トピックス

細胞内シグナルのアナログ・デジタル変換

新土優樹^{1,2}, 小迫英尊³, 佐甲靖志¹, 高橋恒一²¹理化学研究所細胞情報研究室²理化学研究所生命システム研究センター生化学シミュレーション研究チーム³徳島大学先端酵素学研究所藤井節郎記念医科学センター細胞情報学分野

1. はじめに

超感受性 (ultrasensitivity; スイッチ) や双安定性 (bistability; 記憶), 振動 (oscillation; 周期) などの非線形応答現象は, 反応システムを特徴付け, 生物が示す高次機能の根幹をなすものである. 我々は最近, 哺乳類細胞における細胞運命決定のマスター制御因子である ERK (extracellular signal-regulated kinase) のシステムが, 入力である成長因子刺激に対して超感受性を示すことを見出した¹⁾ ので, ここに紹介したい.

生物を構成する細胞は, 発生や成長, 傷の修復などのために, 常に増殖や分化, 細胞死などを繰り返している. このような「細胞運命決定」とは, 最終的には「増殖するかしないか」「分化するかしないか」といった類いの「0 か 1 か」の現象である. そのため, その背後にある分子システムの性質を想定すると, 直感的には, それはデジタルなスイッチのように機能すると都合が良いように思われる. これはあくまで直感的な推察にすぎないが, 酵母の細胞周期進行やカエル卵の成熟, 免疫応答などの系では, 現象の背後にある分子システムの非線形な性質が実際に重要な役割を果たしている²⁾⁻⁴⁾. これらの背景のもとに, 我々は哺乳類細胞における ERK のシステムを対象に, その性質をシステムの応答特性という観点から明らかにすることを目的に研究を行った.

2. ERK のリン酸化応答は“アナログ”である

ERK は進化的によく保存されているタンパク質キナーゼであり, 哺乳類細胞においては細胞の増殖や分化, 成長, 細胞死, がん化などの細胞運命決定に深く関わっている (図 1A). そのため, 先の例と同じように, ERK の応答もスイッチのように制御されていることが直感的には期待される⁵⁾. ところが, リン酸化

ERK (ERK はリン酸化によって活性化する) の量を入力である成長因子刺激の濃度の関数として計測すると, その応答はスイッチというよりむしろ“アナログ” (graded; 「傾斜のゆるやかな」, 「段階的な」) であることが知られている^{6), 7)}. 血清飢餓 PC12 細胞に様々な濃度の EGF (上皮成長因子) 刺激を与え, リン酸化 ERK の量をウェスタンブロットと免疫蛍光染色で解析することで我々もこの結果を追試したが, 応答のヒル係数はたかだか 1.2 程度であった (図 1B). このことから我々は, ERK のシステムにはリン酸化による活性化とは別の過程に, シグナルをデジタル化するメカニズムが存在するのではないかと考えた.

3. ERK の核移行応答は“デジタル”である

ERK のキナーゼ活性はリン酸化によって制御されているが, 実は ERK 依存的な細胞機能発現のためにはリン酸化だけでは不十分であり, 細胞質から核への局在変化 (核移行) が必要である⁸⁾. すなわち, 成長因子刺激によって誘導される ERK の核移行を ERK システムの出力とみなすことが可能である. そこで, 低発現させた GFP-ERK2 のライブイメージングもしくは免疫蛍光染色によって, 成長因子刺激に対する ERK の核移行応答を解析した. その結果, EGF 刺激に対する ERK の核移行応答は“デジタル” (switch-like) に起こることを見出した (図 1C). すなわち, ERK シグナルは核移行の過程でアナログな情報からデジタルな情報に変換されることが明らかになった. 応答のヒル係数は 4.1 であり, 核移行はリン酸化の場合よりものはるかに急峻な応答を示すことがわかる. なお, 異なる成長因子刺激 (PC12 細胞を NGF で刺激), もしくは異なる細胞 (HeLa 細胞を EGF で刺激) の条件でも解析を行ったが, いずれの場合も結果は同様であった. このことから, ERK シグナルのアナログ・デジ

