cancer cells to body parts distant from the primary tumor. Clinicians and pathologists have long known that this process is not random (1, 2). Metastasis occurs in certain organs more than to others depending on the origin of the primary tumor. For example, melanoma shows preferential metastasis to the brain, lung, liver, and skin, while prostate cancer cells tend to metastasize to bone, lung, liver, and brain. It is thought that organ selectivity of metastasis is determined by anatomic considerations of blood flow, by cell intrinsic properties (e.g., expression of specific receptors or altered cytoskeletal states that facilitate metastasis), and by organ intrinsic properties (e.g., local production of tumor enhancing growth factors). However, appropriate small animal models to characterize the metastatic nature of transplantable human cancer cell lines have not been reported well.

Small animals (mice, rats) provide the most common animal models used in studies of cancer metastasis (2, 3). In most studies involving small animals, cell injection has been conducted through the tail vein of small animals. Alternatively, a model of left thoracotomy with cardiac injection under direct visualization was employed (4). The former route is not an advantageous method for the true systemic delivery because most of the injected cells are trapped in the capillaries of the lung. The latter case is invasive and carries 10–15% mortality and the actual delivery site is not visualized (4). Thus, less invasive delivery methods to the whole body are needed and should likely play a significant role in optimization of future studies for cancer metastasis.

High-resolution ultrasonography (US) has been developed specifically for small animal imaging (5). This new US employs higher frequencies (25 to 40 MHz), which result in increased spatial resolution, allowing clear identification of areas of interest within the myocardial wall of small animals and permitting precise and site-directed cell injection.

*takmu@jichi.ac.jp; phone 81 285 58-7446; fax 81 285 44-5365

Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II,
edited by Samuel Achilefu, Ramesh Raghavachari, Proc. of SPIE Vol. 7576, 757606
© 2010 SPIE · CCC code: 1605-7422/10/\$18 · doi: 10.1117/12.836807

Proc. of SPIE Vol. 7576 757606-1

Recent advances in imaging strategies that reveal cellular and molecular biological events in real-time facilitate our understanding of biological processes occurring in living animals. The development of molecular tags such as green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish (*Aequorea victoria*) and luciferase from the firefly (*Photinus pyralis*) has precipitated a revolution over the past decade, allowing complex biochemical processes to be associated with the functioning of proteins in living cells (2, 6, 7). In particular, luminescence imaging offers important opportunities for the investigation of a variety of biological processes in living cells (7): bioluminescent reporters have significantly greater signal-to-noise ratios in mammalian tissues, and emitted light signals can be quantified in the context of intact animal using non-invasive assays.

Herein we will highlight that high-resolution US guidance can be used for accurate and reproducible cardiac cell injection and that metastatic fate of transplanted tumor cells can be followed non-invasively with optical bioluminescence imaging.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cells and animals

Male and Female NOD C.B-17-Prkdc^{scid}/J (NOD/SCID) mice (8-12 wks old) were purchased from Charles River Japan. All experiments in this study were performed in accordance with the Jichi Medical University Guide for Laboratory Animals.

Cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and the Health Science Research Resources Bank (Sennan, Osaka, Japan). Depending on the cell line, cells were maintained in either Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO, Gaithersburg, MD) with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and supplements (8) or RPMI-1640 (GIBCO) with 10% FCS and supplements. The cultures were kept in a 5% CO₂ and 95% air humidified atmosphere at 37°C.

2.2 Establishment of luciferase-expressing cells

Firefly (*Photinus pyralis*) luciferase cDNA from pGL3 basic (Promega, Madison, WI) was inserted into the pMSCVpuro retroviral vector (Clontech), generating pMSCV-luciferase. GP2-293 packaging cells (Clontech) were cotransfected with pMSCV-luciferase and pVSV-G (Clontech), a plasmid encoding the viral envelope glycoprotein (VSV-G) of vesicular stomatitis virus, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Supernatants from transfected GP2-293 were incubated with ~50% cells in the presence of Polybrene (8 mg/ml final concentration; Sigma-Aldrich). Transduced cells were propagated in medium containing puromycin (Sigma-Aldrich) at 15 mg/ml (Figure 1A). Established cells were listed on Figure 1B.

