

論文の内容の要旨

論文題目 Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation

(一過性及び持続性ERK活性化ダイナミクスの予測と実証)

氏名 尾崎 裕一

[目的] ERK (extracellular signal-regulated kinase) は、外界のシグナルに依存してさまざまな活性化パターンを示し、細胞の増殖や分化などを特異的に制御する。例えば、ラット副腎褐色細胞腫由来細胞(PC12細胞)においては、上皮増殖因子(EGF)と神経成長因子(NGF)によりそれぞれERKが一過性と持続性に活性化されて細胞の増殖と分化を制御している。PC12細胞におけるこの一過性と持続性のERK活性化はそれぞれRasとRap1に依存することが分かっているが、いかにしてこの違いを生み出すかについては、システムレベルでの定量的な説明がなされていない。本研究はEGFとNGFによる刺激からERKの応答までを再現する生化学反応シミュレーションモデル(*in silico*モデル)の構築と解析を通じて、一過性及び持続性のERK活性化を生み出すメカニズムを解明することを目的とする。

[*In silico*モデルの構築] 先行研究に基づき、PC12細胞におけるERKシグナル伝達経路のブロック線図(図1)を作成した。このブロック線図を生化学反応で記述し、*in silico*モデルを構築した。実際のPC12細胞を用いてEGFとNGFの刺激濃度に応じたERK経路の主要な分子(図1、四角)の活性化の時間波形を計測し、これを再現するように*in silico*モデルの反応パラメータを調節すること

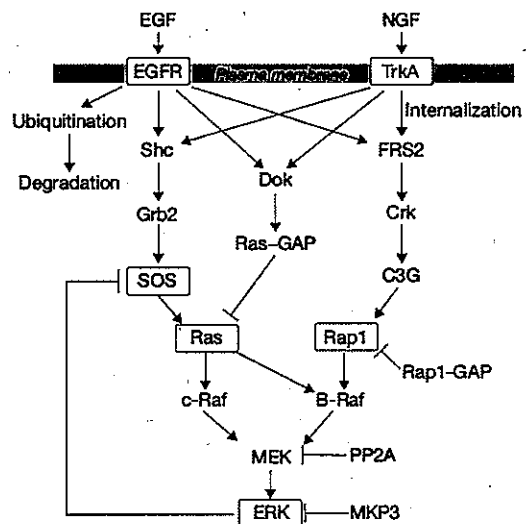


図1 ERK経路のブロック線図

により精度の高いシミュレーションモデルを作成した。このモデルは、1)EGFR(EGF receptor)の活性化パターンとERKの活性化パターンが特に低濃度において異なること、2)NGFによるERKの継続相の高さは刺激の強さを反映すること、さらに3)EGFとNGFによる一過性のERK活性化は主にRasにより、またNGFによる持続性のERK活性化は主にRap1によること、をよく説明する。

[一過性及び持続性ERK活性化の異なる特性の予測と実証] 生理的な条件では成長因子などの濃度は徐々に増加すると考えられる。そこで *in silico* モデルを用いてこのような徐々に増加する刺激(図2、上段)に対するERKの応答を予測した(図2、中段)。この結果、EGFとNGFのいずれに対しても刺激の増加速度に依存して一過性のERK活性化が生じることを予測した。一方、NGF刺激に対する持続性のERK活性化

は刺激の増加速度によらず、刺激の終濃度に依存することを予測した。これらの予測を *in vivo* で検証したところ、*in silico* による予測と非常によく一致した(図2、下段)。以上の結果から、一過性のERK活性化は刺激の増加速度依存的に生じ、持続性のERK活性化は刺激の終濃度依存的であることを示した。

