

蛍光相互相関分光法を用いた 生細胞内解離定数の定量

青木 一洋

要約：細胞は増殖因子やホルモンといった細胞外の入力シグナルを感知し、その情報は細胞内のシグナル伝達分子を介して処理され、最終的には表現型へと出力される。この細胞内の情報処理機構は「細胞内シグナル伝達系」と呼ばれる。細胞内シグナル伝達系の実体は、分子と分子の結合や解離、酵素反応といった物理化学的な化学反応と拡散の連鎖である。素反応は反応速度論的に常微分方程式で記述でき、拡散に関しては偏微分方程式で記述することができる。これらの微分方程式は計算機で適切なパラメーターを入力し計算することで数値解を得ることができる。したがって、原理的には細胞内シグナル伝達系の全構成因子の時間的、空間的なダイナミクスをすべて計算することが可能である。しかしながら、数値計算に必要となるパラメーター、つまり分子の初期濃度や反応速度論的な速度定数の情報が圧倒的に不足しており、細胞内シグナル伝達系を定量的にシミュレートすることが現状では難しい。このような状況を鑑み、著者らは細胞内シグナル伝達系の反応に関わるパラメーターを自分たちで実測し、そのパラメーターを使って定量的な細胞内シグナル伝達系のシミュレーションモデルを構築する、というボトムアップ的なアプローチで研究をすすめてきた。その一環で、著者らは、蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy) という方法を用いて生きた細胞内で解離定数を効率的に測定する方法を開発した。これにより、EGF-Ras-ERK シグナル伝達系に関与する 20 個以上の相互作用の解離定数を測定した。興味深いことに、生きた細胞内で測定された解離定数は、試験管内で測定された解離定数よりも 1~3 桁大きい、つまり結合しにくいことが分かった。これは細胞内では競合阻害による影響が非常に大きいことを示唆している。

1. はじめに

細胞は増殖因子やホルモンといった細胞外の入力シグナルを感知し、その情報は細胞内のシグナル伝達分子を介して処理され、最終的には表現型へと出力される。この細胞内の情報処理機構は「細胞内シグナル伝達系」と呼ばれる。この数十年の間に、非常に多くのシグナル伝達に関わる分子や経路が同定されてきており、複雑なネットワークを形成しているということまでわかってきた。また、この細胞内シグナル伝達系の破綻が、悪性腫瘍や自己免疫疾患といった疾病と深く関連することも明らかになってきている (1)。

細胞内シグナル伝達系は、複雑なネットワークであり、さながら電子回路のようである。細胞内シグナル伝達系の実体は、分子と分子の結合や解離、酵素反応といった物理化学的な化学反応と拡散の連鎖である。化学反応は反応速度論的に常微分方程式で記述でき、拡散に関しては偏微分方程式で記述することができる。これらの微分方程式は計算機で適切なパラメーターを入力し計算することで数値解を得ることができる。したがって、原理的には細胞内シグナル伝達系の全構成因子の時間的、空間的なダイナミクスをすべて計算することが可能である。しかしながら、現実にはそう甘くない。数値計算に必要となるパラメーター、つまり分子の初期濃度や反応速度論的な速度定数の情報が圧倒的に不足しており、細胞内シグナル伝達系の定量的なシミュレーションが難しいのである。これは、つまるところ、この数十年の分子生物学の発展により、新しい遺伝子や経路が次々と同定されてきたが、肝心の速度定数の測定がなおざりにされてきたことに起因する。電子回路は抵抗やコンデンサーの持つ物理特性が明らかであるため、数値計算によりその振る舞いを予

キーワード：蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光相互相関分光法、解離定数、細胞内シグナル伝達
京都大学大学院 医学研究科 時空間情報イメージング拠点 (〒606-8315 京都市左京区吉田近衛町医学部 F 棟 316)
E-mail: k-aoki@lif.kyoto-u.ac.jp 原稿受領日：2015 年 10 月 28 日、依頼原稿
Title: Quantification of dissociation constant in living cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy
Author: Kazuhiro Aoki

