

論文の内容の要旨

論文題目 一細胞ダイナミクス計測による シグナル伝達タンパク質の 時空間的機能の解明

氏名 吉澤 亮

【背景と目的】

細胞内では膨大なシグナル伝達タンパク質が適切なタイミングと適切な場所で、シグナルの受け渡しを制御し様々な細胞応答を決定する。受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、アダプタータンパク質とともに機能し細胞外環境と細胞内環境を接続する。それぞれの受容体は外部刺激に応じて多面的な役割を果たすが、すべての RTK タンパク質の下流に存在するシグナル伝達経路は RAS/MAPK システムを含めて非常によく類似している。このことから細胞生物学の中心的な問題の1つは、ほとんど同じ反応ネットワークが細胞外環境から異なる信号をどのように認識し、表現するかということである。RTK-RAS-MAPK 経路では、細胞増殖と分化を RTK シグナルの時間的応答の制御によってそれぞれを区別し、応答を決定することが知られている (Kao et al., 2001; Marshall, 1995; Nagashima et al., 2007)。

この経路では、多様な成長因子によって活性化された ERBB 受容体が p52SHC (SHC) や GRB2 などのアダプタータンパク質の細胞膜移行を促進する。SHC、GRB2 は細胞内における恒常性を維持するために必要であり、正常および発癌性細胞の両方のシグナル伝達において重要な役割を果たしている (Davol et al., 2003; Gu et al., 2000; Ursini-Siegel et al., 2008)。SHC、GRB2 は RTK の細胞質側領域を認識して細胞膜へと移行する。細胞膜へ

と移行した SHC はリン酸化され、GRB2 を含む PTB および/または SH2 ドメイン含有タンパク質の特異的結合部位として作用する(Ravichandran, 2001)。RTK または SHC によって細胞膜へと移行した GRB2 は様々なエフェクタータンパク質と相互作用することで RAS / MAPK (ERK) および PI3K / AKT (PKB) シグナル伝達経路を活性化する(Bisson et al., 2011; Pawson, 2007)。受容体活性化時の細胞膜への SHC および GRB2 の細胞膜移行は生物学的に冗長なプロセスであると考えられてきた (Oku et al., 2012; Saucier et al., 2004; Saucier et al., 2002)。一方で SHC の存在が RAS/MAPK シグナル伝達の振幅調節など、シグナル制御に重要であるという報告もある (Lai and Pawson, 2000; Oku et al., 2012)。

RAS / MAPK 経路では ERK の活性化の持続時間の違いが、固有の細胞応答 (増殖, 分化) の誘導と関連していることが広く認められている(Nagashima et al., 2007, Marshall et al., 1995)。ヒト哺乳動物癌由来細胞株 MCF7 細胞では、上皮成長因子 (EGF) による ERK の一過的な活性化が細胞増殖につながり、Heregulin (HRG) による ERK の持続的な活性化が細胞分化を誘導することが知られている (Kao et al., 2001)。しかし ERK 活性化ダイナミクスの調節、細胞の運命決定のための SHC と GRB2 の役割については徹底的に議論されていない。SHC、GRB2 のような重複した役割を持つとされるタンパク質が RAS/MAPK シグナル伝達経路に対して、時空間的にはどのような役割を持つのかを調べることで、細胞応答決定メカニズムについて新たな情報が得られ、細胞挙動の理解がさらに進むと考えられる。

本研究では細胞内における RTK-RAS-MAPK シグナル伝達を一細胞、さらには一分子レベルで可視化し調べることで細胞応答決定のメカニズムについて新たな情報を得ること、さらには細胞挙動の理解を進めることを目的とした。具体的には、細胞分化シグナル中における p52SHC と GRB2 の細胞内局在の時間変化を解析し、RAS/MAPK シグナル伝達ダイナミクスに対しての SHC と GRB2 の特異的機能とさらに細胞運命の決定時における役割を明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

SHC および GRB2 の時空間的な特徴を理解するため、HRG 刺激した MCF7 細胞内において SHC と GRB2 の細胞膜移行の時間変化を観察した。これらのタンパク質を生細胞内で可視化するために Halo と GFP を SHC と GRB2 にそれぞれ融合させ (Halo-SHC, GFP-GRB2)、細胞内に共発現させた。全反射蛍光顕微鏡を用いて細胞膜上における Halo-SHC および GFP-GRB2 を観察した。これらのアダプタータンパク質はどちらも細胞質中に分布しており、HRG 刺激後に一部の分子が細胞膜に移行した。Halo-SHC は HRG 刺激後少なくとも 60 分まで持続的に膜局在し、一方で GFP-GRB2 は一過的に膜局在した(図 A)。これらの結果は、HRG 刺激された MCF7 細胞内では SHC と GRB2 は固有の細胞膜移行ダイナミクスを持つことを示している。