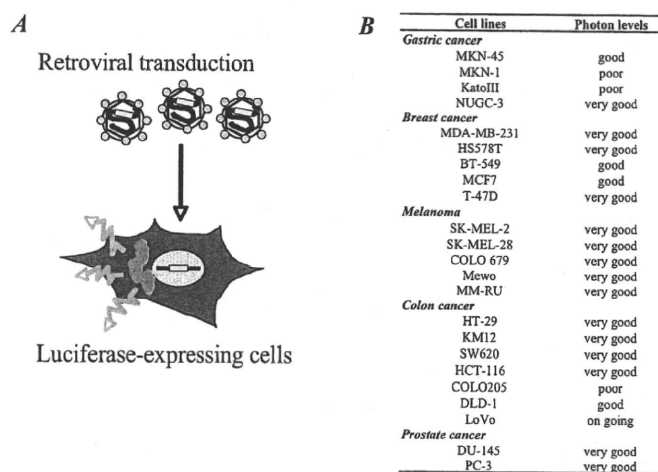


Figure 1. Construction of firefly luciferase-expressing human cancer cell lines.

2.3 Xenogeneic cardiac tumor injection

Luciferase (luc)-expressing cells in the exponential growth phase were harvested by trypsinization and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) before injection. Luc-expressing cells (5×10^5 in 0.2 ml of PBS) were inoculated into the left cardiac ventricle of NOD/SCID mice under a fine ultrasonography (US) guidance. Briefly mice were anesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane. The mice were then fixed in the supine position on a custom-built mold designed and their natural body shape was maintained (Figure 2A). The chest of the mice were shaved and further cleaned with a chemical hair remover to minimize ultrasound attenuation. Short-axis echocardiography was accomplished with a Vevo770 system (VisualSonics Inc., Toronto) in B mode with the use of a 700 series real-time micro-visualization (RMV) scan head probe (Model RMV 707B). Ultrasound gel was spread over the precordial region to visualize the left ventricle (Figure 2B). When the vertical-section with the largest left-ventricular chamber dimension was located, a cell suspension was loaded into a syringe fitted with a sterile disposable 30-gauge needle. The syringe was secured in a micromanipulator, and the needle and the RMV scanhead probe were aligned before the injection procedure (the needle angle was at ~ 45 degree to the table surface; see Figure 2A). Under the real-time image guidance, the needle was inserted into the left ventricle. The injection can be monitored on the ultrasound screen and documented as video clips on the Vevo770 computer.

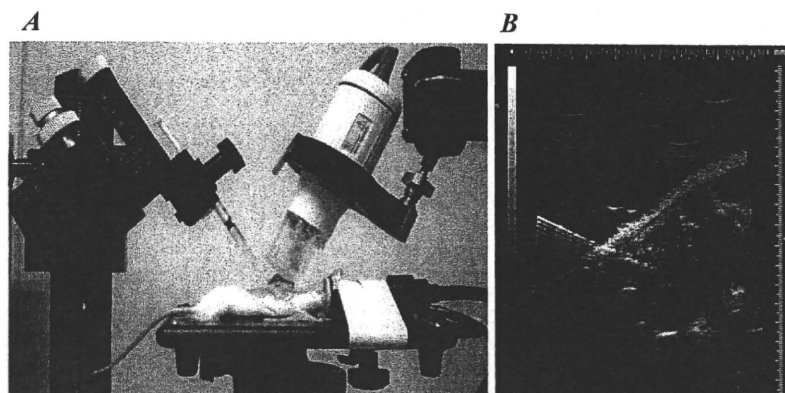


Figure 2. The use of a high-resolution ultrasound (25-75 MHz) allows accurate cardiac cell injection.

2.4 Histological examination

Removed specimens were fixed with 10% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections were then stained with hematoxylin-eosin.

2.5 *In vivo* luminescent imaging

In vivo tumor progression was monitored using the non-invasive bioimaging system IVISTM (Xenogen, Alameda, CA). Tumor-injected mice were anesthetized with Isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL), and D-luciferin (potassium salt; Biosynth, Postfach, Switzerland) was injected into the peritoneal cavity (3 mg/body). Mice were immediately followed by the measurement of luciferase activity. The imaging system consisted of a cooled, back-thinned charge-coupled device (CCD) camera to capture both a visible light photograph of the animal taken with light-emitting diodes and the luminescent image. After acquiring photographic images of each mouse, luminescent images were acquired with a 1 min exposure time (9, 10). Images were obtained with a 25-cm field of view (FOV), a binning (resolution) factor of 8, 1/f stop, and an open filter. The resulting gray scale photographic and pseudo-color luminescent images were automatically superimposed using software to facilitate identification of any optical signal and location on the mouse. Optical images were displayed and analyzed using Igor (WaveMetrics, Lake Oswego, OR) and IVIS Living

Image (Xenogen) software packages. The signal from tumors was quantified as photons flux in units of photons/sec/cm²/steradian.

