

セミ・インタクト細胞を利用した情報伝達分子システムの再構成と1分子反応解析

●佐甲 靖志¹⁾ ◆村田 昌之²⁾

1) 大阪大学大学院生命機能研究科 2) 東京大学大学院総合文化研究科(2003年度のみ)

〈研究の目的と進め方〉

細胞内分子システムの再構成系を構築し、再構成系内で分子ダイナミクスと分子間相互作用キネティクスを1分子計測する方法を開発することを目的として研究をおこなった。精製した生体分子を集積させて細胞構造を再現することは困難なので、生細胞から要素を減らすことで再構成系を構築する方法（トップダウン法）を採用した。細胞膜を膜透過性にし、細胞内構造を保ったまま細胞質を交換するセミ・インタクト細胞技術に依るものである。再構成した細胞内で、蛍光1分子可視化法を用いて情報分子間の相互作用を定量的に計測することで、分子システムの作動原理を解明することが長期的な目標である。種々の細胞内分子システムに応用可能な汎用的方法の開発を最終的な目標とするが、その第一歩として、EGF-Ras-MAPKシステムの再構成を試みた。このシステムは細胞内情報伝達系のプロトタイプのひとつであり、多くの文献情報と遺伝子資源の蓄積を活用できるからである。

EGF-Ras-MAPKシステムは、細胞増殖信号を処理する細胞内分子システムである。このシステムの内、新規遺伝子発現に至る情報の流れ、すなわち細胞外リガンドEGFと細胞膜受容体の結合に始まり、低分子量G蛋白質Rasの活性化、MAPキナーゼカスケードの情報伝達をへて細胞質に存在するリン酸化酵素ERKが活性化して核内に移行するまで、を再構成することを具体的目標とした。必要最小限の要素はEGF、細胞膜とEGF受容体Rasを含む膜蛋白質、核、および細胞質蛋白質Grb2, Sos, Raf1, MEK, ERKである。再構成系の評価は反応の最終段階であるERKの一過性核移行の再現、および中間段階としてEGFRのリン酸化、Raf1の細胞膜への移行などを指標とすることにした。

初期条件、境界条件を自由に操作できる再構成系を構築して、システムの反応パラメータを1分子計測で精密に決定することにより、分子システムの作動原理の解明への足がかりを作ることを目指した。

〈研究開始時の研究計画〉

セミ・インタクト細胞調整技術の最適化

細胞構造や膜機能を保持したまま、膜透過性を上げる条件を検討する。

EGF-Ras-MAPKシステムの再構成系の開発

蛍光標識したERK(MAPK)タンパク質をセミ・インタクト細胞に導入し、EGF依存的に核移行を起こさせる条件を検討する。

EGF受容体のリン酸化反応計測

セミ・インタクト細胞で、EGF依存的な受容体のリン酸化反応を起こし、1分子計測技術を用いて、EGF結合量と受容体リン酸化量の関係を解析する。

再構成細胞内での分子反応速度計測法の開発

セミ・インタクト細胞内で、タンパク質間相互作用の計測、すなわち2タンパク質間の結合速度定数、解離速度定数の決定を可能にする。

〈研究期間の成果〉

セミ・インタクト細胞調整技術の最適化

セミ・インタクト技術の困難のひとつは、細胞構造・機能を保持したまま、かつ効率よく膜透過が起こる条件の作成にある。種々のセミ・インタクト細胞作成技術を検討し、温度感受性を利用した反応制御が可能なSLO法を利用することにした。SLOの精製法、細胞処理濃度、時間、温度を検討し、反応条件を最適化した。(2,4)

EGF-Ras-MAPKシステムの再構成系の開発

ヒト上皮由来の培養細胞A431からSLO処理によりセミ・インタクト細胞を調整した。同様の由来を持つHeLa細胞より細胞質を別途調整し、さらに大腸菌で発現・精製したMEK1 (MAPKK), シアン蛍光タンパク質(CFP)とERK2 (MAPK)の融合タンパク質CFP-ERK2、ATP, GTP, およびクレアチンリン酸とクレアチンキナーゼからなるATP再生系を添加して人工細胞質とし、セミ・インタクト細胞内に導入した。

