

## 論文内容の要旨

論文題目 Genetically Encoded Fluorescent Indicators to Visualize Protein Phosphorylation by Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Single Living Cells

(蛍光プローブを用いた生細胞内における ERK 情報伝達系の解析)

氏名 河合 康俊

### 【序】

細胞内シグナル伝達の過程において、タンパク質はさまざまな修飾を受けて機能や活性を調節することによって生体機能に重要な役割を果たしている。その中心的役割を担うタンパク質修飾としてリン酸化が良く知られている。これまでに数多くのタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）が同定されており、ヒトゲノム配列の解析の結果、500 種類程度のキナーゼが存在すると推測されている。これらの中でも古くから盛んに研究が行われているキナーゼの一つが *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) である。ERK はさまざまな増殖因子や発がんプロモーターなどの細胞外刺激で活性化するセリン/スレオニンキナーゼとして 1980 年代後半に見いだされた。細胞外刺激によって活性化された ERK は転写因子などをリン酸化することで最終的に核へシグナルを伝え、増殖、分化などのさまざまな生体機能の制御に関与しており、細胞内シグナル伝達における ERK の役割は非常に大きい。

これまでに、蛍光標識した ERK を用いることによって、細胞外刺激時における ERK 分子の細胞内局在の変化については数多くの研究がなされている。その一方で、このときの ERK の「活性」がどうなっているかを知るための分析手法は確立されていないため、ERK による細胞内シグナル伝達メカニズムについては未だ不明な点も多い。そこで本研究では、生細胞内において ERK がいつ、どこで、どのように活性化して基質タンパク質をリン酸化するかを検出するための新規蛍光プローブの開発を行い、細胞外刺激の下で起こる ERK を介した細胞内シグナル伝達メカニズムについての新たな知見の獲得を目指した。

## 【プローブの設計】

シアン色蛍光タンパク質 (CFP)・黄色蛍光タンパク質 (YFP) 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化を利用して ERK の活性を検出する蛍光プローブ “Erkus” を設計した [ 図 1 ]. Erkus は, N 末端から順に CFP, リン酸化認識ドメイン, フレキシブルリンカー, 基質ドメイン, YFP, ERK 結合ドメイン (D ドメイン) を連結したキメラタンパク質である. 活性を持った ERK によって基質ドメインがリン酸化されると, リン酸化認識ドメインと相互作用することにより分子構造が変化して CFP-YFP 間の FRET 効率に変化が生じる. 基質ドメインには ERK の標的タンパク質 EGFR の ERK リン酸化部位である T669 ペプチド, リン酸化認識ドメインにはリン酸化スレオニン残基を含んだペプチドに対して結合能を持つ Rad53 タンパク質の FHA2 ドメインをそれぞれ用いた. RSK1 タンパク質に由来する D ドメインは ERK に対して選択的に結合する性質を持っており, プローブの基質ドメインが ERK によって選択的かつ効率的にリン酸化されるように ERK をプローブに繋ぎ止める役割をする. これらの分子設計に基づき, Erkus をコードする cDNA を遺伝子工学的に作製した [ 図 2 ].