2.6 Ex vivo luminescent imaging inspection

For the inspection of metastasized organs, various organs of the mice were removed onto culture dishes and tumor-derived photons were examined for micro-metastases in the presence of D-luciferin (250 ug/mL). The following representative organs of mice were evaluated for the metastases: the lung, liver, brain, spine, paraaortic lymph nodes, gut and omentum, peritoneum, retroperitoneum, spleen and bladder.

3. RESULTS

3.1 Photon emission from luciferase-expressing cancer cells are correlated with viable cell number

Recent advances in luminescent imaging technologies have facilitated the quantitative analysis of cellular processes *in vivo*. Human cancer cell lines were transduced with firefly luciferase in an effort to visualize the fate of tumor progression in the living animals. The advantages associated with the use of luciferase as a marker includes its sensitivity (as few as 100 luciferase-transduced cells can be detected over the background *in vitro*) and its linear dose-dependent output of light in the presence of D-luciferin (data not shown).

We have previously shown that depsipeptide induces apoptotic cell death in human melanoma cell lines (11, 12). We examined whether photon emission from luciferase-expressing tumor cells was correlated with viable cell number. A sublethal dose of depsipeptide on murine B16/F10 melanoma cells (Figure 3A) revealed that depsipeptide decreased tumor-derived photons in a dose-dependent manner. Furthermore, caspase-3/7 activity in unmanipulated B16/F10 cells also increased linearly after a 24 hr exposure to 1-10 nM depsipeptide (Figure 3B), with the median dose of depsipeptide (ED₅₀) being 5.34 nM. Thus, these data indicate that tumor-derived photons were correlated well with viable cell number.

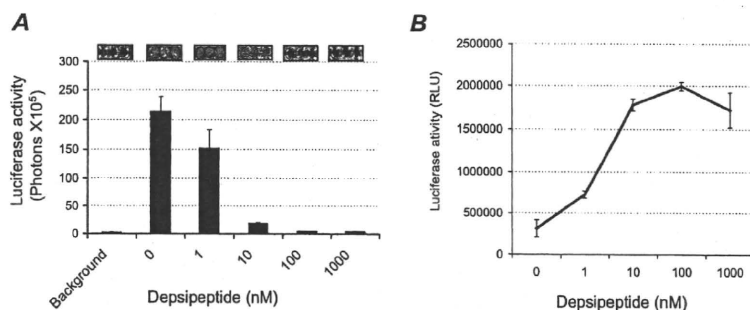


Figure 3. Photon emission from luciferase-expressing cancer cells are correlated with viable cell number. (A) Luc-B16/F10 cells (1×10^5) were plated onto 48-well plates at the indicated number and exposed to depsipeptide at the indicated concentration for 16 hr. Luciferase activity (photon counts) was then evaluated in the presence of D-luciferin. (B) Caspase-3/7 activity was quantified for 16 hr following treatment at the indicated concentration of depsipeptide in B16/F10 cells (2×10^4). The Caspase-GloTM 3/7 Assay system (Promega, Madison, WI) was used according to the manufacturer's instructions. The background luminescence associated with the cell culture and assay reagent (blank reaction) was subtracted from experimental values.

3.2 Organ-specific metastasis of human cancer cells in NOD/SCID mice

Luciferase-expressing cells were inoculated into the left cardiac ventricle of NOD/SCID mice under fine US guidance. BLI was conducted per cell line and representative organs (e.g. brain, liver, lungs, lymph nodes, bones and gastrointestinal tract) were followed by *ex vivo* inspection. In the case of human melanoma cell lines, their metastatic potential was dependent on the cell line (Figure 4A). For example, SK-MEL-2 cells showed a low metastatic phenotype, and SK-MEL-28 and Mewo cells had a moderate metastatic phenotype. Colo679 cells showed the most aggressive metastatic phenotype among the cell lines. SK-MEL-28, Mewo and Colo679 cells tend to metastasize to the brain, lungs, liver and lymph nodes of NOD/SCID mice (Figure 4B). These data indicate that metastatic potentials of melanoma to specific organs depend on the cell line.