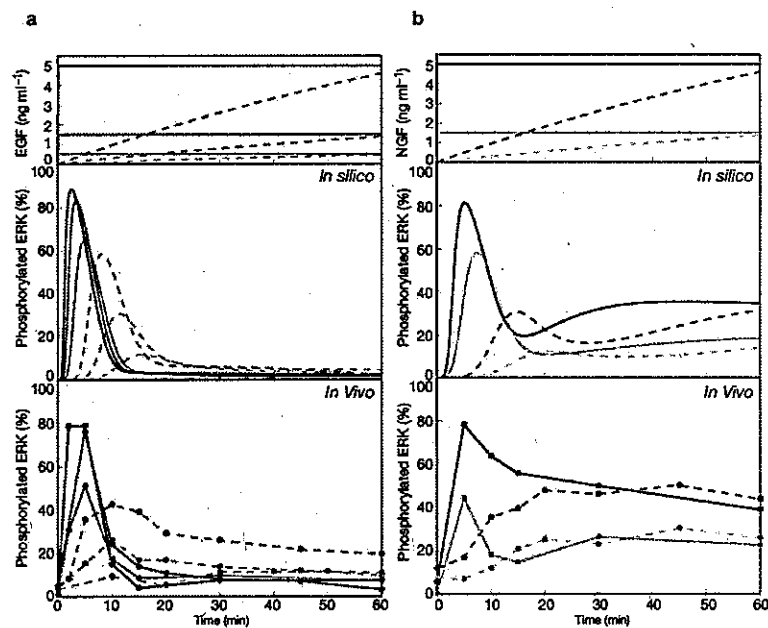


図2 一過性と持続性ERKのダイナミクス
(a) EGF刺激 (b) NGF刺激

[RasとRap1の異なるダイナミクス] 一過性及び持続性ERK活性化は、ERKの活性化因子であるRasとRap1の一過性及び持続性の活性化にそれぞれ依存していると考えられる。そこでこの違いが

生じるメカニズムを明らかにするために、*in silico* モデルを用いて経路阻害実験を行った。この結果、EGFRの分解経路及びERKを介したネガティブフィードバックによるSOS不活性化経路の阻害はRasの一過性の活性化に大きく影響しないが、RasGAPの活性化はRasの一過性の活性化に不可欠であることを見出した。一方、持続性のRap1活性化は持続性のTrkA活性化と刺激非依存的なRap1GAPによることを見出した。Ras経路においてはレセプターからのシグナルはアダプタータンパク質を介してSOSとRasGAPに伝えられ、Ras活性化の時間波形はSOSによる活性化とRasGAPによる不活性化のバランスによって決まる。活性化シグナルが不活性化シグナルよりも速く伝わるならば、Rasは初め活性化の作用のみを受けて強く活性化し、遅い不活性化シグナルによって不活性化の作用を受けて一過性の活性化を示すと考えられる。そこで、*in silico*モデルの生化学反応定数に対して感受性解析を行い、SOSの活性化の時定数は主にShcとEGFRの結合の時定数によること、RasGAPの活性化の時定数は主にDokのリン酸化-脱リン酸化反応の時定数によることを明らかにした。

[Ras 及び Rap1 の制御機構]

Ras 及び Rap1 の制御機構に内在する特性を明らかにするために、*in silico* モデルに基づいた単純化モデルを作製した(図3)。単純化モデルは *in silico* モデルに比べて変数とパラメータの数を大幅に減らしながら *in silico* モデルの振る舞いをよく再現した(図4、赤線)。この単純化モデルの解析から、一過性のRas活性化にはGAP活性化の速度定数がGEF活性化の速度定数

