

論文内容の要旨

論文題目

EGFR シグナル伝達ネットワークに関するシステムの動態解析

(System-Level Analysis of EGFR Signaling Networks

Based on Time-Resolved Description of

Tyrosine-Phosphoproteome Dynamics)

氏名 田崎真哉

序論

Epidermal growth factor receptor(EGFR)は細胞外シグナルを細胞内に伝達し、細胞の増殖や分化、生存など様々な生命活動を司るレセプター型チロシンキナーゼである。EGFR は種々のシグナル伝達経路の活性化を統合的に制御し、細胞の正常な表現系を保障している。その為、EGFR の変異や過剰発現はシグナル伝達異常を引き起こし、癌化等の疾患の原因となる。従って、EGFR シグナル伝達機構に対する深い洞察を得ることは、理学的のみならず医科学的にも重要な課題である。

EGFR による細胞内シグナル伝達の複雑な制御は EGFR の C 末端に存在する複数の自己リン酸化部位に種々のシグナル分子が相互作用することによって達成される。これまで EGFR 自己リン酸化部位の機能を明らかにするために、EGFR 変異体を用いた生化学的な解析が行われてきた。しかしながら、EGFR 自己リン酸化部位のシグナル伝達制御機構に関するネットワークレベルの定量的かつ動的な理解は未だ進んでいないのが現状である。その主な原因は、自己リン酸化部位の一残基変異はシグナル伝達に対してわずかな影響しか与えないこと、及び、自己リン酸化部位は複数のシグナル分子と結合するために、その変異によりネットワーク全体に影響が及ぶことにある。そこで私は高精度かつ包括的にシグナル伝達動態を定量可能な最先端のプロテオミクス技術、及び、生命情報科学技術を用いてこれらの問題を解決し、細胞レベルにおける EGFR シグナル伝達動態をネットワークレベルで解析する統合的なプラットフォームの開発を目指した。

本研究では EGFR 自己リン酸化部位解析のモデル系として 992 番目のチロシン残基(Y992)に着目した。Y992 は EGF 刺激依存的に自己リン酸化するチロシン残基の一つである。プロテインチップによる包括的な結合分子探索の結果、Y992 は EGFR の自己リン酸化部位の中で最も多種類のタンパク質と結合しうる、多機能結合部位、であることが示唆されている。細胞レベルにおいては Plc γ 1、Shc、Vav2、RasGAP などが Y992 の相互作用分子として報告されている。これらのうち Plc γ 1、Shc、Vav2 は増殖や生存に重要な転写調節因子である ERK1/2 を正に制御する因子であり、一方 RasGAP は ERK1/2 を負に制御する因子である。Y992 の変異は下流のシグナル伝達経路

に複雑な正負の効果をもたらすことが考えられ、我々のシステムワイドな解析手法の有効性を評価する上で非常に有用なモデル系である。

結果と考察

チロシンリン酸化依存的タンパク質の時系列定量解析

EGFR シグナル伝達は主にタンパク質のチロシンリン酸化修飾を介して伝達されることが知られている。従って、細胞内のチロシンリン酸化状態は EGFR シグナル伝達の動態を規定する重要な変数となることが期待できる。近年、質量分析計技術の革新的な向上によりタンパク質の包括的な定量解析が可能となってきた。そこで本研究では質量分析計を用い EGF 刺激依存的な細胞内のチロシンリン酸化関連タンパク質量の時系列変化を包括的に計測した。

実験の材料として野生型 EGFR(WT)および 992 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した EGFR 変異体(Y992F)を安定発現した NIH3T3 細胞を用いた。安定同位体標識法(SILAC)によりタンパク質ラベリングした細胞を EGF 刺激し、抗チロシンリン酸化抗体を用いて濃縮したタンパク質混合物を nano-LC-Q-TOF 型質量分析計により解析した(Figure 1)。その結果、383 種類のペプチドを同定し(p<0.05)、最終的に 147 種のタンパク質に帰属することができた。同定されたタンパク質の相対定量は AYUMS アルゴリズム及び MSQUANT ソフトウェアを用いて行った。定量解析可能であった同定タンパク質のうち EGF 刺激依存的に 1.5 倍以上の変動を示したものを EGF 刺激依存的なシグナルタンパク質とした。結果として WT 及び Y992F 両細胞において 41 種の EGF 依存的なチロシンリン酸化シグナルタンパク質を同定し、株間で定量することができた。