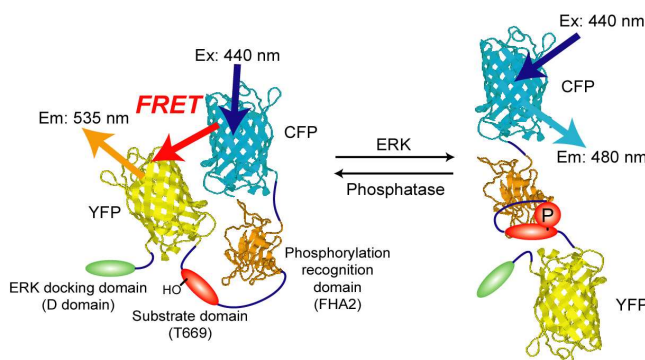


図 1. ERK 活性検出プローブ “Erkus” の分子デザイン

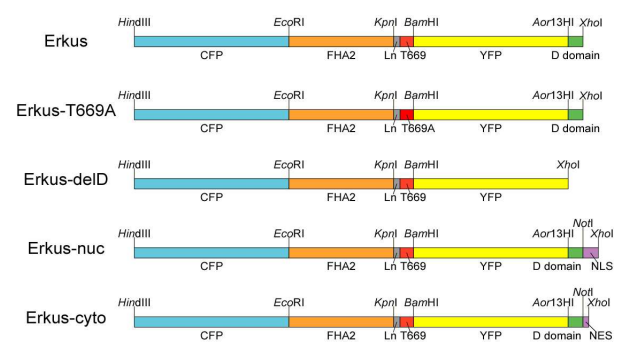


図 2. Erkus および Erkus 変異体をコードする cDNA の設計

## 【プローブのキャラクタリゼーション】

ヒト乳ガン由来の MCF-7 細胞に cDNA を遺伝子導入して Erkus を発現させ, ウェスタンブロッティングを行った結果を図 3 に示す. 抗 GFP 抗体によって Erkus の発現を示す 78 kDa のバンドが検出された. また, 100 ng/mL の上皮増殖因子 (EGF) で 15 分間刺激した細胞からは抗リン酸化 ERK 基質 (PXpTP) 抗体のバンドが検出され, EGF 刺激によって Erkus の基質ドメインがリン酸化されることが確認できた.

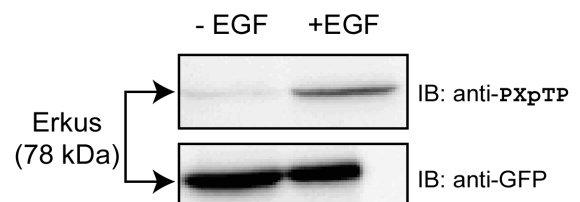


図 3. ウェスタンブロッティングによるプローブのリン酸化の検出

次に, 蛍光顕微鏡によって MCF-7 細胞内における Erkus の FRET 応答を観察した. Erkus は細胞質および核を含む細胞全体に様に分布しており, 100 ng/mL EGF で刺激すると蛍光強度比 (CFP/YFP) の増加, すなわち FRET 効率の減少が観察されて, 15 分後にはプローブの FRET 応答はプラトーに達した [ 図 4 ]. 基質ドメインのリン酸化部位のスレオニン残基をアラニン残基に置換したプローブ変異体 “Erkus-T669A” [ 図 2 ] ではこのような FRET 効率の変化は観察されなかったため, FRET 効率の変化は基質ドメインのスレオニン残基のリン酸化に起因するものであることがわかった.

続いて、Erkus のキナーゼ選択性を薬理的に検証するために、各種キナーゼ阻害剤 (10  $\mu$ M U0126 [ ERK シグナル経路の阻害剤 ] ,10  $\mu$ M SB203580 [ p38 MAPK 阻害剤 ] ,2  $\mu$ M JNK inhibitor I [ JNK 阻害剤 ] )でそれぞれ 30 分前処理した MCF-7 細胞に 100 ng/mL EGF 刺激を行ったところ、U0126 で前処理した場合にのみ FRET 応答が見られなくなった [ 図 5 ]. この結果から、Erkus のリン酸化は ERK によって引き起こされるものであり、ERK 以外の MAP キナーゼファミリーである p38 MAPK や JNK によるものではないことが確認された。

Erkus の分子設計において C 末端に組み込んだ ERK 結合ドメイン ( D ドメイン ) が Erkus の FRET 応答に対してどのように寄与しているかを評価するために、D ドメインを持たないプローブ変異体 “Erkus-delD” を作製した [ 図 2 ]. 100 ng/mL EGF 刺激に対して Erkus-delD は FRET 応答を示すものの、D ドメインを持つ Erkus に比べて、応答の速さはおよそ 60%、応答のピーク値はおよそ 50% しかなかった [ 図 6 ]. この結果から、Erkus に組み込まれた D ドメインは ERK と効率的に結合することによって Erkus の分析感度の向上に寄与していることが示された。

