

## 情報伝達分子システムの再構成系における 1 分子反応解析

●佐甲 靖志

理化学研究所細胞情報研究室

### <研究の目的と進め方>

細胞内分子システムの再構成系等を用いて、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する。細胞増殖情報を処理する EGF-Ras-MAPK システムの反応ダイナミクスと応答関数、システムを伝達するゆらぎ（ノイズ）の解析を行い、さらにゆらぎの計測を利用した分子システム解析法の開発を試みる。さらに、細胞の高次機能を操作可能な状態に再構成し、定量的な反応解析を行うことを目標とする。反応の初期条件、境界条件を操作しつつ、細胞内分子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、計算機シミュレーションの精度やモデルの確実性を高めるとともに、相互で観察・予測された現象を検証しあうことを可能とする。以下の 2 項目が具体的な研究課題である。

### EGF-Ras-MAPK システムの応答解析

EGF-Ras-MAPK システムの最終段階の情報分子である ERK(MAPK) は MEK(MAPKK) によるリン酸化を受けて活性化し、核内へ集積する（下図）。ERK の核移行量を出力として、EGF 受容体への EGF の結合数（入力）を変化させて、システムの入出力応答関係を解析する。EGF 受容体（EGFR）、Ras の活性化はそれぞれ Grb2、Raf1 の膜移行量で計測する。平均値計測だけでなく、細胞間の応答の分布や、1 細胞の応答の時間変動から、入力数の違い（外因性ノイズ）による出力変動、一定入力時の内因性ノイズによる出力の変動を解析する。

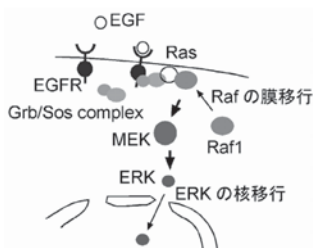
### 構成要素の改変によるシステムの応答特性変化の解析

システムに含まれる蛋白質の濃度や活性を改変し、信号、ノイズの伝達がどのように変化するかを明らかにする。活性の改変は人工変異体の導入によって行う。また、細胞質要素に関しては、各構成要素蛋白質を精製し、完全再構成系を作成することによって、他の情報伝達システムとのクロストークを評価することを目指す。さらに、単独あるいは複数の蛋白質相互作用を *in vitro* や大腸菌内に再現し、素反応過程のより詳細な解析を行うとともに、蛋白質間相互作用による人工反応回路の構成を試みる。

### < 2007 年度の研究の当初計画 >

#### EGF-Ras-MAPK システムの応答解析

我々は、ヒト上皮ガン細胞由来の培養細胞 A431 をストレプトリシン O (SLO) 処理することにより調整したセミンタクト細胞に、別途調製した細胞質画分、ATP、ATP 再生系 GTP、CFP-



EGF-Ras-MAPK システムの模式図：細胞膜の受容体に結合した EGF の情報は活性化されたリン酸化酵素 ERK の細胞質から核への移行として核内に伝えられる。

ERK2 および MEK1 を加え、EGF、ATP の両者に依存して CFP-ERK の細胞核移行が起こる再構成系を構築した。この再構成系の入力（EGF）と出力（ERK の核移行）を定量し、ERK の核移行反応が  $KM=0.56$  nM, Hill 係数  $>10$  という過剰応答性の反応であることがわかっている。

EGF-Ras-MAPK システムの過剰応答性の起源を明らかにするため、再構成系において EGFR の活性化と Ras の活性化を計測する。また、生細胞においても同様に EGFR, Ras, MAPK の活性化を計測する。

### 構成要素の改変によるシステムの応答特性変化の解析

再構成系に人工変異蛋白質分子を導入し、応答関数の制御を試みる。また、MAPK システムの反応を大腸菌内に再構成し、ERK の活性化において予想されている双安定性の検証と、反応特性制御を行う。

