

生細胞における1分子キネティクス

大阪大学生命機能研究科ナノ生体科学 佐甲 靖志

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。分子生物学の進展により、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、1分子計測による分子間相互作用解析技術で明らかになった上皮成長因子(EGF)とEGF受容体の結合反応、成長円錐における神経成長因子(NGF)とNGF受容体の結合反応について述べる。

1) 上皮成長因子(EGF)とEGF受容体の結合反応

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、現実の細胞応答は細胞毎に大きな分散があり、また、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多くの系で明らかになってきている。個々の細胞で、反応速度解析を、反応ごく初期の少数分子で行う方法が必要である。1分子可視化法を利用してこの課題を解決することを目標として、上皮成長因子(Epidermal growth factor: EGF)と受容体の結合反応計測を行った。EGFは細胞増殖を誘導するペプチドである。

EGF受容体の反応においては2量体形成が重要であることがわかっている。我々の方法では、個々の結合部位を直接可視化しているために、結合部位のリガンド結合数分布と総結合分子数を知ることが可能である。また、1分子毎の結合反応を直接計測することにより、従来知られていない2量体形成の反応中間体を発見することができた。これらの情報から反応モデルを組み立て、最小自乗近似法を使ってリガンド結合数分布の時間変化データから、各反応素過程の速度定数を決定することができた。得られた結果は、受容体の2量体形成と構造変化を利用することによって、受容体分子の1%以下に対するリガンドの結合で、効率よい細胞応答が実現されていること

を示唆している。(Uemura et al., 2005; Teramura et al.投稿中)

上皮成長因子の細胞表面への結合

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 (Rh-EGF, 最終濃度 0.1-0.5 nM)を加え、細胞表面への Rh-EGF の結合過程を 1 分子観察した (図 1 A)。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 1 B)。分布は 2 成分のガウス分布の和でよく近似され、細胞表面への Rh-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 1 C)。このような結合分子分布の時間変化に関する情報は、反応の詳細を現しており、従来の手法では直接的には得ることのできなかつたものである。

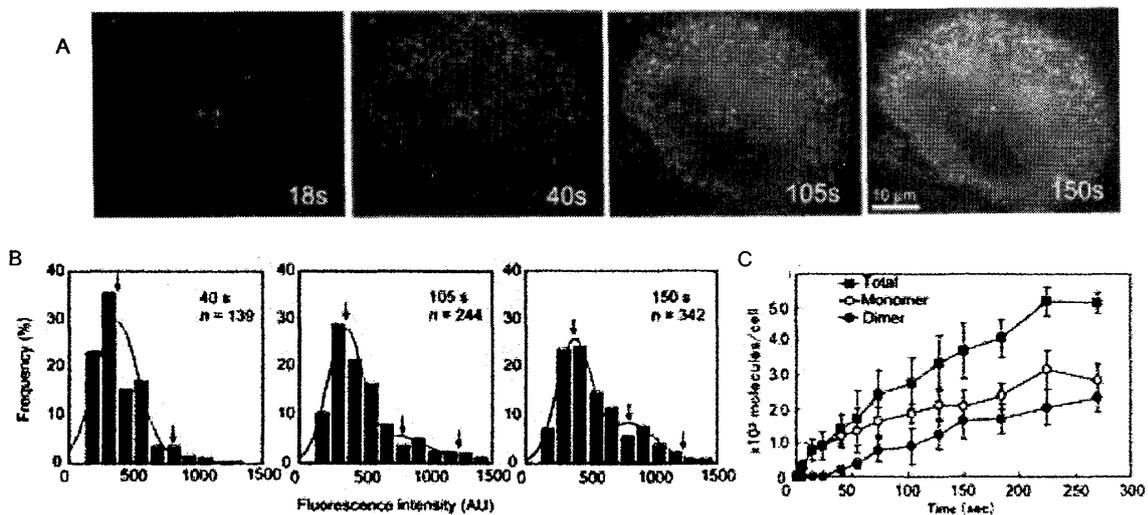


図 1 Rh-EGF の細胞表面への結合

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。

結合反応速度の 1 分子計測

EGF 受容体の活性化は、EGF-受容体複合体の 2 量体化を経由して起こると考えられている。我々の最近の研究結果などから、細胞表面には単量体として存在する受容体の他に、EGF 結合以前から 2 量体を形成している受容体があることが明らかになってきた。しかし、単量体、2 量体の各受容体がどのような反応速度で EGF と結合するかは不明である。