測できるのとは対照的である。もちろん、パラメーターの情報がわからなくてもパラメーター値を推定し、実験データに一致するようにフィッティングすることも可能であり、大半の細胞内シグナル伝達系のシミュレーション研究はこの手法をとっている。しかしながら、細胞内シグナル伝達系のように多くの分子が関与する場合、パラメーターの数が多くなり、推定自体が困難になることが多い（多数の局所最適解が存在する）。また、細胞内シグナル伝達系のすべてが明らかになっているわけではないため、フィッティングにより得られたパラメーター値は信頼性が低くなるという別の問題もある。

このような状況を鑑み、著者らは細胞内シグナル伝達系の反応に関わるパラメーターを自分たちで実測し、そのパラメーターを使って定量的な細胞内シグナル伝達系のシミュレーションモデルを構築する、というボトムアップ的なアプローチでここ数年研究をすすめてきた(2-4)。本稿では、最近、我々が報告した解離定数の生細胞内測定の例を紹介する(5)。

2. 従来の解離定数の測定法

細胞内シグナル伝達系において、もっとも広範に見られる反応の1つが分子間相互作用である。分子間相互作用の強さを表すパラメーターは解離定数 (K_d) である（単位はモラー [M]）。解離速度定数 (k_b [1/s]) を結合速度定数 (k_f [M/s]) で割った値が解離定数であり、解離定数の値が小さいときは強い結合を、逆に解離定数の値が大きいときは弱い結合を示す。分子 A と分子 B が結合し、複合体 AB を形成するという結合反応を考え、平衡状態のそれぞれの分子の濃度を [A], [B], [AB] とすると、解離定数 K_d は、

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

というように表すことができる。解析の都合上、上記の式は、

$$\frac{[AB]}{[A_{total}]} = \frac{[B_{total}] - [AB]}{K_d + [B_{total}] - [AB]}$$

と書き直すことができる。左辺は、分子 A が何割複合体を形成しているか (0 から 1 の間の値を取る)、右辺の $[B_{total}] - [AB]$ は、複合体を形成していない分子 B の濃度を示している。左辺が 0.5、つまり分子 A の半分が複合体を形成しているときのフリーの分子 B の濃度が K_d となる (図 1A 右)。

解離定数は、対象となるタンパク質分子を精製し、試験管内で結合させて、そのときの非結合分子と複合体の濃度から決定されてきた (図 1A)。具体的な手

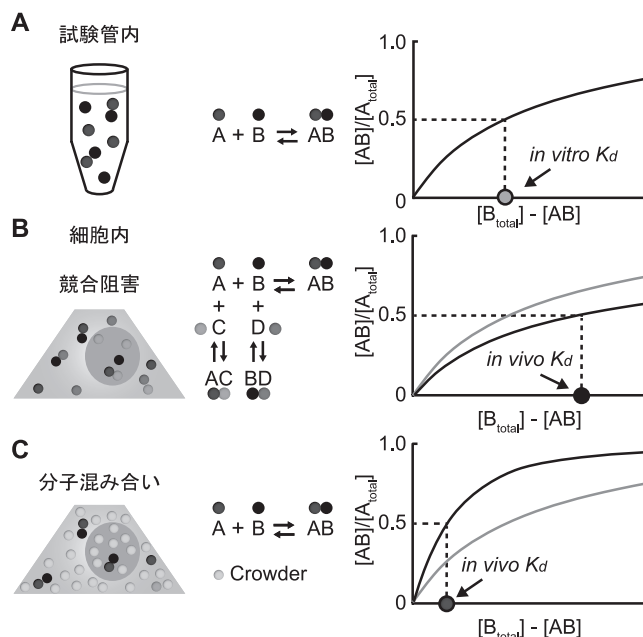


図1 試験管内の解離定数と細胞内の解離定数の違い

A: 試験管内の解離定数 ($\text{in vitro } K_d$) は理想的な環境下において測定される。したがって、純粋な物理化学的な分子間相互作用の強さが分かる。B: 細胞内では試験管内と異なり競合阻害の影響がある。この場合、分子 A と分子 B の結合は競合分子 C と D によって阻害されるため、細胞内解離定数 ($\text{in vivo } K_d$) は試験管内解離定数よりも大きくなる。C: 細胞内は分子混み合い環境にある。分子混み合い環境下では、細胞内解離定数は試験管内解離定数よりも小さくなる。(文献 5 より改変)

