

Title	生細胞蛍光イメージングによるERK MAPK活性化動態の1細胞定量計測
Sub Title	
Author	新土, 優樹(Shindo, Yuki)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2013
Jtitle	生命と情報 No.20 (2013.) ,p.57- 61
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2013年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000020-0057

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

修士論文ダイジェスト 2013年度 (平成25年度)

生細胞蛍光イメージングによる**ERK MAPK**活性化動態の1細胞定量計測

政策・メディア研究科 修士課程2年
新土 優樹

1. 序論

MAPK (mitogen-activated protein kinase; 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ; MAPキナーゼ) は酵母から哺乳類まで高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり, 増殖や分化, アポトーシスなどの細胞運命決定を制御している (Qi and Elion, 2005). 哺乳類細胞においては, これまでにERK1/2, JNK, p38, ERK3/4, ERK5の5種類のMAPKファミリーが同定されている (Roux and Blenis, 2004). その中でも最も有名なのはERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2であり, 古典的MAPKとも呼ばれている (Chang and Karin, 2001). ERK MAPKカスケードはRaf/MEK/ERKからなり, 増殖因子やサイトカイン, ホルモンエストロゲン等によって活性化が誘導される. EGF (epidermal growth factor; 上皮成長因子) 刺激に対するERKの応答は特によく調べられており, システム生物学におけるモデルシステムとしてもしばしば用いられる. EGFの結合によってEGFRが活性化されると, アダプタータンパク質であるGrb2, GTP交換促進因子であるSosとの相互作用を介し, Rasが活性化される. Rasの活性化によりRafは細胞膜へと局在変化して活性化され, Raf/MEK/ERKのカスケードが順に活性化される. 活性化されたERKは細胞質から核へと局在変化し, 転写因子をはじめとする核内のタンパク質をリン酸化することで細胞増殖に導く (以降, 上記の経路をEGF-ERK経路と表記する).

Xenopus oocytesにおいては, ERKのリン酸化は入力シグナルの上昇に対してswitch-likeに起こることが知られている (図1). この非線形性を生み出すメカニズムの1つは2重リン酸化モチーフであり, 2回のリン酸化反応が独立 (distributive) に起こることに起因する (Ferrell Jr. and Bhatt, 1997; Huang and Ferrell, 1996). さらに, *Xenopus* oocytesの場合は, ERKからMAPKKKへのポジティブフィードバックが存在することで, その応答は非常に急峻なものとなっている. ERKは増殖や分化, 発生といった一般的に不可逆な過程を制御していることから, その応答性がswitch-likeであるという事実は合目的的であると考えられる.

他方, 免疫染色やFACSによる定量解析の結果から, 酵母や哺乳類細胞においては, ERKのリン酸化が入力シグナルに対してgradedに起こることが報告されている (Colman-Lerner *et al.*, 2005; MacKeigan *et al.*, 2005; Whitehurst *et al.*, 2004). ERKの2重リン酸化モチーフは哺乳類細胞でも保存されていることから, ERKのリン酸化がswitch-likeではなくgradedに起こることは必ずしも自明ではない. 実際のところ, 足場タンパク質 (scaffold) や細胞内の分子混雑の影響などが示唆されているが, そのメカニズムは現在でも完全には明らかになっていない (Aoki *et al.*, 2011, 2013).

ところで, ERKは細胞増殖や分化といった細胞運命決定の制御を担う分子であり, その情報は最終的には0か1の情報に変換される必要があると考えられる. すなわち, gradedなERKのリン酸化も, その下流のいずれかでswitch-likeなシグナルに変換される必要があると考えられる. しかしながら, 実際にそのようなメカニズムが存在するのかは明らかになっていない. そこで本研究では, ERKのリン酸化後に起こる核への局在変化に着目し, そのダイナミクスを生細胞蛍光イメージングにより1細胞レベルで計測した.

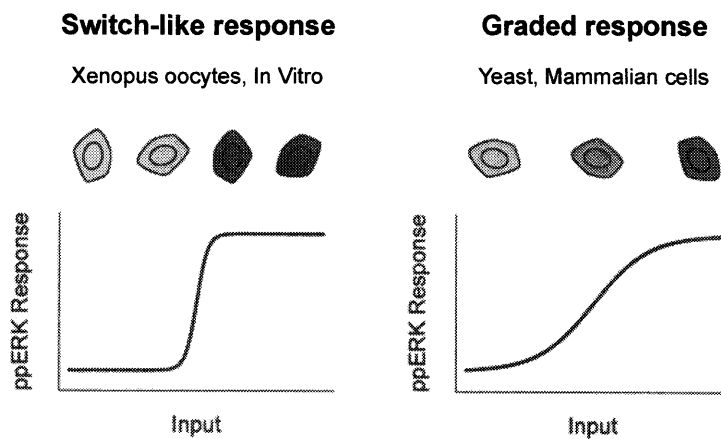


図1：ERKの2重リン酸化の入力シグナルへの依存性

Xenopus oocytesや*in vitro*においては、ERKのリン酸化が入力シグナルに対してswitch-likeに起こる。一方、酵母や哺乳類細胞においては、ERKのリン酸化は入力シグナルの上昇にgradedに依存する。