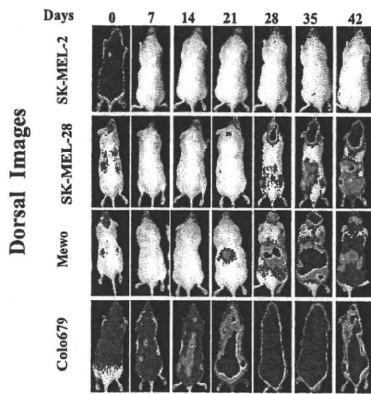


Figure 4A. Melanoma cell lines - *in vivo* luciferase imaging

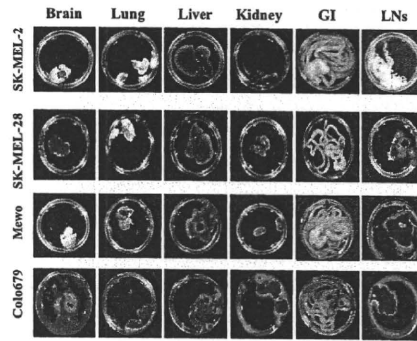


Figure 4B. *Ex vivo* bioluminescent inspection

We further investigated other cell lines. While human colon cancer HT-29 cells accumulated significantly in the liver of mice (Figure 5), breast cancer MDA-MB-231 cells showed bone metastasis in addition to metastasis to the brain, lungs and lymph nodes (Figure 6). These profiling data of hematogenous metastasis suggest that human cancer cell lines conserve their own favorite metastatic sites even in mice (beyond the species). Notably, reflecting the clinical features of melanoma and breast cancer, some of the cell lines showed preferential metastasis to the brain of NOD/SCID mice.

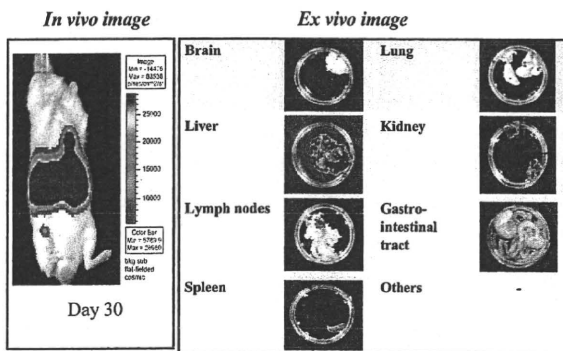


Figure 5. Metastatic fate of luc-HT29 colon cancer cells

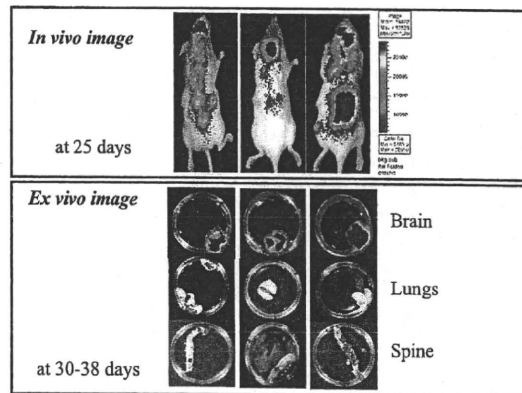


Figure 6. Metastatic fate of luc-MDA-MB-231 breast cancer cells

4. DISCUSSION

4.1 BLI for Cancer stem cells

There appear to be characteristics common to both tumor cells and normal stem cells, referred to as *stemness*. The hallmark traits of stem cells—self-renewal and differentiation capacity—are reflected by the high proliferative capacity and phenotypic plasticity of tumor cells (13). Since the initial concept of cancer stem cells in solid tumor was established using NOD/SCID mice, we had to employ the animals to apply the luciferase-expressing cell resources to the theory of cancer stem cells. Our recent BLI-based experimentation suggested that a subpopulation of cancer stem cells is essential for organ-selective cancer metastasis (Figure 7).

