

細胞内情報分子ネットワークのダイナミクス

細胞膜受容体の活性化反応を中心に

大阪大学生命機能研究科ナノ生体科学

佐甲 靖志

我々は、細胞内分子の1分子機能計測法を開発し、分子・分子システムの解析を行っている。蛋白質をはじめとする生体情報分子の細胞内での分子の反応・動態を検出し細胞機能の発現機構を探ることが我々の研究テーマである。細胞内の分子は反応ネットワークの一員として機能している。各ネットワークの構成要素と基本構造は明らかになってきており、その各反応素過程における分子の動的挙動と反応速度論の解析が現在の課題である。

細胞内での1分子計測は分子ネットワーク解析の有力な実験方法のひとつである。生体分子の反応を記述する上で重要なパラメータは分子運動、会合・重合、結合・解離、酵素反応などいずれも時間的な変化を伴うものである。多分子平均の計測で時間的な情報を得るには反応を同期させることが必要だが、分子の反応は確率的に起こるので、平均化すると反応の詳細が覆い隠されてしまう。細胞内などでは、そもそも多数の分子の反応を同期させることが不可能な場合もある。一分子イメージングは同期の必要がないので、分子の反応機構を研究する上で大きな利点を持っている。

本稿では、細胞増殖情報を担う上皮成長因子(EGF)が、どのようにしてその受容体(EGFR)を活性化し、細胞応答を導くかを題材にして、細胞内分子ネットワークの働きを考える。EGFは分子量6,000程度の小蛋白質であり、細胞外液に分泌されて近隣の細胞のEGFRに結合し、細胞の変形・運動、細胞周期の再開を引き起こす(図1)。

EGFによる細胞応答のひとつに、EGF添加後1分程度で起こる一過性の細胞内カルシウム濃度上昇がある。細胞に様々な濃度の蛍光標識EGFを20秒間与え、細胞に結合したEGF分子数と、細胞が有意なカルシウム応答を起こす割合の関係を計測した(図2)。細胞あたり300分子の結合で半数の細胞にカルシウム応答が起こる。この細胞(HeLa)は細胞表面に数万分子のEGFRを発現しており、この

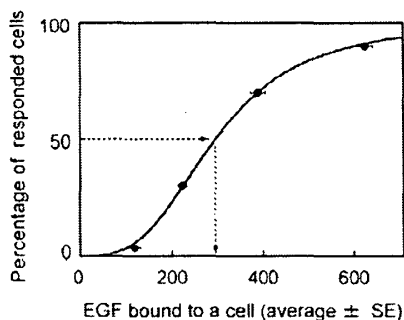


図2 EGFの結合数とカルシウム応答率
細胞あたり300分子の結合で半数の細胞が応答する。

ように1%にも満たない結合率で1分以内に細胞応答が見られるのは、いかにも不思議である。というのは、EGFR分子は単独で細胞外から細胞内へ情報を伝達することは不可能であり、(EGF/EGFR)₂という構成の2量体で働くことが明らかになっているからである。最近、細胞表面のEGFRの一部がEGF非存在下でも2量体を形成していることがわかってきた(図3)。しかし、すべてのEGFRがEGFと一緒に反応するとすれば、たとえすべての分子があらかじめ2量体を構成していたとしても、1%の結合率で2個のEGF分子が同じEGFR2量体に結合する可能性はほとんどない。

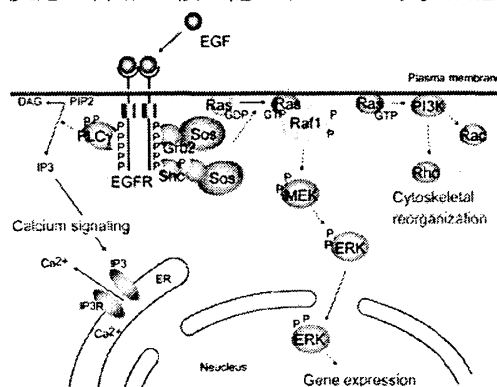


図1 EGF情報システムの模式図

細胞膜の受容体分子システムには、2量体形成の効率をよくする仕組みが存在するに違いない。

リガンドと受容体の結合反応は、すべての生体情報反応の開始点であり重要な分子認識反応である。リガンド・受容体間の反応は従来、多細胞系の平衡状態から計測されてきた。しかしながら、現実の細胞応答はほとんどの場合、結合反応が平衡に達するよりも遙かに早く開始し、しかも非常に少数の分子で起こることがEGF以外の系でも明らかになってきている。EGFRの2量体形成の問題を解くためにも、生きた細胞上で反応速度解析を、反応最初期の少数分子に対して行う方法が必要である。1分子可視化法を利用すれば、うまくいくかもしれない。