法としては、 in vitro 共沈法、等温滴定型熱量測定 (isothermal titration calorimetry: ITC)、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) 分析法などが挙げられる。タンパク質の精製はときに非常に困難を伴うが、これらの手法で得られた解離定数は、理想的な環境下における物理化学的な分子間相互作用の強さを反映した値である。

一方、細胞内は試験管内とは大きく環境が異なり、これにより細胞内の解離定数の値が試験管内のような理想的な環境下のそれと異なってくる。大きく分けて2つの効果が知られている。1つ目の効果は、他の結合分子による競合阻害効果である (図 1B)。細胞内は試験管内と異なり、例えば分子 A と分子 B 以外にも分子 A や B に結合する分子 C や分子 D のような分子が存在する。これらが相互排他的に結合する場合、分子 C や分子 D は分子 A と B の結合に対して競合阻害する。このような状況下において測定される見かけ上の解離定数は、試験管内の解離定数の値よりも大きな値を示す (図 1B 右)。つまり競合阻害に分子 A と分子 B は結合しにくくなる。2つ目の効果は、排除体積効果である (図 1C)。細胞内は細胞骨格分子やリボソーム、細胞内小器官といった背景分子で満たされており、細胞内の 10~40% の体積はこういった背景分子によって

占められていることが知られている(6). このような環境下では, 分子Aと分子Bが結合しているほうがエントロピー的に安定になる排除体積効果が現れる. つまり, 排除体積環境下で測定される解離定数は, 試験管内の解離定数の値よりも小さくなる(図1C右). 実際に細胞内においてこのような競合阻害効果や排除体積効果がどの程度寄与しているのかについては不明であった. また, 細胞内シグナル伝達系のシミュレーションに使うべき解離定数の値は, 試験管内の解離定数の値よりも競合阻害効果や排除体積効果を内包する細胞内の解離定数の値を使うべきである. 以上のような状況から, 著者らは生細胞内で解離定数を効率よく測定する手法を開発する必要があると考えるに至った.

3. 蛍光相互相関分光法による細胞内解離定数の測定

細胞内の解離定数を測定するため, 著者らは蛍光相互相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy : FCS) と蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy : FCCS) を利用することにした(7-9). 共焦点レーザー顕微鏡の測定領域 (実効体積: effective volume) は, フェムトリットル (約 10^{-15} L) 程度の微小な楕円形に近似できる. FCSはこの微小領域を出入りする蛍光分子の揺らぎを観測する方法である (図2A). 測定しようとする分子の濃度が低い場合, 1個あたりの分子の出入りは離散的になるため, 蛍光強度の揺らぎは大きくなる. 一方, 測定しようとする分子の濃度が高い場合は, 蛍光強度の変化が平均化されるため, 揺らぎは小さくなる. FCSでは, 蛍光強度の時系列情報の自己相関関数を計算し, y切片の値から実効体積内の蛍光分子の数を算出することができる. これを実効体積で割れば濃度が求められる. なお, FCSによる自己相関関数の時定数から, 蛍光分子の拡散定数を算出することもできる. FCCSは2種類の蛍光分子の揺らぎを同時に測定する (図2B). 2種類の蛍光分子が互いに相互作用していない場合は, それぞれの蛍光色素が独立に観察領域に入るため, 2つの分子のシグナルの変化はばらばらになる. 一方, 蛍光色素が相互作用しており, 同時観察視野を出入りする場合には, 大部分のシグナルが同時に変化して検出される. FCCSでは, 2つの蛍光強度の時系列情報から相互相関関数を計算し, y切片の値から複合体の分子数を算出することができ, 実効体積で割れば濃度になる. 解離定数の定義式から, 分子Aと分子Bの濃度 $[TotalA]$, $[TotalB]$ と複合体ABの濃度 $[AB]$ がわかれば解離