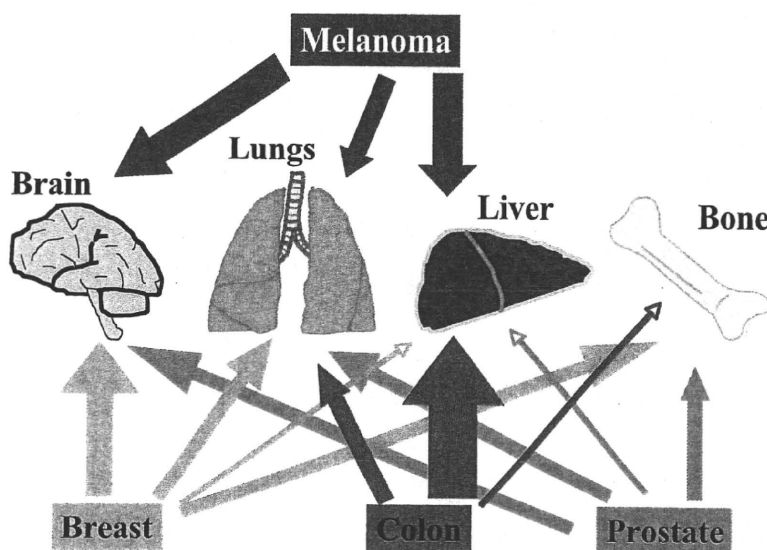


Figure 7. Cancer cells appear to have their own favorite organs for metastasis

4.2 Organ-specific cancer metastasis and chemokines

Approximately 10–20% of all systemic malignancies will eventually metastasize to the brain (14). Despite the high frequency of metastatic brain tumors, there is no accepted paradigm for effective treatment. Accumulating clinical data suggest that the interaction between chemokines and their receptors is a critical component for regulation of tumor progression and metastasis in many cancer types (8, 15), and that the CXCR4/CXCL12 pathway is involved in the metastatic process (15). However, the pathophysiology in brain metastasis is not fully understood due to the difficulty of creating appropriate animal models. Therefore, BLI in conjunction with high-frequency US imaging should allow various preclinical studies at tumor-normal brain interfaces.

5. CONCLUSIONS

High-frequency ultrasound imaging can guide the injection of human cancer cells accurately into the left ventricle of mice, and applications of this technique for bio-luminescent imaging will elucidate the nature of hematogenous cancer metastasis. Combining cell resources with an appropriate animal model will promote a better and profound understanding of human cancer cell biology. However, progress always involves an innovative process. Therefore, advances in optical imaging should provide a new platform to accelerate development of therapeutic strategies for human cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant to T.M. from the Health and Labour Science Research Grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare (Research on Biological Resources 08062877), and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan, and by a grant from the "Strategic Research Platform" for Private Universities: matching fund subsidy from MEXT.

REFERENCES

1. Nicolson, G. L., "Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis" *Cancer Metastasis Rev* 12, 325-343 (1993).
2. Sahai, E., "Illuminating the metastatic process," *Nat Rev Cancer* 7(10), 737-749 (2007).
3. Cranmer, L. D., Trevor, K. T., Bandlamuri, S., Hersh, E. M., "Rodent models of brain metastasis in melanoma," *Melanoma Res* 15(5), 325-356 (2005).
4. Wu, J.C., Chen, I. Y., Sundaresan, G., Min, J. J., De, A., Qiao, J. H., Fishbein, M. C., Gambhir, S. S., "Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography," *Circulation* 108(11), 1302-1305 (2003).
5. Foster, F. S., Pavlin, C. J., Harasiewicz, K. A., Christopher, D.A., Turnbull, D.H., "Advances in ultrasound biomicroscopy," *Ultrasound Med Biol* 26(1), 1-27 (2000).
6. Hoffman, R. M., "The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo," *Nature Rev Cancer* 5, 796-806 (2005).
7. Negrin, R.S., Contag, C.H., "In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease," *Nat Rev Immunol* 6, 484-490 (2006).
8. Murakami, T., Maki, W., Cardones, A. R., Fang, H., Tun Kyi, A., Nestle, F. O., Hwang, S. T., "Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells," *Cancer Res* 62, 7328-7334 (2002).
9. Sato, A., Ohtsuki, M., Hata, M., Kobayashi, E., Murakami, T., "Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models," *J Immunol* 176, 7686-7694(2006).
10. Yanagisawa, S., Kadouchi, I., Yokomori, K., Hirose, M., Hakozaiki, M., Hojo, H., Maeda, K., Kobayashi, E., Murakami, T., "Identification and metastatic potential of tumor-initiating cells in malignant rhabdoid tumor of the kidney," *Clin Cancer Res* 5, 3014-3022 (2009).
11. Kobayashi, Y., Ohtsuki, M., Murakami, T., Kobayashi, T., Sutheesophon, K., Kitayama, H., Kano, Y., Kusano, E., Nakagawa, H., Furukawa, Y., "Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) suppresses the Ras-MAP kinase signaling pathway by up-regulation Rap1 and induces apoptosis in malignant melanoma," *Oncogene* 25, 512-524 (2006).
12. Murakami, T., Sato, A., Chun, N. A. L., Hara, M., Naito, Y., Kobayashi, Y., Kano, Y., Furukawa, Y., Kobayashi, E., "Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma," *J Invest Dermatol* 28(6), 1506-1516 (2008).
13. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L., "Stem cells, cancer, and cancer stem cells," *Nature* 414, 105-111 (2001).
14. Nussbaum, E. S., Djalilian, H. R., Cho, K. H., Hall, W. A., "Brain metastases. Histology, multiplicity, surgery, and survival," *Cancer* 78, 1781-1788 (1996).
15. Murakami, T., Cardones, A. R., Hwang, S.T., "Chemokine receptors and melanoma metastasis," *J Dermatol Sci* 36, 71-78 (2004).

