

細胞内情報伝達の再構成系における非線形反応の解析

●佐甲 靖志

理科学研究所細胞情報研究室

<研究の目的と進め方>

再構成系と1分子計測などの可視化計測技術を用いて、細胞内情報処理システムに見られる非線形応答の分子機構を解明することが本研究の目的である。

種々の細胞内反応、特に細胞内情報処理反応では至る所で、過剰応答性（信号増幅）、時・空間的応答分化（極性形成）、振動（周期形成）、双安定性（記憶）などの非線形応答現象が観察される。これらの非線形応答現象は、反応システムを特徴付け、生物の示す高次機能の根幹となるものであり、その分子メカニズムの解明は生命システムの理解へ向けて特に重要な研究課題である。

我々は細胞増殖情報を処理するEGF-Ras-MAPKシステムを、細胞構造を保ったまま細胞膜を透過性にした細胞（セミ・インタクト細胞）内に再構成し、細胞内1分子可視化技術等を応用した反応計測を行ってきた。その結果、EGFと受容体の結合の正の協同性、受容体の活性化信号増幅、受容体とその活性化情報を読みとる細胞質蛋白質（Grb2）の認識反応における異常な濃度依存性、受容体の下流に位置するRasの活性化における、自発的な細胞極性形成、同じく受容体の下流に位置する細胞内カルシウム応答経路における、受容体分子間相互作用による過剰応答性など、EGF-Ras-MAPKシステムの細胞膜における情報処理に多くの非線形応答が関与していることを明らかにしてきた。

一方、EGF-Ras-MAPKシステムのうち細胞質に存在するMAPKカスケードは、類似の反応系が大きな過剰応答性を示すことが示されており、我々のセミ・インタクト細胞再構成系における計測結果も10を越えるHill係数を示した。また、最近になってMAPK(ERK)の活性化に双安定性があることが、数理モデルから予測された。MAPKカスケードの非線形応答性を詳細に解析するため、我々はERKの活性化反応を大腸菌内に再構成している。菌体を極小体積の試験管として利用することにより、内在的な蛋白質発現量ゆらぎや外来性の発現誘導によって多数の反応条件を自動的に生成させ、可視化により並列計測することが目的である。

本研究では、(1) EGF受容体の活性化増幅、(2) ERK活性化に見られる双安定性という2つの非線形応答現象を、それぞれセミ・インタクト細胞内および大腸菌内に再構成し、1分子計測、可視化計測によって非線形性の性質と、非線形性を生むメカニズムを解析する。

<2008年度の研究の当初計画>

1) EGF受容体の活性化反応の解析

EGF受容体のリン酸化と脱リン酸化を解析するための再構成システムを構築する。GFPを融合させたEGF受容体(EGFR-GFP)を安定発現する細胞株を安定発現する細胞をセミ・インタクト化し、リン酸化反応の基質となるATPおよびATP再生系と、脱リン酸化酵素、活性化を読みとるために蛍光色素標識したGrb2(Cy3-Grb)からなる人工細胞質を加える。EGFによって再構成系を刺激し、受容体のリン酸化反応を1分子計測する

EGFR-GFPの細胞膜上での動態(会合体分布と形成・解消、拡散運動)を1分子計測し、反応拡散モデルによって、細胞膜を

in silico再構成する。

2) ERKの活性化反応の解析

ERKはMEK(MAPKK)による2重リン酸化で活性化し、MKPによる脱リン酸化で不活性化する。2重リン酸化・脱リン酸化は、それぞれの反応に過剰応答性をもたらす、両経路の閾値の違いによって双安定性が生じると予想されている。過剰応答性は別種のMAPKカスケードでは実測されている。双安定性は全く実証されていない。ERKの活性化反応を大腸菌内に再構成する。恒常的なリン酸化活性を有するMEK断片、MKP、活性化(2重リン酸化)を検出するために設計した蛍光ERKプローブの3者を大腸菌に共発現する。MEK断片、MKPには発現量を計測するためGFPタグを付ける。