1 分子計測は、個々の分子の結合時間を直接計測することができる。図 2 A に示すように、たとえば受容体 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 1 C (■) の様な 2 量体の形成曲線は図 2A 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1C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、個々の事象を直接観察すれば、それぞれの分布を直接求めることができる。図2B, Cでは、そのようにして τ_1 (図2B), τ_2 (図2C) の分布を求めた。Rh-EGF 2分子の明るさを持つ輝点は実質上すべて、図2A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。この時、先にRh-EGFが結合した受容体と空の受容体が、2番目のRh-EGF分子が結合するより前に複合体を形成していたものと考えられる。

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Rh-EGF濃度を変えてもほぼ同様の結果であった。この結合速度定数が、単量体受容体に対するものであるか、2量体に対するものか、あるいはどちらも同程度の速度定数であるのかは、この結果だけではわからない。

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。Rh-EGF濃度を変えて計測を行い(図2C)、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2D)。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。

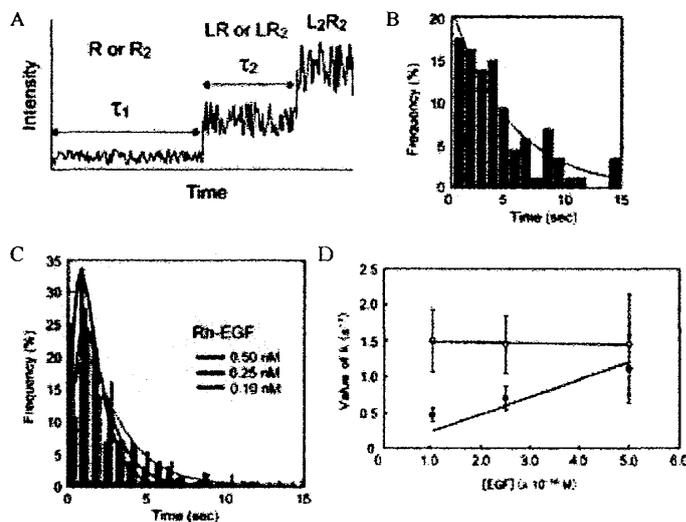
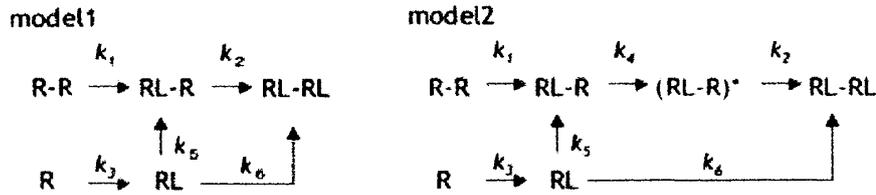


図2. EGF 結合過程の1分子計測
細胞外液にRh-EGFを加えてから、1分子の蛍光強度の輝点が現れるまでの時間(τ_1)と、1分子の輝点が2分子の強度になるまでの時間(τ_2)のヒストグラムを求めた。A: EGF/受容体の複合体形成による蛍光輝点の輝度変化を現す模式図。R:受容体,L: EGF, R₂, L₂はそれぞれの複合体を示す。B, C: τ_1 , τ_2 のヒストグラム。曲線はそれぞれの近似式。D: Cのヒストグラムの近似から求めた2つの速度定数のEGF濃度依存性。濃度に依存しない成分(○)と濃度に比例する成分(●)がある。

EGF と受容体の結合反応モデル

EGF受容体(R)はEGF(L)の結合に依って構造変化し、受容体2分子とEGF2分子からなる複合体(R₂L₂)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 → RL-R → R₂L₂か、あるいはRL-R → RL-R* → R₂L₂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1Cの結合反応データに対するフィッティングを行った。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。