Functional molecular imaging of ILK-mediated Akt/PKB signaling cascades and the associated role of β -parvin

Mariko Kimura^{1,2,*}, Takashi Murakami^{2,*}, Shinae Kizaka-Kondoh³, Masayuki Itoh⁴, Keiji Yamamoto¹, Yukihiko Hojo¹, Makoto Takano⁴, Kazuomi Kario¹, Kazuyuki Shimada¹ and Eiji Kobayashi²

¹Division of Cardiovascular Medicine, Department of Medicine, ²Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine and

⁴Division of Molecular Physiology and Biophysics, Department of Physiology, Jichi Medical University, Shimotsuke 329-0498, Tochigi, Japan

³Department of Molecular Oncology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan

*Authors for correspondence (mkimura@jichi.ac.jp; takmu@jichi.ac.jp)

Accepted 2 December 2009

Journal of Cell Science 123, 747-755

© 2010. Published by The Company of Biologists Ltd

doi:10.1242/jcs.052498

Summary

Visualization and quantification of the dynamics of protein-protein interactions in living cells can be used to explore the macromolecular events involved in signal transduction processes. In this study, functional molecular imaging using a luciferase-based complementation method demonstrated how the integrin-linked kinase (ILK)-mediated protein complex controls downstream signals. The luciferase complementation assay showed that Akt1 preferentially binds to β -parvin rather than to ILK within the complex. Moreover, photon flux from the interaction between β -parvin and Akt1 increased following serum stimulation, and the β -parvin-Akt1 interaction was dependent on phosphoinositide 3-kinase. Intriguingly, small interfering (si)RNA-mediated β -parvin knockdown increased photon flux from the interaction between ILK and Akt1, leading to stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α and increased expression of vascular endothelial growth factor-A. These data from functional molecular imaging demonstrated that β -parvin plays a regulatory role in the ILK-mediated Akt (also called protein kinase B) signaling cascades, suggesting that β -parvin might be a crucial modulator of cell survival.

Key words: β -parvin, Molecular imaging, Integrin-linked kinase, Hypoxia-inducible factor, Luciferase

Introduction

Extracellular signaling is commonly mediated through mechanisms that rely on protein-protein interactions and protein phosphorylation. The dynamics of protein-protein interactions are often dependent on the activation of a particular signal transduction pathway. Even a single protein can affect various cellular functions by interacting with different partners in response to extracellular stimuli.

Recent advances in the development of molecular probes have enabled the visualization of many cellular processes and the detection of protein-protein interactions in living cells, advances typified by the fluorescence resonance energy transfer (FRET) system (Förster, 1959), in addition to complementary methods using fluorescence (Hu et al., 2002) or luminescence (Luker et al., 2004). These complementary methods designed to visualize protein-protein interactions have recently been employed in the screening of interaction partners and the potential semi-high-throughput analysis of small modulator molecules in protein complexes (Kerppola, 2006a; Kerppola, 2006b). In particular, luciferase-based complementation imaging enables sensitive real-time monitoring and quantitative analysis of protein interactions under various cellular conditions (Luker et al., 2004).