<2008年度の成果>

1) EGF受容体の活性化反応の解析

最初の段階としてリン酸化反応を起こすセミ・インタクトシステムの構成を試みているが、必ずしもうまくいっていない。EGFR-GFPの発現量が問題であると予想される。

一方、EGFRの主要な脱リン酸化酵素は、PTP-1BとCdc25であると言われている。両蛋白質のGFP融合体を作成した。Cy3-Grb2の作成も行った。

EGFR-GFPを発現するCHO-K1細胞で1分子計測によりEGFRの会合数分布と会合体の空間分布計測を行い、2量体を単位とする高次会合体が形成されていることを予想する結果を得た。しかし、通常の蛍光顕微鏡計測では空間分解能が不十分(-200nm)であるので、光感受性の蛍光蛋白質を融合したEGFRでPALM法により20nm程度の空間分解能で1分子検出を行う方法を開発した。現在、得られたデータの解析を行っている。

格子点を拡散運動する膜蛋白質による会合体ダイナミクスをMonte-Carlo法により計算するシミュレータを構築した。このシミュレータを用いて実験データ(EGFRの会合体分布)の再現を試みているが、複数の分子間相互作用あるいは膜ドメインへのトラップなどの効果をシミュレータに組み込む必要があるようである。

2) ERKの活性化反応の解析

ERK、および活性化MEKとMKPを組み込んだ発現プラスミドを構築し大腸菌で発現を行った。各々の蛋白質にはCerulean(青)、Venus(緑)、mCherry(赤)という色の異なる蛍光蛋白質を融合させ、発現量計測を可能にしている。また、それぞれが異なるメカニズムで発現誘導されるプロモータシステムの下流に組み込まれており、3者の発現量を制御できる。

蛍光発光計測により3種の蛋白質の発現が確認された。また、発現誘導システムで、MEKおよびMKPの発現量を10倍程度制御できることを明らかにし、リン酸化ERKに対する交替によるWestern blotでMEK発現依存的にERKの2重リン酸化が亢進し、MKPの強発現によりリン酸化が阻害されることを確認した。

共焦点蛍光顕微鏡観察により、個々の大腸菌細胞レベルで各々

の蛋白質の蛍光信号を画像化することに成功した。ERK と MEK が ERK のリン酸化レベル依存的に複合体を形成している可能性が従来から示唆されているが、我々の実験系では Cerulean (ERK), Venus (MEK) 間の FRET は観測されなかった。

個々の大腸菌ごとに ERK のリン酸化量を定量するため、抗リン酸化 ERK 抗体を一次抗体とする間接蛍光抗体法染色を試みた。現在は、染色条件検討を行っている。

実験に対応した数理モデル解析のため、deterministic および stochastic な計算法による ERK リン酸化反応解析を行った。

Deterministic な数値計算(連立微分方程式モデル)においては、従来 Markevich ら (JCB 164:353, 2004) によって予想されている ERK リン酸化状態の双安定性を再現できた。Gillespie の方法による stochastic な反応シミュレータを構築した。連立微分方程式モデルで双安定性が見られた濃度条件で、細胞サイズ(分子数)を変えて、反応ゆらぎの影響をシミュレートした。細胞サイズが大腸菌程度 ($0.2 \mu\text{m}^3$) 以下に減少すると時間オーダーの反応ゆらぎが起こる(すなわち双安定性は消失する)が、哺乳類細胞レベルの大きさでは、リン酸化レベルは 100 時間を超えて安定に維持されることが予想された。

<国内外での成果の位置づけ>

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、素反応の定量的計測はあまり進んでいない。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。従来のほとんどのシミュレーションは微分方程式モデルであるが、本研究では、1 分子計測の特色をいかして、個々の反応位置における分子数や分子運動(側方拡散)の計測を行い、その結果を利用して反応拡散方程式モデルあるいは Monte Carlo シミュレーションによる解析を行い、また反応ゆらぎ考慮することが、我々の特色である。