カバーガラス上に培養したHeLa細胞を斜光照明蛍光顕微鏡で観察しつつ、細胞外液に蛍光色素 tetramethyl rhodamine で標識したEGF(最終濃度0.1-0.5 nM)を加え、細胞表面へのEGFの結合過程を1分子観察した(図3A)。1分子観察法では、個々の結合部位の輝度分布から、各結合部位に存在するRh-EGFの分子数分布を求めることが出来る(図3B)。分布は2成分のガウス分布の和でよく近似でき、細胞表面へのEGFの結合曲線を、単独で結合している分子と2分子が同一箇所結合しているものの2成分に分割することが出来る(図3C)。このような、結合分子の集合度の分布がどのように時間変化するかという情報は、反応の詳細を告げるものであるが、従来の手法では直接的には得ることができなかった。

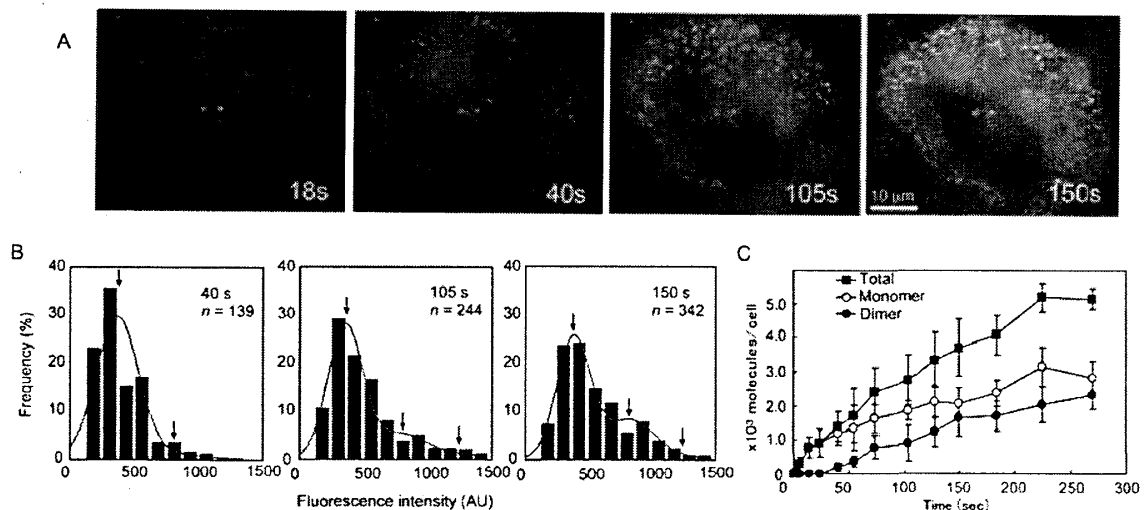


図3 Rh-EGFの細胞表面への結合

A. 結合の時間経過を表す連続写真。右下に細胞外液に0.5 nM Rh-EGFを加えてからの時間(秒)を示す。B. 40,105,150秒後における蛍光輝点の輝度分布。同一の1個の細胞から得られた輝度のヒストグラムを示す。nは輝点数。赤線は分布を2成分のガウス分布で近似した結果。各矢印は1,2,3分子の蛍光強度。C. 多数の細胞について同様の計測を行い、細胞あたりの結合分子数の時間変化を計測した(■)。輝点の輝度分布から結合数を単独で結合している分子数(□)と2つ同一箇所結合している分子数(●)に分けることができる。

図3で観察された1分子あるいは2分子のEGFを含む輝点は、細胞膜上に単量体と2量体のEGFRが存在することを示していると考えられる。(1分子輝点が単量体EGFRに結合しているとは限らないが。)そこで、ひとつひとつの輝点が生成する過程を直接観察すれば、受容体がどのような反応速度でEGFと結合するかを知ることができる。個々の反応を直接観察する利点は大きい。たとえば図4Aに示すように受容体2分子に2分子のEGFが順に結合してEGF-受容体複合体の2量体を形成する場合、図3C(■)の様な2量体の形成曲線は図4Aの τ_1 , τ_2 の和の分布に依存し、どちらの反応も確率過程であるから、図3Cのデータから τ_1 , τ_2 それぞれの値を精度良く求めることは困難である。