Integrins and their associated proteins mediate various intracellular signaling pathways involved in cytoskeletal remodeling and cellular processes such as cell proliferation, survival and differentiation. Integrin-linked kinase (ILK), PINCH and parvin(s) form heterotrimeric complexes that function as important regulators of integrin-mediated signaling. The complex comprising ILK, PINCH and parvins has been implicated in mediating intracellular

signaling pathways through phosphorylation of the leading downstream molecule Akt (also known as protein kinase B; PKB) (Legate et al., 2006). ILK-dependent target phosphorylation is largely regulated by phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Akt/PKB activation requires phosphorylation of Thr308 by PI3K-dependent kinase-1 (PDK1) (Alessi et al., 1997; Williams et al., 2000) and Ser473 by PDK2 [which is also known as hydrophobic motif kinase (HMK)] (Feng et al., 2004; Troussard et al., 2003). ILK is capable of controlling vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription through Akt/PKB phosphorylation (Tan et al., 2004). ILK kinase activity is also stimulated by VEGF and other growth factors, as well as by cell adhesion to the extracellular matrix (Attwell et al., 2003).

Parvins are a family of proteins involved in linking integrins and their associated proteins with intracellular pathways that regulate actin cytoskeletal dynamics and cell survival. It includes actopaxin/CH-ILKBP/ α -parvin (ParvA), affixin/ β -parvin (ParvB) and γ -parvin (ParvG). ParvB localizes to focal adhesions and is involved in cell adhesion, spreading, motility and survival through interactions with its partners. ParvB accumulates and co-localizes with ILK in heart and skeletal muscle (Bendig et al., 2006; Yamaji et al., 2001). It can inhibit ILK activity and reverse some oncogenic effects in cancer cells (Mongroo et al., 2004). Furthermore, the physiological interaction of ILK with ParvB is thought to be essential in maintaining cardiac contractility (Bendig et al., 2006). Nonetheless, the precise role of ParvB and the mechanism controlling the association of ILK and ParvB remain to be delineated.

Herein, we demonstrate that luciferase complementation imaging provides a useful strategy for the instantaneous monitoring of protein-protein interactions under serum stimulation. Employment of this system enabled the detection of limited protein-protein interactions, showing that ParvB preferentially interacts with Akt1, and inhibits the interaction between ILK and Akt1 under normal cell culture conditions. ParvB knockdown using small interfering (si)RNA increased VEGF expression, with concomitant stabilized expression of hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α). Based on these findings, we propose that ParvB functions as an upstream modulator of Akt/PKB through ILK, Akt/PKB and HIF-1 α signaling.

Results

Fluorescence complementation assay for protein-protein interactions involving ILK and associated proteins

It has been demonstrated that ILK protein complexes play a crucial role in regulating gene transcription and cell-cell adhesion. Molecular complementation methods were employed in an effort to detect real-time protein-protein interactions of ILK protein complexes with ParvB, PINCH1 and Akt1 (Fig. 1A). A fluorescent (or luminescent) probe was split into N-terminal and C-terminal probe fragments, each of which was attached to the N terminus or C terminus of the target protein using a linker. The optimal combination for each target protein-protein interaction leads to integration of the N-terminal and C-terminal probe fragments and light is emitted (Fig. 1A, right panel). To determine the optimal pairs of plasmids, four expression plasmids were constructed for each target protein fused with fluorescent (monomeric Kusabira-Green: mKG) or luminescent (firefly luciferase: Luc) N-terminal or C-terminal probe fragments using a linker (Fig. 1B). Protein interactions were investigated for structural conformations comprising ILK and ParvB, ILK and PINCH1, ILK and Akt1, ParvB and Akt1, and PINCH1 and Akt1. As shown in Fig. 1C, eight combinations per pair were tested to determine the optimal conformation in the living cell. The appropriate pairs of constructed plasmids were then co-transfected into 293T cells, which were then inspected using a fluorescent microscope under excitation light. One optimal pair with respect to target protein interactions was selected from among the eight combinations based on signal intensity. The optimal pairs for an mKG probe were N-ILK-linker-mKGC and N-ParvB-linker-mKGN (Fig. 1B: construct type 2 for ILK and construct type 1 for ParvB), mKGC-linker-ILK-C and mKGN-linker-PINCH1-C (construct type 4 for ILK and construct type 3 for PINCH1), N-ILK-linker-mKGN and N-Akt1-linker-mKGC (construct type 1 for ILK and construct type 2 for Akt1), N-ParvB-linker-mKGC and mKGN-linker-Akt1-C (construct type 2 for ParvB and construct type 3 for Akt1). The numbers represent the same four types of plasmids as in Fig. 1B. The plasmids encoded an unrelated protein and single plasmids did not show substantial fluorescent signals (Fig. 1D, lower six panels). Whereas the combination of ILK with ParvB or PINCH1 gave steady fluorescent signals in the cytosol (Fig. 1D, upper left panels), the combination of ParvB with Akt1 yielded stronger fluorescent signals than those yielded by the combination of ILK with Akt1 (Fig. 1D, upper right panels). The combination of PINCH1 with Akt1 did not generate substantial fluorescent signals in this assay (data not shown). In an effort to confirm the interaction between ParvB and Akt1, we performed a GST pull-down assay. Although a direct interaction between ParvB and Akt had not been reported before this study, the GST pull-down assay demonstrated that ParvB interacts directly with Akt1 (Fig. 1E). These results suggest that ParvB preferentially interacts with Akt1 and that ParvB might serve as a connecting molecule for ILK-mediated Akt/PKB signal transduction.