2. 結果と議論

3.2.1 EGFP-ERK2の生細胞蛍光イメージング

生きた細胞内におけるERKの動態を観察するために、ERK2にEGFPを融合させたタンパク質(EGFP-ERK2)を用いた。また、核マーカーとしてTagRFPを融合させたヒストンH2Bを用い、これらを安定発現するPC12細胞を使用して実験を行なった。PC12はラットの副腎髄質(adrenal medulla)由来の褐色細胞腫(Pheochromocytoma)であり、ERKを介した細胞運命決定研究のモデルとして用いられてきた実績がある(Greene and Tischler, 1976; Vaudry *et al.*, 2002)。

まず始めに、ウェスタンブロッティングにより内在性ERKとEGFP-ERK2の発現量比を見積もった。これは、ERKの過剰発現は細胞内局在を変化させることが知られており(Burack and Shaw, 2005; Fukuda *et al.*, 1997)、導入したEGFP-ERK2の発現量が内在性ERKに比べて十分に低いことを確認する必要があるためである。発現量比を見積もった結果、EGFP-ERK2の発現量は内在性ERKの10%未満であった(図2B)。内在性ERKの発現量は約1 μ Mであることから(Fujioka *et al.*, 2006)、EGFP-ERK2の発現量は100 nM未満であると見積もられる。これは、導入したERKの発現量が150 nM程度以下であれば、本来の細胞内動態にほとんど影響を与えないという報告の範囲内である(Costa *et al.*, 2006)。以上より、EGFP-ERK2の発現が生細胞におけるERKの動態を乱す可能性は低いと結論付けた。

次に、EGF刺激に対するERKの核移行応答を調べるために、0.0005-50 ng/mlのEGFで細胞に刺激を与え、EGFP-ERK2の核移行ダイナミクスをイメージングした。EGF濃度は、50, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.08, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.01, 0.005, 0.0005, 0 ng/mlの14条件で実験を行なった。核マーカーであるTagRFP-H2Bの画像から各細胞の核領域を決定し、核内におけるEGFP-ERK2の平均蛍光強度を1細胞レベルで定量化した。核内におけるEGFP-ERK2の蛍光強度値は、EGF刺激前の値で規格化した(Cohen-Saidon *et al.*, 2009)。各EGF濃度条件において最低170個以上、14条件合計で3,273個の細胞における核内EGFP-ERK2の時系列データを取得した。

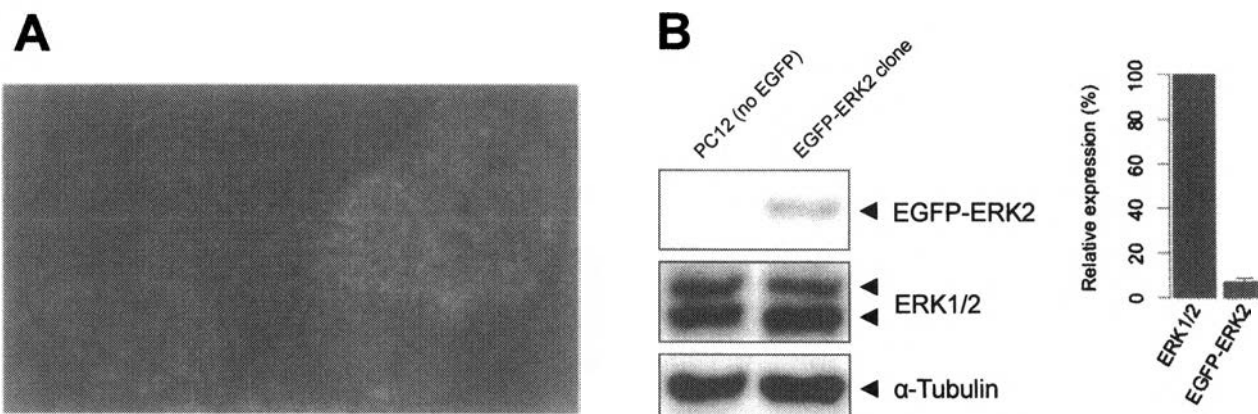


図2：EGFP-ERK2の観察に使用したPC12細胞

(A) EGFP-ERK2とTagRFP-H2Bを安定発現するPC12細胞。(B) ウェスタンブロッティングによるEGFP-ERK2と内在性ERKの発現量比の見積もり。