しかし、個々の事象を観察すれば、それぞれの分布を直接求めることができる。図4 B, Cでは、そのようにして τ_1 (図4 B), τ_2 (図4 C) の分布を求めた。EGF 2分子の明るさを持つ輝点は実質上すべて、図4 Aに模式的に示したように、1分子輝点が突然明るくなることによってできる。これは、先にRh-EGFが結合した受容体と空(から)の受容体が、2番目のEGF分子が結合するより前に複合体を形成していたためであると考えられる。

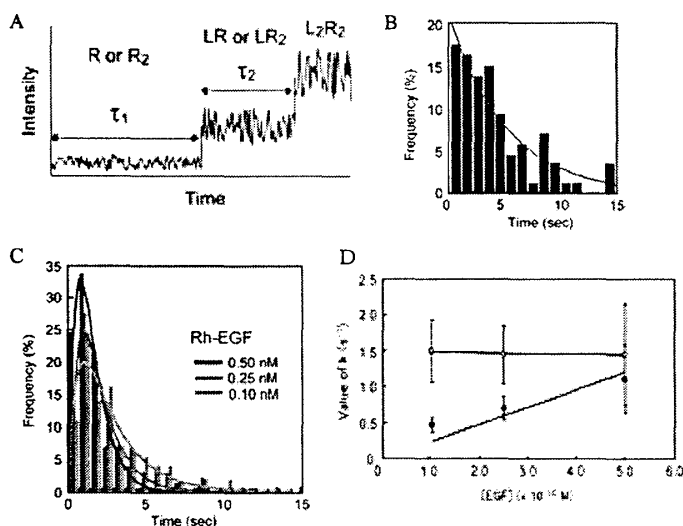
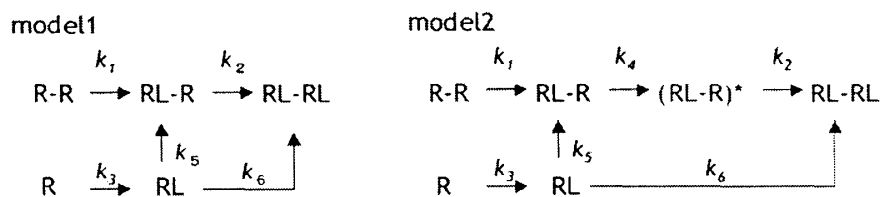


図4. EGF 結合過程の1分子計測
細胞外液にRh-EGFを加えてから、1分子の蛍光強度の輝点が現れるまでの時間(τ_1)と、1分子の輝点が2分子の強度になるまでの時間(τ_2)のヒストグラムを求めた。A: EGF/受容体の複合体形成による蛍光輝点の輝度変化を現す模式図。R:受容体,L: EGF, R_2 , L_2 はそれぞれの複合体を示す。B, C: τ_1 , τ_2 のヒストグラム。曲線はそれぞれの近似式。D: Cのヒストグラムの近似から求めた2つの速度定数のEGF濃度依存性。濃度に依存しない成分(○)と濃度に比例する成分(●)がある。

τ_1 の分布は1成分の指数関数で近似でき、 $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ という結合速度定数が求められた。細胞に与えるEGF濃度を変えてもほぼ同様の結果であった。一方、 τ_2 の分布は一山型となり、2つの指数関数の和で近似できる(図4 C)。EGF濃度を変えて計測を行い、EGF濃度に依存しない速度定数 1.5 s^{-1} の反応と、濃度に依存する $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の反応が直列に起こっていることが予想された(図4 D)。この結果は、最初のEGF分子が受容体に結合してから、次のEGFが別の受容体に結合して2つのEGF/受容体複合体の2量体が形成されるまでに、なんらかの中間状態が存在することを示している。このような反応中間体が見つかったのは初めてのことである。

EGF受容体(R)はEGF(L)の結合によって構造変化し、受容体2分子とEGF2分子からなる複合体(R_2L_2)を形成して活性化することが明らかになってきている。我々の方法ではEGF(L)だけが見えているので、先に検出した中間体を含む反応は $RL+R \rightarrow RL-R \rightarrow R_2L_2$ か、あるいは $RL-R \rightarrow RL-R^* \rightarrow R_2L_2$ のいずれかであると考えられる。そこで以下の2つの反応モデルを連立微分方程式で表し、最小自乗近似法を使って図3 Cの結合反応データに対する近似を行い、各反応パラメータを推定した。ここではEGFを与えてから200秒までの反応最初期だけを見ているので、解離反応やEGFの細胞内取り込みは無視している。この単純化が妥当であることは別に確かめた。