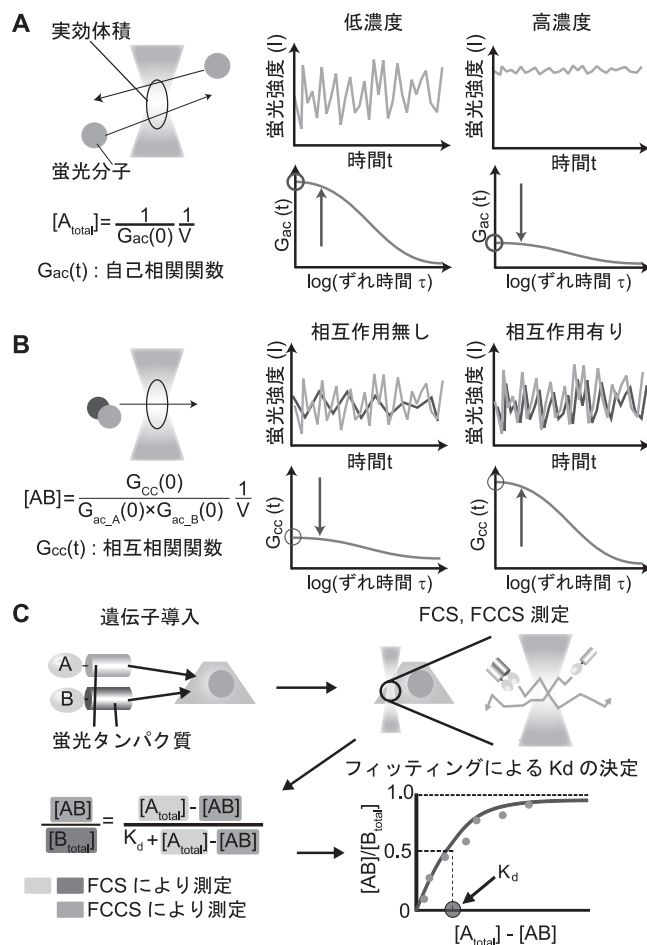


図2 蛍光相互相関分光法を用いた細胞内解離定数測定

A: 蛍光相互相関分光法 (FCS). B: 蛍光相互相関分光法 (FCCS). C: FCS と FCCS による細胞内解離定数測定の流れ. (文献5より改変)

定数を求めることができる (図2C). 前者2つの濃度はFCSで, 後者はFCCSで測定することができる.

著者らは, まず細胞内のFCS, FCCS測定に適している蛍光タンパク質の組み合わせを検討した. 溶液中のFCS, FCCS測定と比べて, 細胞内の場合には容積が限られているため, 蛍光分子の褪色が大きな問題となってくる. したがって, 褪色しにくくFCCS測定において蛍光の分離が容易な蛍光タンパク質の組み合わせが必須となる. 最終的に, mEGFPとHaloTag-TMR (tetra methyl rhodamine) の組み合わせが最適であることを見出した. HaloTagは33 kDaのタグタンパク質で, 化学修飾された蛍光リガンドと共有結合により結合できる性質がある(10). 蛍光リガンドのうちTMRリガンドはRFPと同等の波長特性を示し, mCherryなどのRFPと比べて明るく褪色も起こりにくい. mEGFPの蛍光がHaloTag-TMPに漏れ込まないように, HaloTag-TMRの検出波長は長波長側にずらしている (図3A). この条件下で, HeLa細胞にポジティブコントロールとしてmEGFP-HaloTag-TMR融合タ