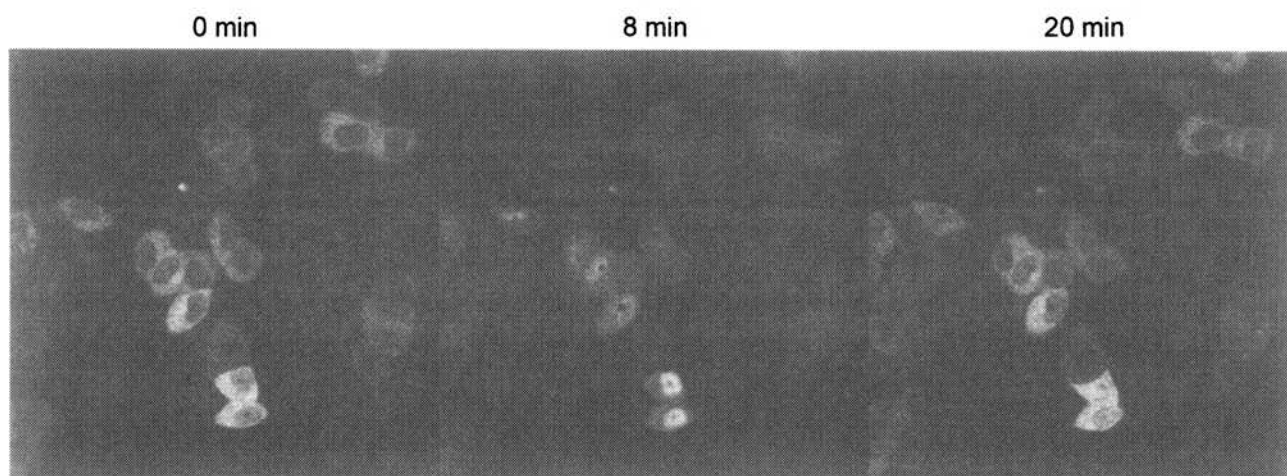


図3：EGFP-ERK2の生細胞蛍光イメージング

EGFP-ERK2を安定発現するPC12細胞を50 ng/mlのEGFで刺激し、EGFP-ERK2の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により可視化計測した。EGF刺激によってEGFP-ERK2が細胞質から核へと局在変化する様子が1細胞レベルで捉えられている。

3.2.2 ERKの核移行応答

論文投稿準備中のため省略。

3. 議論

論文投稿準備中のため省略。

4. 対象と手法

省略。詳細は修士論文を参照されたい。

参考文献

- Aoki, K., Yamada, M., Kunida, K., Yasuda, S., and Matsuda, M. (2011). Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12675–12680.
- Aoki, K., Takahashi, K., Kaizu, K., and Matsuda, M. (2013). A Quantitative Model of ERK MAP Kinase Phosphorylation in Crowded Media. *Sci. Rep.* *3*, 1–8.
- Burack, W.R., and Shaw, A.S. (2005). Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *J. Biol. Chem.* *280*, 3832–3837.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* *410*, 37–40.
- Cohen-Saidon, C., Cohen, A. a, Sigal, A., Liron, Y., and Alon, U. (2009). Dynamics and variability of ERK2 response to EGF in individual living cells. *Mol. Cell* *36*, 885–893.
- Colman-Lerner, A., Gordon, A., Serra, E., Chin, T., Resnekov, O., Endy, D., Pesce, C.G., and Brent, R. (2005). Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system. *Nature* *437*, 699–706.
- Costa, M., Marchi, M., Cardarelli, F., Roy, A., Beltram, F., Maffei, L., and Ratto, G.M. (2006). Dynamic regulation of ERK2 nuclear translocation and mobility in living cells. *J. Cell Sci.* *119*, 4952–4963.
- Ferrell Jr., J.E., and Bhatt, R.R. (1997). Mechanistic Studies of the Dual Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 19008–19016.
- Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R.E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., and Matsuda, M. (2006). Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* *281*, 8917–8926.
- Fukuda, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* *16*, 1901–1908.
- Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 2424–2428.
- Huang, C.Y., and Ferrell, J.E. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10078–10083.
- MacKeigan, J.P., Murphy, L.O., Dimitri, C.A., and Blenis, J. (2005). Graded mitogen-activated protein kinase activity precedes switch-like c-Fos induction in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 4676–4682.
- Qi, M., and Elion, E. a (2005). MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* *118*, 3569–3572.
- Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases : a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 320–344.
- Vaudry, D., Stork, P.J.S., Lazarovici, P., and Eiden, L.E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science.* *296*, 1648–1649.
- Whitehurst, A., Cobb, M.H., and White, M.A. (2004). Stimulus-Coupled Spatial Restriction of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Activity Contributes to the Specificity of Signal-Response. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 10145–10150.