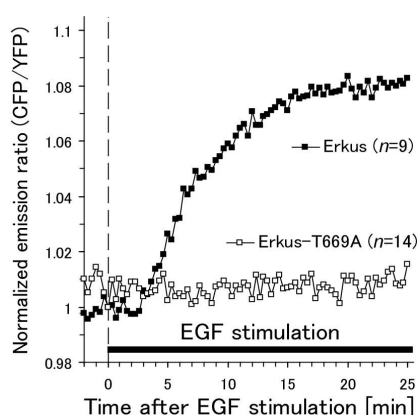


図 4. Erkus および Erkus-T669A の FRET 応答

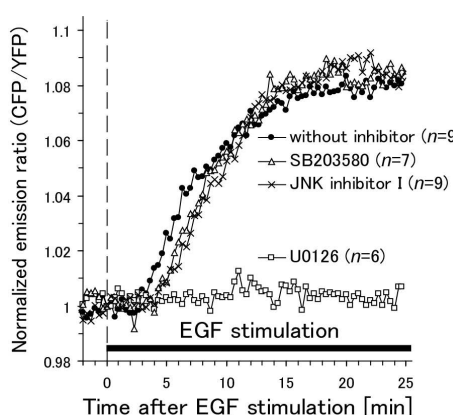


図 5. キナーゼ阻害剤で前処理した細胞内での Erkus の FRET 応答

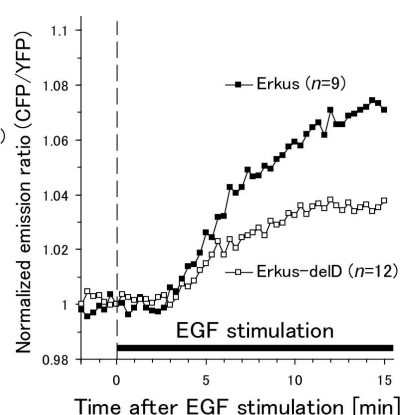


図 6. Erkus および Erkus-delD の FRET 応答

### 【核および細胞質における ERK シグナル】

ERK の基質となるタンパク質は、細胞質、細胞膜、核、ミトコンドリアなど、細胞内の至る所に分布している。その中でも特に、核内に存在する転写因子の ERK によるリン酸化は増殖、分化といった重要な細胞機能と深い関連があるために、核内における ERK の挙動を調べる研究はこれまでに数多く行われている。蛍光標識した ERK を用いた研究の結果から、細胞外刺激依存的に ERK が核内に移行することが明らかにされつつある。しかし、このときに ERK がいつ、どこで活性化されて基質をリン酸化するのは依然としてよく分かっていない。

そこで、核および細胞質における ERK の活性化と基質のリン酸化を可視化するために、Erkus の C 末端に核内移行シグナル ( NLS ) を連結した核内 ERK 活性検出プローブ “Erkus-nuc”，および Erkus の C 末端に核外移行シグナル ( NES ) を連結した細胞質 ERK 活性検出プローブ “Erkus-cyto” をそれぞれ作製した [ 図 2 ]. これらのプローブを MCF-7 細胞に発現させると、Erkus-nuc は核内だけに、Erkus-cyto は細胞質のみに局在した [ 図 7 ]. これらの細胞を 100 ng/mL EGF で刺激したところ、Erkus-nuc と Erkus-cyto の間では FRET 応答に顕著な違いが見られた [ 図 8 ]. 細胞質プローブ Erkus-cyto は EGF 刺激後すみやかに FRET 応答を示すが、この応答は一過的であり、刺激 20 分後にはピーク値のおよそ 50%、40 分後には 20% 以下にまで FRET 応答が減少した。一方、核内プローブ Erkus-nuc の FRET 応答は

Erkus-cyto に比べて持続的で ,EGF 刺激 15 分後に FRET 応答が最大に達し , 60 分経過してもピーク値のおよそ 50% が応答したまま残っていた .