SHC の変異体を用いたキネティクス解析の結果は、SHC が GRB2 の細胞膜移行ダイナミクスを時間依存的に二相的に制御することを示唆している。SHC はシグナルの初期段階 (< 10 分)では細胞膜上で GRB2 の膜局在の応答量の増加に寄与するのに対して、後期段階ではリン酸化された SHC が GRB2 の膜移行を抑制することが考えられた。FCCS 計測の結果は、細胞質中における SHC と GRB2 の相互作用が刺激依存的に増加することを示しており、SHC は複合体形成を介して膜から GRB2 を隔離させていることを示唆している。この後者のメカニズムは MEK および/または ERK からの RAS の負のフィードバック調節に付加的に機能して、RAS の一過的な活性化ダイナミクスを完成させると考えられる。

ダイナミクスの摂動実験結果は、細胞分化シグナル中において SHC と GRB2 は非冗長的な役割を持ち、SHC が ERK 活性化の時間的調節において重要な役割を果たすことを示している。EGFR シグナルに摂動を与えると SHC、ERK のダイナミクスが変化した(図 A)。このとき GRB2 のダイナミクスには顕著な変化は見られなかった。こ

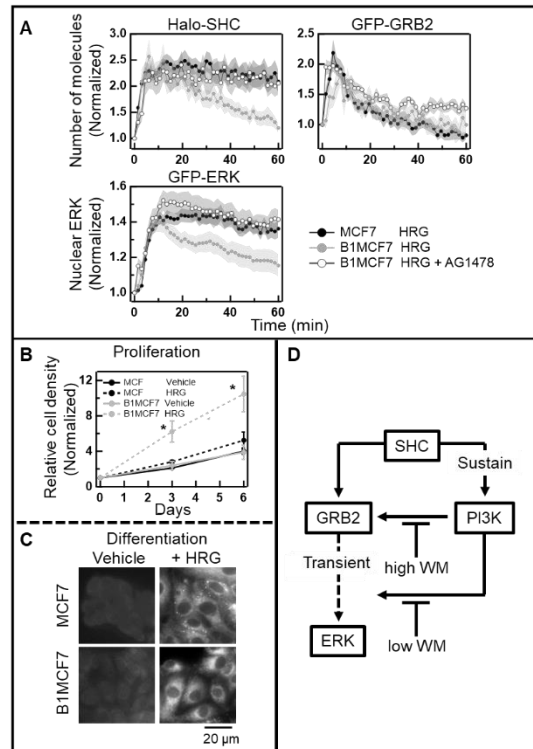


図: シグナル伝達ダイナミクスと細胞運命決定

(A) SHC, GRB2, ERK の一細胞反応ダイナミクス。(B, C) HRG 刺激に誘導された MCF7 細胞の応答。(D) SHC による ERK 活性化の時空間的制御モデル。GRB2、PI3K 依存的な経路はそれぞれ ERK の一過的、持続的な活性化に関与する。

のことは、正常状態と EGFR シグナル伝達の摂動下において SHC と ERK の反応ダイナミクスは同様な持続応答性を示し、GRB2 のダイナミクスの影響を受けていないことを示していた。さらに EGFR の過剰発現は細胞増殖を促進させ (図 B)、その一方で細胞分化を抑制した (図 C)。以上のことから ERBB シグナルに摂動を与えたことによって変化した SHC、ERK の反応ダイナミクスは細胞運命決定に影響を与え、細胞応答を分化から増殖へと移行させることが可能であることが考えられた。

この SHC による ERK 活性化時間の制御は、SHC が PI3K を介して実行されることが明らかになった (図 D)。SHC の発現量の減少によって PI3K の活性化が低下したことは、SHC が PI3K の活性化も正に調節することを示している。さらに PI3K のキナーゼ活性を阻害すると ERK 活性化の持続時間が減少した。これらのことから、SHC の通常レベルの発現が PI3K の完全な活性化に必要であり、さらに PI3K を含むシグナル伝達経路が SHC から ERK への持続的な活性化に必要であることが考えられた(図 D)。この反応の完全なメカニズムは明らかではないが、ウェスタンブロット解析から少なくとも GRB2-RAF シグナル非依存的に MEK および ERK の持続時間を制御することが明らかになった(図 D)。

【結論】

本研究では生細胞内の RTK-RAS-MAPK シグナル伝達経路における、アダプタータンパク質の p52SHC (SHC)、GRB2 の刺激に伴う細胞膜移行ダイナミクスを計測し、さらに RAS/MAPK シグナル伝達経路における時間的調節について調べた。その結果、SHC と GRB2 は固有のシグナル伝達ダイナミクスを示し、細胞に非冗長的な機能をもたらすことが明らかになった。GRB2 は、刺激後初期の RAS 活性化の振幅と持続時間の調節、さらに ERK 活性化の振幅に作用する。SHC は主要な GRB2/SOS シグナルの制御と、間接的な PI3K/AKT シグナルの両方を調節することで、RAS/MAPK シグナル伝達の時間変化を制御していることが明らかになった。また SHC による ERK 活性化の持続時間の調節は、細胞増殖、分化の細胞応答決定にも重要な役割を果たしており、SHC のダイナミクス変化はこれらの細胞応答決定のバイアスに影響を与えることが示唆された。