### < 2007 年度の成果 >

#### EGF-Ras-MAPK システムの応答解析

EGF の結合した受容体は相互リン酸化によって活性化される。このリン酸化を特異的に認識する細胞質蛋白質 Grb2 に蛍光色素 (Cy3) 標識を施して再構成系に導入することにより、EGF の活性化を 1 分子計測で定量できる。細胞膜上で EGFR と MAPK カスケードの中間に位置する Ras の活性化も同様に、活性化された Ras を認識して結合する細胞質蛋白質 RalGDS の Ras 認識部位 (RBD) に GFP を融合した GFP-RalGDSRBD によって計測できる。

生細胞内においても、EGFR の活性化を GFP-Shc の細胞質から細胞膜への移行、Ras の活性化を GFP-Raf の細胞質から細胞膜への移行、ERK の活性化を GFP-ERK の細胞質から核への移行によってそれぞれ計測できる。

本年度はまず、これらの計測に必要な蛍光標識蛋白質や、GFP 融合蛋白質を作製し、また、GFP 融合蛋白質を安定に発現する細胞 (HeLa および PC12) を樹立した。

再構成系における計測では、生細胞で EGFR の活性化が脱リン酸化や細胞内への取り込みと消化により一過性にしか起こらないのに対し、定常的な入力状態を実現することができるため、1 分子計測を利用して定常状態での反応ゆらぎを利用した計測が可能である。単位面積当たりの Cy3-Grb2 あるいは GFP-RalGDSRBD の結合分子数変動を計測し、EGFR/Grb2 および Ras/RalGDS の情報伝達反応のゆらぎを計測したところ、平均結合量を 1 と規格化して、Grb2 では 0.008 の反応ゆらぎ (rms)、RalGDS では 0.02 の反応ゆらぎが観察された。また、後者の反応のゆらぎの時定数がより大きくなっていった。過剰応答性を示す反応カスケードにおいては、Shibata & Fujimoto の解析 (PNAS 102:331, 2005) により、カスケードの後段においてより大きくゆっくりした反応ゆらぎが現れることが予想されている。今回の結果は定性的にこれと一致しており、すなわち EGF-Ras-MAPK システムの過剰応答性において、従来他の経路で示されているような

MAPK カスケードの応答性に加えて、EGF-Ras システムによる寄与があることを示唆している。

一方生細胞における計測では、反応が最大値を迎える時間を EGF 濃度の関数として表すと、その細胞間ゆらぎ (SD/average) は、Shc, Raf においては 0.3 nM EGF, ERK では 3 nM に最大値を持ち、これらの濃度付近で大きな傾きを持つ過剰応答性の存在が示唆された。これらの濃度値は再構成系における過剰応答性の閾値 0.56 nM に近く、再構成系と生細胞で一致した結果が得られたことは、再構成系の妥当性を示している。また、反応経路の上流 (Shc)・中流 (Raf) と下流 (ERK) が異なる閾値を持つことが示唆されたが、上・下流の過剰応答性による過剰ノイズを下流に伝えないために、閾値のズレが生じていることを予想させる。

また、生細胞中で反応の持続時間の細胞間ゆらぎを計測したところ、低濃度 (< 0.03 nM) EGF の側で中流域のゆらぎが下流に比べて大きいことがわかった。反応持続時間は主として不活性化(この場合 GTPase または脱リン酸化) 反応の速度で決定されていると考えられるが、不活性化反応においても上流の反応ゆらぎを容易には下流に伝えられないような反応システムが存在すると思われる。

#### 構成要素の改変によるシステムの応答特性変化の解析

再構成系の構成要素を改変し、システムの応答に対する影響を調べるため、点変異体の作製および反応解析を行った。

EGFR の変異体として、Grb2 に対する主要な結合部位のうちチロシン 1068 をフェニルアラニン置換したものを大阪大学微生物病研究所、岩本了氏より供与して頂き、再構成系で Grb2 との認識反応解析をおこなった。その結果、野生型では結合反応、解離反応ともに多状態性が見られるが、結合反応の多状態性は局所的な結合部位の差異ではなく、全体的な分子構造に基づいていること、解離反応の多状態性は、EGFR と Grb2 の衝突頻度に依存していることなどが明らかになった (論文1)。