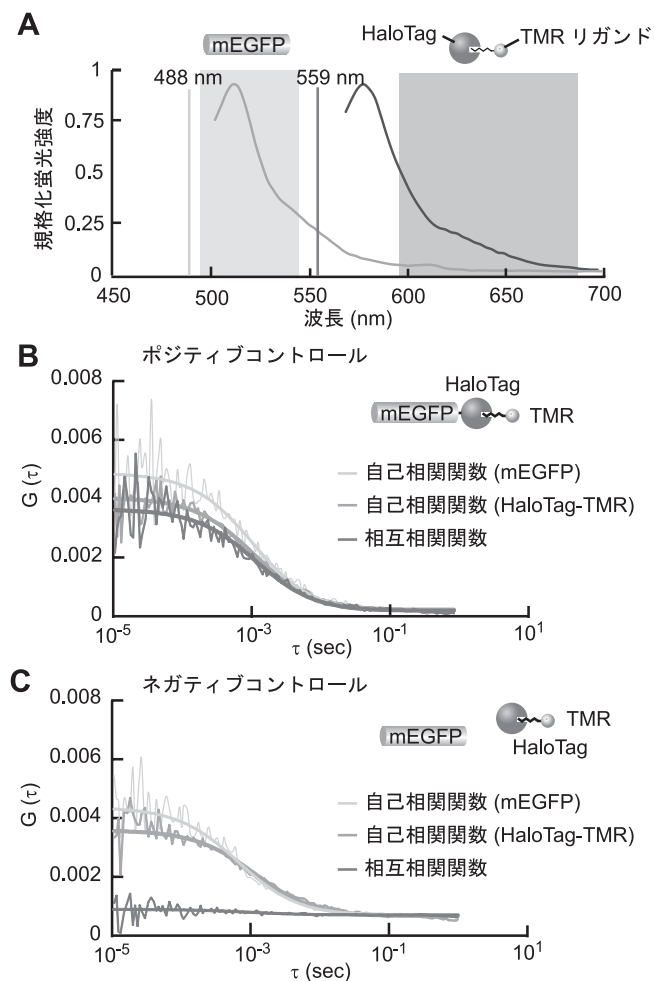


図3 蛍光相互相関分光法の一例

A: 蛍光相互相関分光法に用いた蛍光タンパク質 mEGFP と HaloTag-TMR の蛍光スペクトル。mEGFP は 488 nm で、HaloTag-TMR は 559 nm のレーザーで励起した。左のスペクトルが mEGFP、右のスペクトルが HaloTag-TMR の蛍光スペクトル。左枠と右枠がそれぞれ mEGFP、HaloTag-TMR の検出波長域。B: ポジティブコントロールとして、mEGFP-HaloTag-TMR 融合タンパク質の蛍光相互相関分光法 (FCCS) を行った。期待通り、相互相関関数の上昇が観察された。C: ネガティブコントロールとして、mEGFP と HaloTag-TMR を別々に発現させ、蛍光相互相関分光法 (FCCS) を行った。相互相関関数は低く抑えられたままである。(文献5より改変)

ンパク質をネガティブコントロールとして mEGFP, HaloTag-TMR を別々に発現させ、FCCS 測定を行った。期待通り、mEGFP-HaloTag-TMR 発現細胞では相互相関関数の上昇が確認されたが、mEGFP と HaloTag-TMR を別々に発現させると相互相関関数は全く上昇しなかった (図 3B, C)。検出器の測定誤差の影響を考慮し、このポジティブコントロール、ネガティブコントロールの値をそれぞれ 100% 結合、0% 結合として後の実験を補正した。

4. 細胞内解離定数の測定

著者らは、EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路を構成するシグナル伝達分子に mEGFP と HaloTag を融合させたタンパク質を HeLa 細胞に共発現させ、FCS,