近似の結果、モデル1から得られた結合速度定数と中間体形成速度は、実験(図4)で求めた値と

10-100 倍異なり、このモデルは不適當であることがわかった。これに対してモデル2による近似から、 $k_1 = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_2 = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_4 = 1 \text{ s}$ が得られた。 k_2, k_4 の値は実験値と一致しており、また、図 2Bの結果から得られた結合速度定数は、 k_1 に当たることが示唆された。モデル2から予想される単量体の結合速度 k_3 ($2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)は k_1 の1/100であることから、反応最初期においては、ほとんどのEGFが受容体の2量体に結合すると考えると、この結果をうまく説明することができる。以上のようにモデル2の信憑性は非常に高い。モデル2から得られた k_5, k_6 の値は共に 0.003 s^{-1} 、またR, R₂の細胞あたりの数はそれぞれ 22,000 と 200 であった。

以上のように、細胞表面に数万分子存在する EGF 受容体のわずか 1%ほどが、EGF なしに 2 量体 (predimer)を作り、predimer に対する EGF の結合速度は単量体の 100 倍速いこと。2 量体に対する 2 個の EGF の結合には正の協同性があり、2 個目の結合は 1 個目の 10 倍速いことが明らかになった。受容体の単量体が EGF 結合後に 2 量体化する反応は大変遅いと予想され、実際、この実験系ではほとんど観察することができなかつた。この結果は、リガンドに対する結合速度が受容体の 2 量体形成および 2 量体に対する協同的結合で著しく上昇し、効率的に 2 量体が形成されることを示している。最近、EGF 受容体の X 線結晶解析が進歩し、リガンドに対する親和性が低く、単量体を作る状態 (tethered 構造) と、リガンドと結合して伸長し、2 分子で 2 量体を作る構造 (extend 構造) の 2 つのコンフォメーションがあると考えられるようになってきている。我々の結果は、predimer が extended 構造に近い構造をとることで、EGF の結合反応速度を大幅に増加させ、さらに最初の EGF の結合が allosteric な構造変化によってもう一つの結合部位の反応速度をさらに上昇させると考えると、構造学的情報と整合性よく説明できる (図 5)。

以上のように、1 分子計測法から得られる情報と反応ネットワークモデルを組み合わせることによって、細胞内分子システムの反応機構の詳細を明らかにすることが可能であり、細胞がごく少数の情報分子に高感度で応答する仕組みの一端が明らかになったといえる。

ところで、細胞外から信号物質が細胞表面にやってくる場所と時間は本来確率的なものである。それに対して細胞は反応速度の大きい predimer と正の協同性を持つ結合を準備して、2 量体のある場所に選択的にリガンドが結合するように仕組んでいる。このように見れば、「受容体分子システムは確率的に起こる (ゆらぐ) 入力から安定な出力を作り出す。」と強弁することもできるかもしれない。しかし、本当に面白いのは、ゆらぐ (あるいはあまりゆらが無い) 入力を変調して (思いのままに) ゆらぐ出力を作り出すシステムかもしれない。そのようなシステムが、細胞の中にあるだろうか？

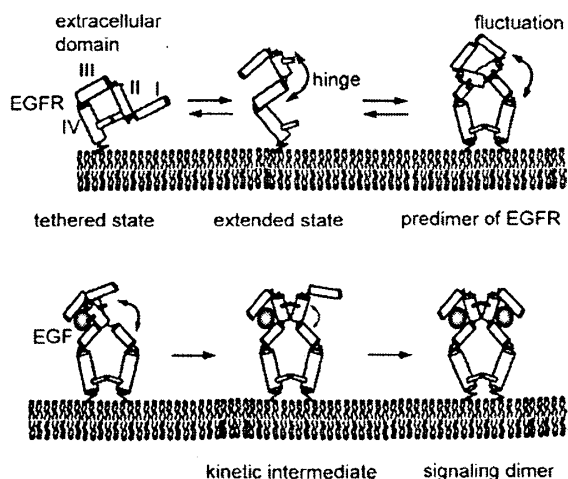


図5 構造ゆらぎによる反応中間体形成モデル

EGFR は tethered または extended と呼ばれる結晶構造を持つ。tethered 構造では分子内相互作用により、EGF 結合部位が変形し、親和性が著しく低くなっていると考えられている。extended 構造は 2 量体中に見られる構造であり EGF が結合している。我々の結果は predimer 形成によって受容体の構造ゆらぎが extended 状態に近づき、さらに一つ目の EGF 結合によってもう一方のからの受容体がほとんど extended に等しい構造に allosteric に変化する (EGF は一方の受容体としか相互作用しない) と考えれば、説明できる。