また、Raf1 の変異体として、セリン 621 のアラニン置換体 (S621A) およびシステイン 168 のセリン置換体 (C168S) を作製した。S621A, C168S はそれぞれ分子内相互作用および 14-3-3 との相互作用部位と言われる部分の変異体である。これらの変異体は Raf の構造を変え、Ras との認識および活性化反応に影響を与えると予想される。1 分子計測によって、これらの変異体分子の構造が実際に野生型と異なっていることが示された。

MAPK システムの大腸菌内再構成に関しては、恒常的活性化型 MEK (ERK のリン酸化工素)、MKP3 (ERK の脱リン酸化酵素) および ERK を大腸菌内で発現制御可能なプロモータ下流ヘクロニングした。また、ERK の活性化反応を解析するための反応シミュレータを構築した。このシミュレータは分子の少数性による反応ゆらぎを取り扱うため、マスター方程式に基づいている。

#### <国内外での成果の位置づけ>

ゲノム情報を有効に利用し、生命システムを解明するためには、細胞の高次機能を操作可能な状態に再構成し、定量的な反応解析を行うことが必要である。本研究はこれを目標としている。

我々が開発する実験法は、近年盛んになっている分子システムの計算機シミュレーションと相補的なものである。すなわち、初期条件、境界条件を自由に操作できる再構成系において、細胞内分子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、計算機シミュレーションの精度やモデルの確実性を高めるとともに、相互で観察・予測された現象を検証しあうことが可能になる。

本研究で扱う EGF-Ras-MAPK システムは分子システムシミュ

レーションで最もよく取り上げられている反応系であるが、実際の細胞内での定量的計測は全く進んでいないと言って良い。本研究は情報伝達系において *in vivo* と *in silico* の生物学を定量的に対応づける研究例になると期待している。

大腸菌内における MAPK カスケードの再構成は、人工蛋白質分子回路を再構成する試みとしても新規なものである。近年、遺伝子発現ネットワークによる分子回路を大腸菌内に再構成することが盛んになっているが、蛋白質間の分子認識や酵素反応だけで再構成された人工反応回路は、まだほとんど報告例がない。新規遺伝子発現を必要とする回路に比べ、蛋白質反応だけで構成される回路は、高反応速度が期待され、反応系も単純であることから、独自の応用が開けて来るかもしれない。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

いずれの研究課題もそれなりに進行してはいるが、全体としては当初計画よりも遅れ気味である。昨年度の研究室異動に伴う構成員の減少の影響がまだ残っている。一方で、EGFR と Grb2 の再構成系における反応計測では、予想外の濃度依存性や反応記憶の存在などが見つかかり、蛋白質分子間認識という素反応レベルで細胞内情報処理が行われている可能性を示すことができた。

#### <今後の課題>

過剰応答性や双安定性など、EGF-Ras-MAPK システムの様々な箇所では非線形応答の存在が発見あるいは予想されている。非線形応答現象は生物の示す高次機能の根幹であり、その分子メカニズムの解明が生命システムの理解へ向けて重要である。

再構成系および生細胞中で EGF-Ras-MAPK システムの反応ゆらぎを計測するシステムが調ってきた。詳細な反応ゆらぎの解析と平行して、従来の技術による細胞内反応速度の計測を行い、両者の一致度を検証することから始めて、反応ゆらぎ計測によるシステム解析法を作製する。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

##### 1. 0801281540

Morimatsu, M., Takagi, H., Ota, K.G., Iwamoto, R., Yanagida, T. and Sako, Y.: Multiple-state reactions between the epidermal growth factor receptor and Grb2 as observed using single-molecule analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 18013-18018 (2007)

##### 2. 0801281546

Miyauchi, T., Yanagida, T., and Sako, Y.: Rho small GTPase regulates the stability of individual focal adhesions: a FRET-based visualization of GDP/GTP exchange on small GTPases. Biophysics, 3, 63-73 (2007)

##### 2) データベース/ソフトウェア

なし