Luminescence complementation assay for protein-protein interactions involving ILK and associated proteins

Although a variety of methodologies have been developed for the investigation of protein interactions (Kerppola, 2006a; Kerppola, 2006b), the luciferase-based complementation assay system potentially enables straightforward and real-time quantitative analysis in living cells (Luker et al., 2004; Paulmurugan et al., 2002). As with the fluorescence complementation assay, polypeptide ends, which can adopt a broad range of intermolecular orientations, might be problematic in terms of luciferase complementation imaging (Kerppola, 2006a; Kerppola, 2006b). Optimal luciferase complementation was investigated based on results derived from fluorescence complementation assays (see Fig. 1). The optimal N- and C-terminal fragments of firefly luciferase cDNA (NLuc and CLuc, respectively) were isolated by PCR, in which NLuc and CLuc correspond to firefly luciferase amino acids 2-416 and 398-550, respectively (Luker et al., 2004). Four fusion constructs were generated for each target protein using the NLuc and CLuc cDNA fragments (see Fig. 1B). Luciferase activity was then investigated by examining target protein-protein interactions. Expression plasmid pairs were transiently transfected into 293T cells. For the control transfection, only NLuc or CLuc was employed. To determine which pair generated optimal luminescent signals, the relative luciferase activity for each target protein interaction was examined. As shown in Fig. 2A-D, the optimal pairs were as follows: NLuc-linker-ILK-C and CLuc-linker-ParvB-C (construct type 3 for ILK and construct type 4 for ParvB), CLuc-linker-ILK-C and NLuc-linker-PINCH1-C (construct type 4 for ILK and construct type 3 for PINCH1), NLuc-linker-ILK-C and N-Akt1-linker-CLuc (construct type 3 for ILK and construct type 2 for Akt1), and NLuc-linker-ParvB-C and CLuc-linker-Akt1-C (construct type 3 for ParvB and construct type 4 for Akt1). Numbers represent the same four types of plasmids as in Fig. 1B. Single plasmids fused with only NLuc or CLuc cDNA did not show substantial luminescent signals. In order to validate actual expression levels of ParvB and Akt1 protein, 2 μ g of the constructed plasmid DNA was transfected into 293T cells seeded in 12-well plates. ParvB and Akt protein expression levels were analyzed by western blotting (supplementary material Fig. S1). N-terminally fused forms of Akt1 protein, NLuc-linker-Akt1-C and CLuc-linker-Akt1-C, were detected in two cleaved fragments. It has been demonstrated that Akt can be cleaved by recombinant caspase 3 at aspartic acid residues 108 and 119, resulting in the generation of a 44 kDa pleckstrin-homology (PH) domain deficient fragment (Bachelder et al., 2001; Rokudai et al., 2000). One fragment appeared to be the PH domain of Akt1 fused with a split-luciferase probe, which was detectable using anti-luciferase antibody, and the other seemed to be the kinase domain of Akt1. These data indicated that the appropriate plasmid pair exclusively provided optimal luminescent signals.

Real-time quantitative analysis of protein-protein interactions using a luciferase-based luminescent complementation assay

In an effort to determine the kinetic pattern of the ILK-ParvB and ILK-PINCH1 interactions, each optimal pair of plasmids was transfected into 293T cells in a 24-well plate. Emitted photons were measured for 30 minutes at 30 second intervals in the presence of D-luciferin using a NightOwl charge-coupled device camera. Maximal luminescence emitted from each well was observed at five to ten minutes. The photon count derived from the association of ILK with ParvB displayed a larger increase than that derived from