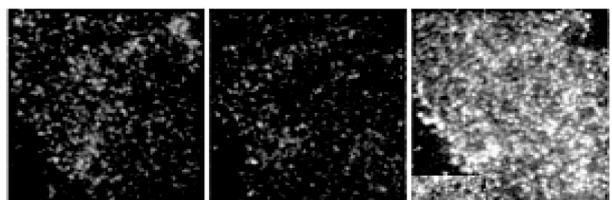
MEK1非存在下では、CFP-ERK2の蛍光は核に濃縮し、これはMEK1存在下ではERK2とMEK1が細胞質で複合体を形成することによりERK2のリン酸化（活性化）非依存的な核移行を阻害していることによると考えられる。MEK1をERK2と等量以上添加することにより、CFP-ERK2の核移行は抑えられた。

セミ・インタクト細胞をあらかじめEGFで処理し、その後MEK1, CFP-ERK2を含む人工細胞質を与えると、CFP-ERK2の核移行が起こった。すなわちEGF依存的なCFP-ERK2の核移行が起こる再構成系のプロトタイプが完成した。

EGF受容体のリン酸化反応計測

EGF-Ras-MAPKシステムの反応中間段階として、EGF受容体の活性化（リン酸化）反応の1分子計測を行った(1, 5)。EGF受容体はEGFの結合で構造変化し、特殊な2量体状態を作ることによって、細胞質部分のチロシンリン酸化酵素活性によって、2量体中で互いにリン酸化し合う。チロシンリン酸化した状態が活性化型である。

セミ・インタクト細胞を蛍光色素標識したEGFで刺激し、ATP存在下でEGF受容体の自己リン酸化反応が起こることを、リン酸化型受容体に対する抗体を使って検出した(図)。抗体を一価のFab断片とし、EGFとは異なる色の蛍光色素で標識してEGFと同時に1分子観察することにより、EGFの結合と受容体の活性化の入出力関係を1分子計測することが可能になった。



EGF受容体リン酸化の1分子計測:左、EGFの1分子画像、中、右:活性化型受容体の1分子画像、反応開始直後(中)と30分後(右)

同様の計測を生細胞で行った場合、細胞を固定して膜を可溶化しなければ抗体を細胞内に導入できないため、同一細胞で反応ダイナミクスを計測することは不可能である。

同時計測により、EGFの結合部位の約30%のみが活性化型となり、残りは直接の反応に関与しないこと、一方で活性化型受容体の数は反応開始後30分でEGF結合数の4倍程度まで増加することが明らかになった。EGF結合部位の周辺にはEGFの結合していない活性化型受容体のクラスターが形成されたが、クラスターの平均分子数は3程度で、クラスターを形成する受容体分子の集合・離散が終始起こっていることが観察された。このような現象は、EGF結合により一次的に活性化した受容体が、他の受容体分子との動的な相互作用を利用してEGFの結合していない受容体を二次的に活性化する情報増幅機構が存在することを示している。

生細胞を用いた実験では、細胞種によって増幅率が大きく異なることが明らかになったが、セミ・インタクト細胞での計測により、増幅率は受容体の細胞膜密度よりも細胞質因子(脱リン酸化酵素)によって制御されていることが明らかになった。

再構成細胞内での分子反応速度計測法の開発

EGF-Ras-MAPKシステムの前半部すなわちEGFと受容体の結合から、Raf1のRas-GTP認識反応までは細胞膜で起こる分子間相互作用である。異なった蛍光色素で標識した2種の分子間の共局在を利用して、再構成細胞の細胞膜でおこる分子反応を計測する方法を開発し、活性化型EGF受容体とそれを認識するアダプター分子Grb2の結合解離反応の計測に応用した。

Grb2を大腸菌に発現させて精製し、N末端に蛍光色素を化学反応させ、蛍光色素と1:1標識された分画を精製した。別種の蛍光色素で1:1標識したEGFでセミ・インタクト細胞膜の受容体を活性化し、個々のEGF結合部位を同定した。Grb2を加えて、EGF結合部位を観察し、個々の結合部位に対するGrb2分子の結合解離の時系列データを得ることができた。1回の結合・解離に要する時間を個別に計測し、多数の結合時間・解離時間を集めて時間分布を反応モデルから予想される関数に近似することにより、反応パラメータを計測することができた(2)。セミ・インタクト細胞を利用することにより、既知のGrb2濃度で計測できることが結合速度定数を求める上で必須である。この方法は他の分子間相互作用の計測にも応用できる(6)。