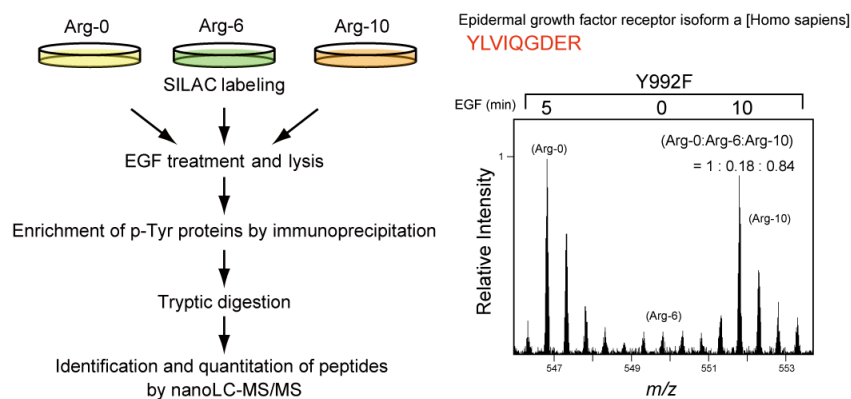


Figure 1 SILAC 法を用いた細胞内チロシンリン酸化タンパク質の包括的同定と定量

パスウェイマッピングによる変動シグナル伝達経路の同定

同定、定量されたタンパク質間の文献報告に基づく相互作用情報を Ingenuity Pathway Knowledge Base を用いて抽出し、古典的 MAPK カスケードの情報と統合した上で活性化チロシンリン酸化ネットワークを構築した。構築したパスウェイネットワークに株間での各タンパク質のリン酸化量の差、リン酸化量の時系列変動パターンの変化の差をマッピングすることで、WT 細胞と Y992F 細胞で制御が異なるパスウェイを解析した。その結果、EGFR のリン酸化レベル、つまり活性化レベルが Y992F 細胞において低下しているにも関わらず、Y992F 細胞におけるチロシンリン酸化がネットワーク全体として亢進していることが明らかとなった。一方、時系列パターンはリン酸化の亢進の有無に関らずほぼ変化はみられなかったが、一部のタンパク質群、特に EGFR の分解に関するタンパク質、及び、ERK1 に活性化パターンの変化が起こっていた。以上の

ことより EGFR 自己リン酸化部位 Y992 はチロシンリン酸化シグナル伝達の活性化レベルと活性化パターン双方を制御している可能性が示唆された。

EGFR シグナル伝達計算機モデルの構築

変異によって引き起こされるチロシンリン酸化シグナルの量的および動的な差異を結び付け、それら変化を引き起こすメカニズムを推定するために生化学シミュレーションを用いた解析を行った。まず、文献情報に基づき、EGFR シグナル伝達の計算機モデルを hybrid functional Petri net with extension (HFPNe)を用いて構築した(Entity: 290, Reaction: 244, Connector: 607, Parameter: 131)。本モデルは EGFR の活性化から ERK1 活性化までの一連の生化学反応を含んでおり、特に EGFR 分解系のパスウェイに関して詳細にモデル化されている。次に、サブペタスケールコンピュータを用い粒子数 10 万のモンテカルロ粒子フィルタを再帰的に適用することにより、EGFR シグナル伝達計算機モデルのパラメーター（生化学反応の係数、及び、タンパク質の発現量）の推定を行った。その結果、質量分析計で計測されたチロシンリン酸化シグナルの時系列情報を計算機上で再現する WT モデル及び Y992F モデルを構築することに成功した(Figure 2)。