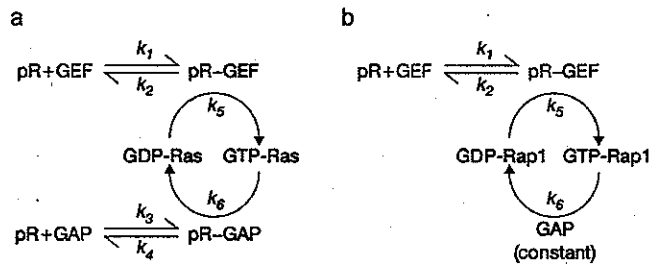


図3 Ras (a) と Rap1 (b) の単純化モデル

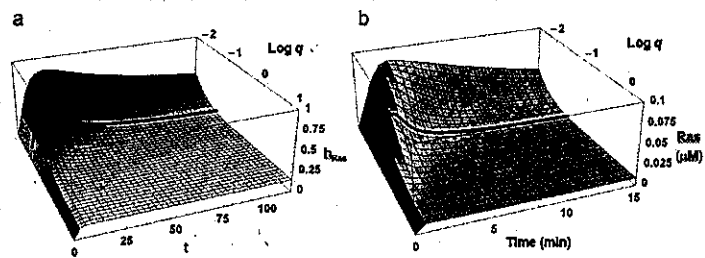


図4 GAPの速度定数 q に対する一過性Ras活性化の変化
Rasの単純化モデル (a) *in silico*モデル (b)

よりも小さいことが必要であることを示した。さらに、単純化モデルの解析から、Ras は定常状態において刺激の濃度によらず比較的一定の活性化を示し、一方 Rap1 は定常状態において刺激の濃度に比例した活性化を示すことが明らかとなった。この定常状態における刺激濃度に対する感受性の違いは、*in vivo* では EGFR と TrkA の活性化レベルに対する ERK 活性化のみかけの反応次数の違いとして観測されることが予想された(図5a)。これは、EGFR の活性化は Rap1 経路をあまり活性化しないのに対して、TrkA は Rap1 経路を強く活性化するため、定常状態における EGFR に対する ERK の反応次数は主に Ras に対する反応次数を反映し、TrkA の活性化に対する ERK の活性化は主に Rap1 に対する反応次数を反映するためである。この予測を *in vivo* で検証したところ、EGFR の活性化に対する ERK の活性化の反応次数は TrkA に対する反応次数よりも小さくなることを確認することができた(図5b)。TrkA の活性化が Rap1 経路を活性化するのに対し、EGFR の活性化がほとんど Rap1 経路を活性化しない理由は、Rap1 経路の上流に位置するアダプタータンパク質である FRS2 の各レセプターに対する親和性の違いによると考えられる。実際に *in silico* で TrkA に対する FRS2 の親和性を減少させ、Rap1 の持続性の活性化が減少することを示した。

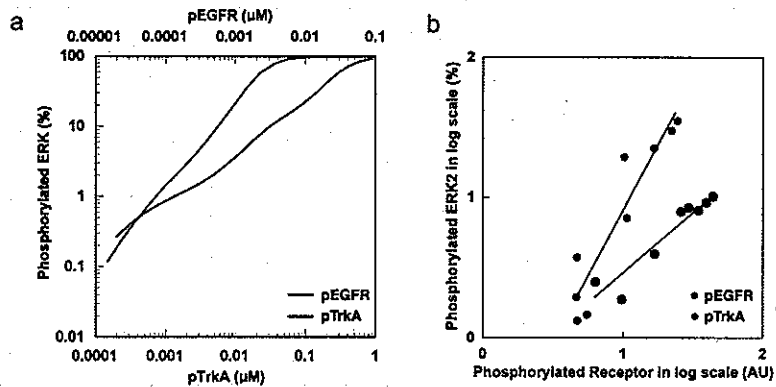


図5 定常状態におけるレセプターの活性化に対する ERK の活性化
(a) *in silico*, (b) *in vivo*

[総括] PC12 細胞における一過性と持続性の ERK 活性化はそれぞれ Ras と Rap1 の不活性化機構の違い、すなわち刺激依存的で比較的遅い RasGAP の活性化と刺激非依存的な Rap1GAP の活性により説明可能であることを示した。また、一過性と持続性の ERK 活性化は単に刺激の違いだけでなく刺激の増加速度と濃度という異なる情報をそれぞれ利用していることが明らかとなった。