ERK リン酸化の数理モデル解析においても、従来の研究は deterministic なモデルによるものであるが、我々は、分子の少数性を考慮した反応解析を行う。

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作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。しかし、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。本研究で取り扱う双安定性反応は、インテリジェントなスイッチ回路の基本となるものと考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1) EGF 受容体の活性化反応の解析

以前、A431 細胞 (3×10^6 EGFR/cell) および HeLa 細胞 (5×10^4 EGFR/cell) から作成したセミ・インタクト細胞では EGFR の活性化反応を再構築することに成功している。現在用いている CHO 細胞では EGFR-GFP の発現量を 10^4 /cell 以上に上げることが難しい。受容体密度がリン酸化反応効率に影響していると考えられる。今後、電気穿孔などによる蛋白質発現量の最適化を行う。

2) ERK の活性化反応の解析

MEK, MKP の発現量を 2 桁以上にわたり制御できる実験系を構築する予定であったが、現状では 1 桁程度の制御に留まっている。これは、誘導物質比存在化での発現(リーク)が文献に示されている以上に大きかったためである。制御領域の配列を最適化

することで解決を試みている。

また、当初、ERK リン酸化レベルを MEK-ERK 間の FRET で可視化し、生きた大腸菌で連続的な計測を可能にするつもりであった(FRET 計測を行った文献が存在する)が、我々の実験系では FRET が検出できなかった。蛍光蛋白質種の入れ替えとリンカー部分の調節で FRET が起こる条件を探しているが、うまくいかない場合は、上述したように、固定細胞で蛍光抗体染色による計測を行う。定量性を向上させるため、直接蛍光抗体法を使う予定である。

<今後の課題>

(1) EGF 受容体の活性化反応の解析

再構成系を動かし、受容体の分布・動態(EGFR-GFP)と活性化(Cy3-Grb)の関係を 1 分子計測する。受容体の発現密度(培養条件下で 1 桁程度の細胞間変動が存在する)、脱リン酸化酵素濃度、EGF 濃度がコントロールパラメータである。

種々の条件下での応答を数理解析することにより、反応増幅メカニズムを明らかにするとともに、受容体の応答分化が下流で見られる細胞極性形成の原因となっている可能性を探る。

(2) ERK の活性化反応の解析

実験系においても、ERK 活性化反応の過剰応答性、双安定性を検証し、MEK, MKP の絶対濃度と濃度比が ERK の活性化反応に与える影響を明らかにする。MEK, 濃度を一定に保って、MKP の発現誘導を誘導物質の濃度変動により増加、あるいは減少させて、MKP が同一濃度に達した時点での ERK リン酸化量から双安定性と反応ゆらぎを計測する。また、生細胞で連続的にリン酸化 ERK 量を計測できるシステムが完成すれば、単一細胞内での ERK の活性化変動の計測を行う。

関与する分子数が減少するにつれて、過剰安定性、双安定性ともノイズにより失われていくことが予想されるが、現在の反応モデルは、Michaelis-Menten 型の酵素反応を仮定したものであり、実際の蛋白質反応とは異なっている可能性もある。また、モデルの反応形式が正しいとしても、パラメータは必ずしも確実ではない。実験とシミュレーションの比較により、実際の蛋白質反応系がノイズに対してどれだけ頑強であるかを明らかにする。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0901081745

Yumura, S., Ueda, M., Sako, Y., Kitanishi-Yumura, T., and Yanagida, T.: Multiple Mechanisms for Accumulation of Myosin II Filaments at the Equator during Cytokinesis. *Traffic* 9, 2089-2099 (2008)

2. 0901081753

Hibino, K., Hiroshima, M., Takahashi, M., and Sako, Y.: Single-molecule Imaging of Fluorescent Proteins Expressed in Living Cells. *Methods Mol. Biol.* 48, Lee, J. W. ed. Humana Press, (2008) in press.

3. 0901081800

Ueda, M., Shibata, T., and Sako, Y.: Signal Transduction Across the Plasma Membrane. "Single Molecule Dynamics in Life Science", pp. 99-116. Yanagida, T. and Ishii, Y. ed. WILEY-VCH (2009)

2) データベース/ソフトウェア

なし。