Analog-to-digital Conversion in the Cellular Signaling System

Yuki SHINDO^{1,2}, Hidetaka KOSAKO³, Yasushi SAKO¹ and Koichi TAKAHASHI²¹Cellular Informatics Laboratory, RIKEN²Laboratory for Biochemical Simulation, Quantitative Biology Center, RIKEN³Division of Cell Signaling, Fujii Memorial Institute of Medical Sciences, Tokushima University

図 1 成長因子刺激に対する ERK の応答特性。(A) 哺乳類細胞において ERK は様々な細胞運命決定制御に関わる。(B) EGF 刺激に対する ERK のリン酸化応答。(C) EGF 刺激に対する ERK の核移行応答。刺激前の核内 ERK 量で規格化している。 n_H はヒル係数を表す。文献 1 の図を改変。

タル変換は、複数種類の細胞・成長因子刺激で観察される一般性の高い現象であることが示唆される。

4. | ERK 自身による ERK の核移行制御

次に、デジタルな核移行応答を生み出す分子メカニズムを検討した。超感受性を始めとする非線形応答現象では、自身の活性に依存した制御モチーフ（自己制御）がしばしば観察される。そこで、この可能性を検証するために、ERK のキナーゼ活性を阻害剤により抑えた条件下で ERK の核移行応答を解析した。その結果、阻害剤処理によって ERK の核移行応答がデジタルでなくなることが明らかになった（図 2A）。すなわち、ERK は自身のキナーゼ活性依存的に ERK の核移行を制御し、これによりデジタルな核移行応答を実現していることが強く示唆された。

5. | ERK と核膜孔複合体の相互作用と核移行制御

さて、それでは ERK はどのような分子機構を通じて ERK 自身の核移行を制御するのか。ERK には優に 100 種類を超える多数の基質が知られているが、「核と細胞質間の分子輸送に関わる」というタンパク質となると、実は候補は非常に限られてくる。そして、それらの数少ない候補のほとんどは、核膜孔複合体を構成するタンパク質群であるヌクレオポリン（Nups）であった。興味深いことに、ERK 依存的な Nups のリン酸化は、Importin- β や Transportin といった輸送運搬

図 2 ERK のキナーゼ活性と核移行制御。(A) ERK 阻害剤の存在下における ERK の核移行応答。 n_H はヒル係数を表す。(B) Nups をリン酸化させたセミインタクト細胞における GFP-ppERK2 の核移行。(C) ERK 依存的な Nups のリン酸化を介した ERK の核移行制御の模式図。文献 1 の図を改変。

体の核移行キネティクスを変化させることが報告されていた⁹⁾。そこで、ERK は Nups のリン酸化を介して自身の核移行を制御するのではないかという仮説をたて、これを検討した。そのために我々は、*in vitro* import assay を用いることで仮説の検証を行った。その結果、実験系の詳細は割愛するが、ERK 依存的な Nups のリン酸化によって ERK の核移行が 2 倍程度速くなることが明らかになった（図 2B）。このことから、ERK は Nups へのリン酸化を介して自身の核移行を制御するというモデルが考えられた（図 2C）。

6. | Nups は ERK のデジタルな核移行応答に重要である

上記の結果は、ERK と Nups の間に相互作用が存在し、それが ERK の核移行を制御するというを示すものであった。しかし当然のことながら、これを以って Nups が ERK のデジタルな核移行応答に寄与しているとは言えない。そこで我々は、数理モデルとノックダウン実験という 2 つのアプローチによって、Nups と ERK の核移行応答の関係を検討した。

まず、先の実験で得られた ERK と Nups の関係が、ERK のデジタルな核移行応答のメカニズムたりうるかを数理モデルにより検討した。先行研究で報告されていた ERK のリン酸化と核移行のモデル¹⁰⁾をベースに、ERK と Nups の制御関係を組み込んだモデルを構築した（図 3A）。モデルパラメータは、実測値が利用可能なものについてはその値を、未知のものについては実験データにフィッティングするよう最適化した。

図 3

ERK のデジタルな核移行応答における Nups の役割。(A) ERK と Nups の制御関係を組み込んだ ERK シグナルの数値モデルの模式図。(B, C) それぞれリン酸化応答, 核移行応答のシミュレーション結果 (実線)。点は実験値を示す。(D) Nup153 ノックダウン条件下における, ERK の核移行応答。 n_H はヒル係数を表す。文献 1 の図を改変。