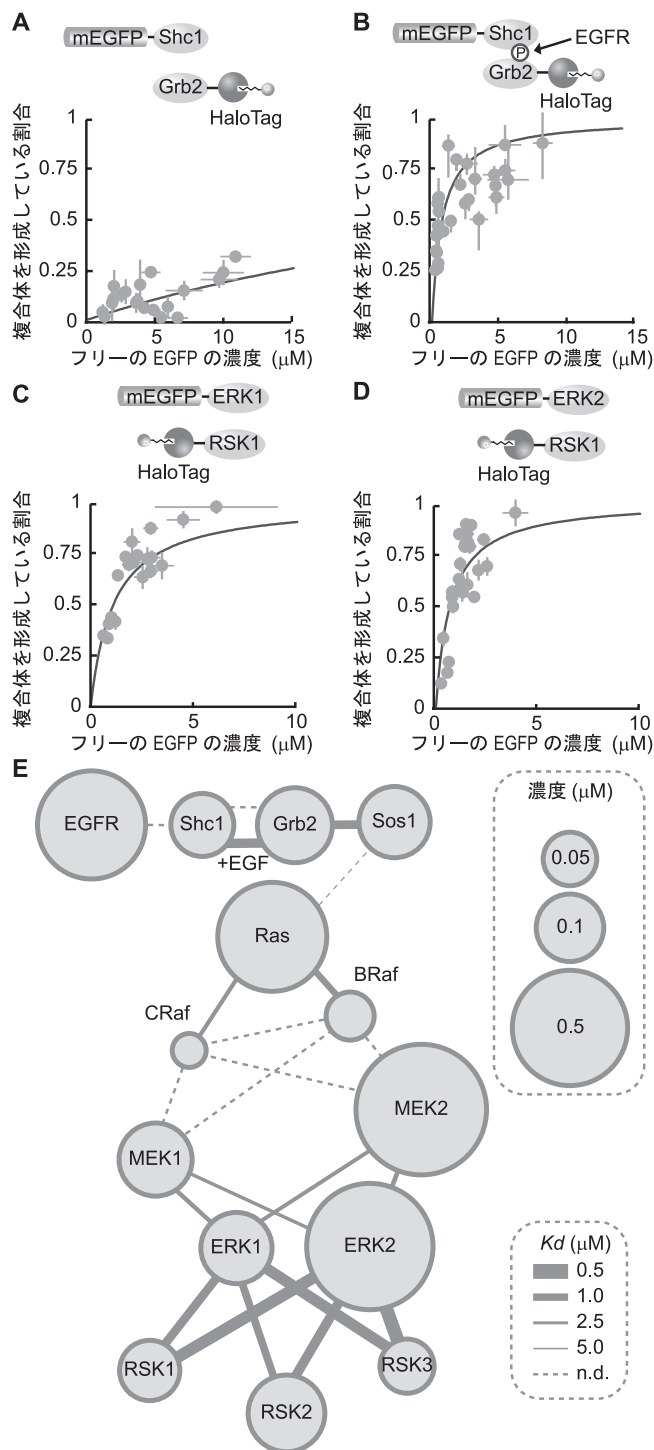


図4 蛍光相互相関分光法による細胞内解離定数測定

A: Shc1-Grb2 間の解離定数測定。Shc1 がリン酸化されていないので結合しない。赤線がフィッティング。B: Shc1-Grb2 間の解離定数測定。Shc1 がリン酸化されていると強く結合する。C: ERK1-RSK1 間の解離定数測定。D: ERK2-RSK1 間の解離定数測定。E: EGFR-Ras-ERK シグナル伝達系の内在性分子濃度と解離定数を基にした定量的マップ。(文献5より改変)

FCCS 測定により解離定数を決定した (図 4)。その幾つかの例を紹介する。

アダプタータンパク質の 1 つである Grb2 は他のアダプタータンパク質である Shc1 にリン酸化依存的に結合することが知られている (11)。なにも刺激を加え

ずに Grb2-Shc1 複合体の解離定数を測定したところ、少なくとも 15 μM 以上と弱い親和性を示した (図 4A)。次に、HeLa 細胞を上皮細胞増殖因子 EGF とチロシンホスファターゼ阻害薬である Na3VO4 で処理し、Shc1 へのチロシンのリン酸化を誘導した状態で Grb2-Shc1 複合体の解離定数を測定した。その結果、Grb2-Shc1 複合体の K_d 値は 1.4 μM と見積もられた (図 4B)。このように刺激依存的な解離定数の変化も捉えることができる。

この手法の技術的なアドバンテージは、タンパク質を精製する必要が無く、蛍光タンパク質を発現するベクターを遺伝子導入するだけでよい、という点である。タンパク質の精製は困難を伴うことが多く、これが解離定数や酵素反応速度の測定の 1 つの大きなハードルとなっている。一方、本手法では目的の遺伝子に蛍光タンパク質遺伝子を融合したキメラ遺伝子導入するだけであるので、技術的には非常に容易である。このメリットを活かし、ERK MAP キナーゼの 2 つのアイソフォーム (ERK1, ERK2) とその下流分子 RSK の 3 つのアイソフォーム (RSK1, RSK2, RSK3) (12) の解離定数、すなわち 6 つの解離定数を本手法で決定した (図 4C, D; ERK1-RSK1, ERK2-ERK1 の結合のみ図示)。不活性化状態の ERK は RSK と常時結合しており、その解離定数は 0.7~2.1 μM とアイソフォーム間で大きな違いはなかった。

著者らは、EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路を構成する 22 のタンパク質間相互作用の解離定数を本手法により測定した。これらの解離定数の値と定量的なウェスタンブロットティングにより測定した HeLa 細胞の内在性のタンパク質濃度の情報を基に、EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路の定量的な相互作用の「地図」を作製した (図 4E)。この図から、EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路は単純な上から下へと情報がスムーズに伝わるカスケードではなく、Raf の階層で律速になる「bowtie (ちょうネクタイ)」のようになっていることが直感的にわかる (13)。