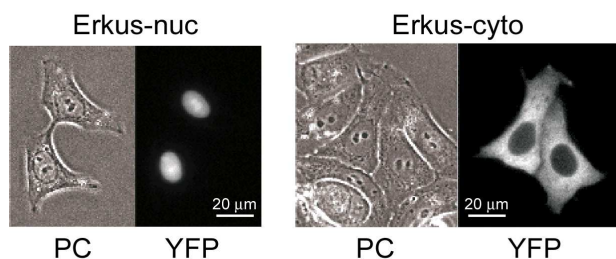


図 7. Erkus-nuc および Erkus-cyto の細胞内局在

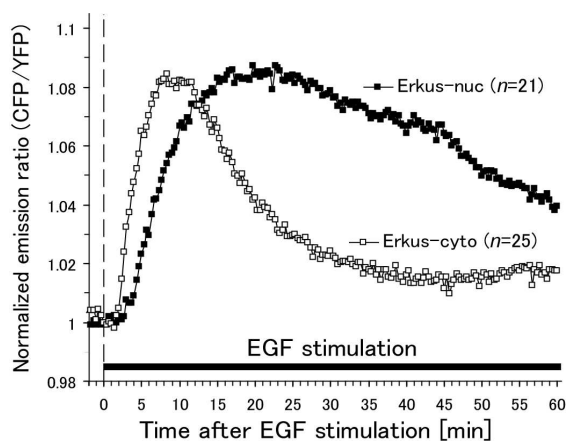


図 8. Erkus-nuc および Erkus-cyto の FRET 応答

このように EGF 刺激時の細胞質における ERK の活性化が一過的である理由として ,細胞質には ERK を不活性化する何らかの因子が存在していることが示唆されるが ,その有力な候補として MAPK ホスファターゼ (MKP) が挙げられる . MKP とは , ERK の活性化に必要となる活性ドメイン内 TEY 配列の二つのリン酸化残基 , ホスホスレオニンとホスホチロシンを脱リン酸化して ERK を不活性化する酵素である . そこで , MKP などのホスファターゼによるチロシン脱リン酸化の阻害剤 20 mM オルトバナジン酸ナトリウムで 60 分間前処理した細胞に 100 ng/mL EGF を加えたところ , 細胞質プローブ Erkus-cyto は先程と比べて FRET 応答が持続的になった [ 図 9 ] . 一方 , 核内プローブ Erkus-nuc の FRET 応答には何ら変化が見られなかった [ 図 10 ] . この結果から , EGF 刺激によって活性化された ERK を脱リン酸化して不活性化するチロシンホスファターゼが細胞質にのみ存在していることが明らかとなった .

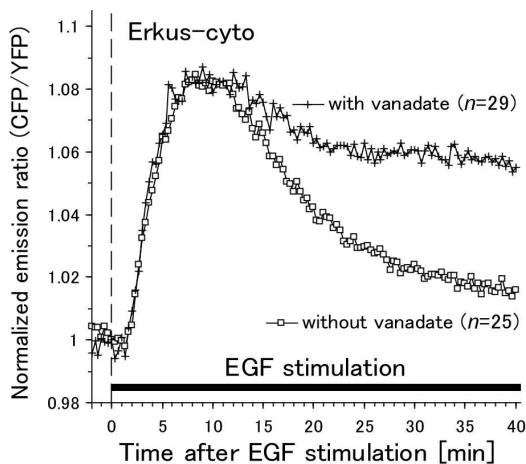


図 9. オルトバナジン酸ナトリウムで前処理した細胞内での Erkus-cyto の FRET 応答

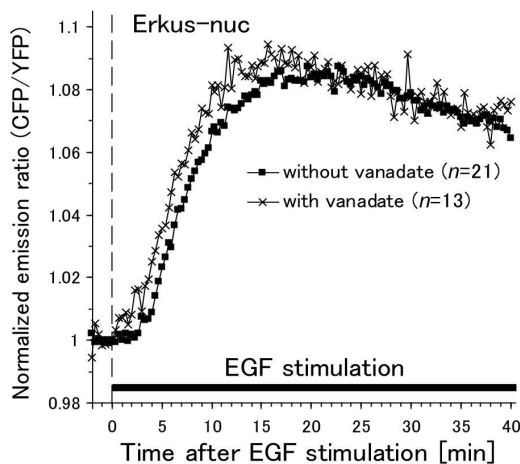


図 10. オルトバナジン酸ナトリウムで前処理した細胞内での Erkus-nuc の FRET 応答

### 【まとめ】

本研究ではタンパク質リン酸化酵素 ERK の活性を検出するための蛍光プローブ分子 Erkus を開発し , これを用いて , EGF 刺激時における核と細胞質での ERK 活性の持続性の違いとその背後にあるメカニズムについて新たな知見を得ることに成功した . この結果は , 破壊分析によるキナーゼアッセイ , あるいは蛍光標識による ERK の分子動態解析ではなし得なかった , 生細胞内における活性化 ERK によるリン酸化シグナル伝達の時間的・空間的な解析に蛍光プローブが有用であることを示すものである .