その結果, 少なくとも数理的には, ERK と Nups の制御関係はデジタルな核移行応答を生み出せることがわかった (図 3B, C)。

そこで, 最後に駄目押しの実験として Nups のノックダウンを行った。ERK によって最も効率良くリン酸化される Nups である Nup153 を siRNA でノックダウンし, ERK の核移行応答を再度解析した。その結果, Nup153 のノックダウンにより ERK の核移行応答がデジタルでなくなることが明らかになった (図 3D)。以上の結果から, Nups が ERK のデジタルな核移行応答に重要であることが強く示唆された。

7. まとめ

本研究では, 哺乳類細胞における ERK のシステムがデジタルな応答を示すことを見出した。鍵となっているのは核移行の制御であり, デジタルな核移行応答には ERK 自身のキナーゼ活性と Nups が重要であることを明らかにすることができた。細胞の運命決定という過程を ERK が制御していることを考えると, ERK のデジタルな応答性は, 直感的には, 合理的であると思われる。一方で, デジタルな応答性というシステムの性質が生理的な意味で本当に重要なのかは, (今回の ERK のシステムに限らず) ほとんどわかっていない。このような, 反応システムの性質と細胞生理の関係をいかに結びつけていくかという問題は, システム生物学における今後の重要課題であろう。

謝 辞

本研究は, 科学研究費補助金 (特別研究員奨励費) の支援のもと行われた。この場を借りて謝辞を述べさせていただきたい。

文 献

- Shindo, Y. *et al.* (2016) Nat. Commun. 7, 10485. DOI: 10.1038/ncomms10485.
- Ferrell, J. E., Machleder, E. M. (1998) Science **280**, 895-898. DOI: 10.1126/science.280.5365.895.
- Doncic, A. *et al.* (2011) Mol. Cell **43**, 528-539. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.06.025.
- Shinohara, H. *et al.* (2014) Science **344**, 760-764. DOI: 10.1126/science.1250020.
- Caunt, C. J., McArdle, C. A. (2012) Biochem. Soc. Trans. **40**, 224-229. DOI: 10.1042/BST20110662.
- Whitehurst, A. *et al.* (2004) Mol. Cell. Biol. **24**, 10145-10150. DOI: 10.1128/MCB.24.23.10145-10150.2004.
- MacKeigan, J. P. *et al.* (2005) Mol. Cell. Biol. **25**, 4676-4682. DOI: 10.1128/MCB.25.11.4676-4682.2005.
- Brunet, A. *et al.* (1999) EMBO J. **18**, 664-674. DOI: 10.1093/emboj/18.3.664.
- Kosako, H. *et al.* (2009) Nat. Struct. Mol. Biol. **16**, 1026-1035. DOI: 10.1038/nsmb.1656.
- Ahmed, S. *et al.* (2014) Mol. Syst. Biol. **10**, 718. DOI: 10.1002/msb.134708.

新土 優樹

新土優樹 (しんど ゆうき)

理化学研究所細胞情報研究室 日本学術振興会特別研究員 PD
研究内容: システム生物学
連絡先: 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
E-mail: shindo@riken.jp

小迫 英尊

小迫英尊 (こさこ ひでたか)

徳島大学先端酵素学研究所藤井節郎記念医科学研究センター細胞情報学分野教授
研究内容: プロテオミクスを用いたシグナル伝達系の解明
連絡先: 〒 770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15
E-mail: kosako@tokushima-u.ac.jp

佐甲 靖志

佐甲靖志 (さこう やすし)

理化学研究所細胞情報研究室主任研究員
研究内容: 細胞内情報処理の研究
連絡先: 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
E-mail: sako@riken.jp
URL: <http://www.riken.jp/cell-info/>

高橋 恒一

高橋恒一 (たかはし こういち)

理化学研究所生命システム研究センター生化学シミュレーション研究チームチームリーダー
研究内容: 計算システム生物学, 脳型人工知能。最近では実験のロボット化など人工知能の科学研究への応用にも力を入れる。
連絡先: 〒 565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3
E-mail: ktakahashi@riken.jp
URL: <http://lbc.riken.jp/>