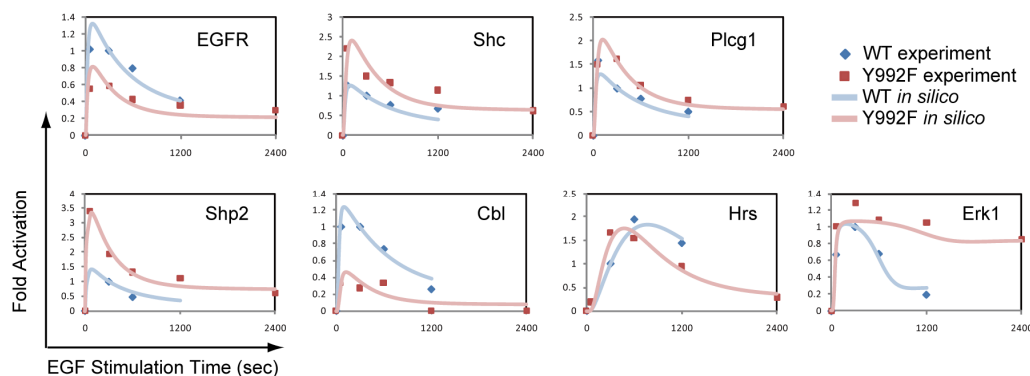


Figure 2 計算機モデルによるシミュレーション結果と実測値

モデルパラメーター比較によるシグナル伝達制御メカニズムの推定

推定された計算機モデルを用いて、細胞株間のチロシンリン酸化シグナルの差異がどのようなメカニズムで引き起こされるか解析した。Y992F モデルは WT モデルと値が異なる 54 のパラメーターを含んでおり、それらが自己リン酸化部位 Y992 の変異によって制御機構に変化が起こる反応の候補となる。しかしながら、これらのパラメーター変化が Y992F モデルにおけるシグナル伝達挙動に寄与する程度はそれぞれ異なるため、54 のパラメーターから本質的に重要なパラメーター変化を抽出する必要がある。そこで、Y992F モデルに含まれる 54 のパラメーターの値を WT モデルのそれに置き換えた時に生じるシミュレーション挙動の変化の度合いをパラメーター毎に見積もった。その結果、Y992F モデルのシグナル伝達挙動を主に規定する 12 のパラメーターを抽出することができた。12 のパラメーターのうち 6 つは未刺激状態のタンパク質の発現量を、4 つはタンパク質のリン酸化速度を、2 つは EGFR と Grb2 の結合速度、及び、EGFR のユビキチン化速度をそれぞれ規定するものであった。株間のタンパク質の発現量違いがチロシンリン酸化シグナルの変化を引き起こす大きな要因の一つであることが推定されたが、タンパク質の発現量の変化それのみでは全ての違いを説明することはできなかった。従って、転写誘導過程を含まない短時間の EGFR シグナル伝達において Y992 はその他 6 つの生化学反応速度定数の制御に関連していることが示唆された。4 つのタンパク質リン酸化速度は全て Y992F モデルで上昇しており、これに起因するリン酸化シグナルレベルの充進が Y992F 細胞における ERK1 の持続的な活性化

を引き起こしていることが推定された。また、Y992FモデルにおけるEGFRのユビキチン化速度の上昇はEGFR分解系パスウェイの活性化パターン変化の原因となっていることが示された。

計算機モデル予測の検証

計算機モデルによる細胞間のタンパク質発現量差に対する予測をウェスタンブロット法により検証した(Figure 5)。計算機モデル予測と実測値が非常によい一致をみせたことは構築したEGFRシグナル伝達計算機モデルの性能を示すと同時に、株間のシグナル伝達挙動の差異はタンパク質発現量の違いに主に起因するという予測を強く示唆する。次にY992Fが直接的にシグナル伝達過程の制御に関ることが予測されたEGFR分解系パスウェイに対する計算機モデル予測の検証を行った。EGFRユビキチン化反応速度はY992Fモデルで上昇しており、この上昇がユビキチン化反応の生成物であるユビキチン化EGFR量の亢進を引き起こすことが計算機モデルによって予測された。そこで、ユビキチン化EGFR量の時系列変化をウェスタンブロット法により実測した。その結果、Y992F細胞においてユビキチン化EGFRの量が大きく亢進していることが明らかとなった。EGFRのユビキチン化を触媒するタンパク質であるCblの発現量はY992F細胞においてEGFRと同程度低下していることから(Figure 3)、このユビキチン化EGFR量の亢進はタンパク質量の変化では説明できない。さらに、ユビキチン化EGFR量の亢進に伴い、EGFRの分解もY992F細胞において促進されていた。以上のことから自己リン酸化部位Y992はEGFRのユビキチン化に関するシグナル伝達経路を制御し、EGFRの分解に対し抑制的に機能することが示唆された。

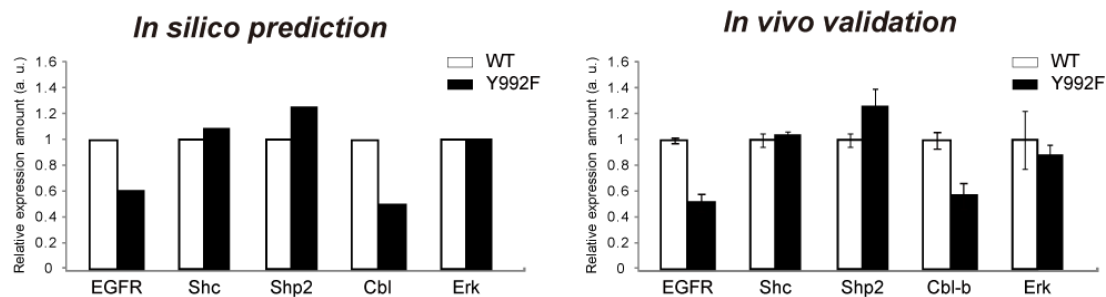


Figure 3 タンパク質発現量の予測と検証

結論

本研究では質量分析計に基づく包括的なタンパク質計測技術と生命情報学的手法を組み合わせることで、従来成しえなかったEGFR自己リン酸化部位のシグナル伝達制御機構に関する詳細な記述を可能にする方法論の確立を行った。質量分析計を用いて計測されたローバイアスなチロシンリン酸化シグナル伝達時系列情報はWT、Y992F細胞間のシグナル伝達過程の量的及び動的な違いを明瞭に提示した。さらにEGFRシグナル伝達の計算機モデルを用いて時系列データを解析することにより、細胞間のタンパク質発現量差を自動的に考慮した上で、直接的に自己リン酸化部位が制御しているシグナル伝達経路を推定することができた。本研究によりこれまで機能が不明瞭であった自己リン酸化部位Y992はEGFR分解に抑制的に働く一方、全体のリン酸化シグナル強度を抑えることでERK1活性化パターンの適切な制御を行っていることが示唆された。本手法を他の自己リン酸化部位変異体、さらには発癌に関連するEGFR変異体に適用することにより、より完全なEGFRシグナル伝達像が得られ、効果的な薬剤ターゲットの同定、及び、EGFRシグナル伝達異常の理論的な制御に向けた一助となると期待できる。