国内外での成果の位置づけ

EGF-Ras-MAPKシステムにはおそらく数十種類以上の蛋白質・低分子化合物が関与しており、哺乳類細胞に由来する再構成系において、これほど大がかりな蛋白質分子ネットワークの反応が再構成されたことは、おそらく初めてである。再構成系においては、各要素の改変、濃度の制御、標識の導入などが自由に行える。また、1分子蛍光計測で分子間相互作用パラメータを、反応ネットワーク中で定量できることを示した。本研究の方法は、細胞内蛋白質ネットワーク一般に応用可能であり、従来困難であった蛋白質相互作用ネットワークの解析に利用できる。分子ネットワークの定量的な解析は、細胞機能のインシリコシミュレーションと相補的な方法であり、シミュレーションモデルの改良や、予測の検証に有用であろう。EGF-Ras-MAPKシステムは分子システムシミュレーションでしばしば取り上げられるようになっている。細胞内1分子計測法への関心は国際的にも徐々に高まっ

ており、様々な国際シンポジウムやワークショップが開催されるようになった。2006年4月には沖縄で我々の組織する国際ワークショップも開催される。また、細胞内1分子計測技術の取得のため、インド、中国あるいは日本国内などから我々の研究室へ多くの研究者を受け入れている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

セミ・インタクト細胞の安定な作成法、活性を保った細胞質の精製など困難の連続であり、実験系のプロトタイプを完成することができたものの、今後実験系をさらに改良する必要がある。現在、村田らによってセミ・インタクト細胞作成の自動化が進められており、期待している。

〈今後の課題〉

本研究では、EGF-Ras-MAPKシステムをセミ・インタクト細胞のなかに再構成することに成功した。今後の課題は、この再構成系を用いて、分子ダイナミクスと分子間相互作用キネティクスの1分子計測により、分子ネットワークの入出力特性を定量し、ネットワークの構造と機能に関する情報を得ることである。

システムの種々の素反応に入力を与え、対応する出力を定量的に解析することが必要である。セミ・インタクト細胞の利点は、反応系の構成要素や濃度を自由に操作できること、一部の反応システムを停止させることにより、生細胞では不可能な定常状態を実現して詳細な反応解析を行うことができることなどにある。再構成系において、我々が従来開発してきた細胞内蛍光1分子計測法を用いて、細胞内分子システムの反応パラメータを精密に決定することができる。1分子計測では、パラメータの平均値だけでなく、分布やゆらぎを測定することが可能である。

計測結果からネットワークモデルを構築し、計算機実験を行うことにより、実際の細胞での計測と計算機実験の結果を相互にフィードバックし、観察・予測された現象を検証することも必要である。

以上のような研究から、細胞内分子ネットワーク解析の新たな方法論を完成させ、制御工学的なシステム論とは異なった生命システムの作動原理を発見したい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文/プロシーディング

- 1) 404052117.
Sako, Y. and Yanagida, T. (2003) Single-molecule visualization in cell biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, SS1-5.
- 2) 404052120.
Sako, Y., Ichinose, J., Morimatsu, M., Ohta, K., signaling processes of epidermal growth factor receptor. *J. Pharmacol. Sci.*, 93, 253-258.
- 3) 404052122.
Murai, T., Miyazaki, Y., Nshinakamura, H., Sugahara, K. N., Miyauchi, T., Sako, Y., Yanagida, T., and Miyasaka, M. (2004) Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J. Biol. Chem.*, 279, 4541-4550.
- 4) 602071100.
Ichinose, J. and Sako, Y. (2004) Single-molecule measurement in living cells. *Trends Anal. Chem.* 23. 587-594.

5) 602071104.

Ichinose, J., Murata, M., Yanagida, T. and Sako, Y. (2004) Single molecule observation of amplification of EGF receptor activation in semi-intact A431 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1143-1149.

6) 602062142.

Tani, T., Miyamoto, Y., Fujimori, K., Taguchi, T., Yanagida, T., Sako, Y. and Harada, Y. (2005) Trafficking of ligand-receptor complex on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of the axon: a single-molecule analysis. *J. Neurosci.* 25, 2181-2191.