さて、本研究で実測した生細胞内の解離定数とこれまで生化学的な手法で測定された解離定数を比較すると、興味深いことに生細胞内の解離定数は全て試験管内の解離定数より 1 桁から 3 桁ほど大きい、すなわち結合しにくくなっていることが分かった (表 1)。先述したように、細胞内では他の結合分子による競合阻害と分子混み合いによる結合の促進の二つの要素が試験管内と大きく異なるが、我々の結果は分子混み合いよりも競合阻害のほうが細胞内の相互作用に大きく影響していることを示唆している。

表 1 細胞内解離定数と試験管解離定数の比較

結合分子	解離定数 (μM)	
	細胞内解離定数 (in vivo K_d)	試験管内解離定数 (in vitro K_d)
Grb2-pShc	1.4	0.023~0.23
HRas(G12V)-CRaf	2.3	0.0021~0.13
MEK1-ERK1	6.6	0.058
ERK2-RSK1	0.87	0.15

5. おわりに

本研究により、FCS, FCCS による生細胞内解離定数の測定法をすることができた。また、生細胞内の解離定数は試験管内の解離定数とは大きく異なることを示すことができた。実際に、我々の EGFR-Ras-ERK シグナル伝達系マップに基づくシミュレーションモデルに試験管内の解離定数の値を用いると全く実験結果を再現しないが、今回測定したパラメーターを用いることで、予測性の高いモデルを作ることができた (5, 14)。課題としては、本手法では細胞質中のタンパク質間相互作用しか再現性よく解離定数を測定できていない。細胞膜と細胞質のタンパク質の相互作用は細胞内シグナル伝達系においても重要であることから、技術的な改良が望まれる。また、近年進展が著しい遺伝子編集技術 (15) と本手法を組み合わせることで、「内在性分子」の濃度と解離定数を 1 細胞レベルで測定することが可能になる。これはすなわち、抗体をつかわずともタンパク質の発現量が測定でき、さらに 1 細胞レベルであるので細胞間の不均一性や時間揺らぎのような現象にもアプローチすることができるようになる。いずれにせよ、こういった手法により細胞内シグナル伝達系をより「定量的」に理解できるようになる日は近いのではないかと考えている。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Hanahan D, et al. Cell. 2011;144:646-674.
- 2) Aoki K, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:12675-12680.
- 3) Fujioka A, et al. J Biol Chem. 2006;281:8917-8926.
- 4) Aoki K, et al. J Cell Biol. 2007;177:817-827.
- 5) Sadaie W, et al. Mol Cell Biol. 2014;34:3272-3290.
- 6) Fulton AB. Cell. 1982;30:354-347.
- 7) Shi X, et al. Biophys J. 2009;97:678-686.
- 8) Kinjo M, et al. Cold Spring Harb Protoc. 2011;1262-1266.
- 9) Sudhaharan T, et al. J Biol Chem. 2009;284:13602-13609.
- 10) Los GV, et al. ACS Chem Biol. 2008;3:373-382.
- 11) Rozakis-Adcock M, et al. Oncogene. 1995;11:1417-1426.
- 12) Zhao Y, et al. J Biol Chem. 1996;271:29773-29779.
- 13) Schilling M, et al. Mol Syst Biol. 2009;5:334.
- 14) Fujita Y, et al. FEBS J. 2014;281:3177-3192.
- 15) Cong L, et al. Science. 2013;339:819-823.

著者プロフィール

青木 一洋（あおき かずひろ）

京都大学大学院 医学研究科 生命動態システム科学拠点 時空間情報イメージング拠点，特定准教授，博士（医学）。
◇ 2002 年名古屋大学理学部卒業，'04 年大阪大学大学院医学系研究科医科学修士課程修了，'07 年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了，'08 年京都大学大学院生命科学研究科助教，'09 年さきがけ研究員（兼任），'10 年京都大学大学院生命科学研究科講師，'13 年より現職。◇研究テーマ：悪性腫瘍に関連する細胞内シグナル伝達系の定量的な解析。◇趣味：育児業。