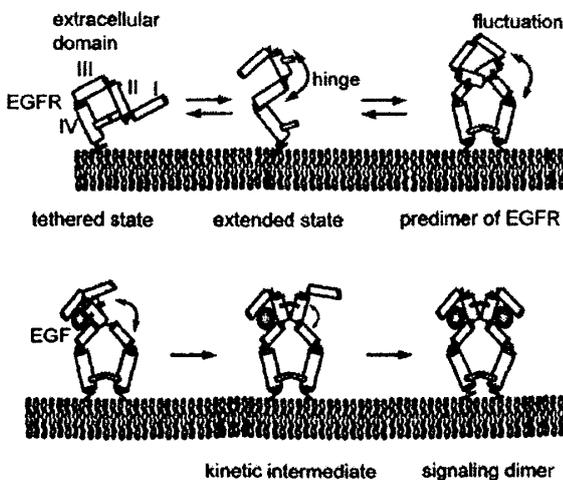


近似の結果、モデル1からは実験(図2)で求めた2つの結合速度定数に相当するものが現れず、不適当であることがわかった。これに対してモデル2による近似から、 $k_1 = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_2 = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_4 = 1 \text{ s}$ が得られた。 k_2, k_4 の値は実験値と一致しており、また、図2Bの結果から得られた結合速度定数は、 R_2 に対する1個目のLの結合速度であることが示唆された。モデル2から予想されるRに対するL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_3, k_6 の値は共に 0.003 s^{-1} 、またR, R_2 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、2量体を作り、2量体に対する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った。

以前に、我々はEGFによる細胞応答が、細胞あたり300分子のEGF結合で起こることを明らかにした。単純な結合反応で細胞あたり数万分子の受容体に300分子のリガンドが結合して2量体が形成される可能性は非常に低い。今回の結果は、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。細胞がごく少数の情報分子に高感度で応



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。

答する仕組みの一端が明らかになったといえる。

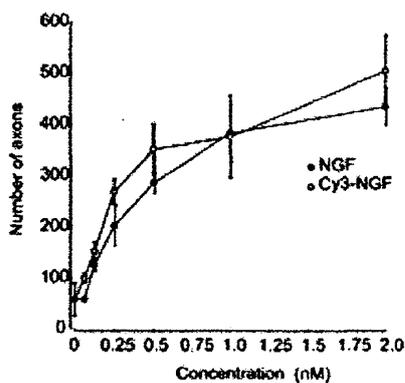
成長円錐における神経成長因子(NGF)と NGF 受容体の結合速度、解離反応計測

細胞応答はしばしば細胞局所の反応によって引き起こされる。従来の生化学手法は細胞集団を対象にしており、局所的な分解能を持っていない。神経成長因子(Nerve growth factor: NGF)による神経伸長は、神経軸策先端の成長円錐で起こる局所的な細胞応答である。この細胞応答を題材として、細胞局所の限られた数の分子による反応を1分子可視化法で解析する方法を開発した。すなわち、神経成長因子(nerve growth factor; NGF)の蛍光標識法を確立し、ニワトリ後根神経節細胞の単一成長円錐における NGF-受容体複合体の結合解離反応を計測し、成長円錐の伸展を引き起こす分子数を決定した。(Tani et al.,2005)

蛍光標識 NGF の合成と細胞表面での1分子観察

NGF, NGF 受容体の細胞内動態や反応を追跡するために、蛍光標識した NGF 分子を利用することが考えられるが、通常の抗体標識などで行う蛋白質のアミノ基(N-末端、Lys)への標識は、NGF の生理活性を失わせる。そこで、NGF β -subunit (NGF の生理活性は β -subunit だけですべて正常に発現される)のカルボキシル基を適当なクロスリンカーの反応でチオール基に変換し、マレイミド化された蛍光色素 Cy3 で標識する方法を開発した。反応条件を検討し、 β -subunit あたり1個の蛍光色素が導入される条件を見つけた。

Cy3 を導入し、精製した蛍光 NGF(Cy3-NGF)が、非標識 NGF とほぼ同様の生理活性を持つことを、ニワトリ後根神経節(dorsal root ganglion, 以下 DRG)細胞の応答性から確認した(図3)。



さらに我々が従来開発してきた、細胞内蛍光1分子観察法によって、DRG 細胞あるいは PC12 細胞の成長円錐や細胞体表面で、Cy3-NGF が1分子観察できることを確認した(図4)。

図3. Cy3-NGF の生理活性

NGF および Cy3-NGF を与えた神経節から18時間後に伸長した軸策の数をプロットした。Cy3-NGF が非標識 NGF とほぼ同様の生理活性を持っていることがわかる。

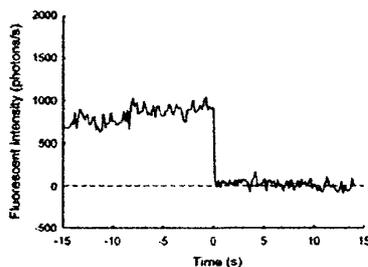
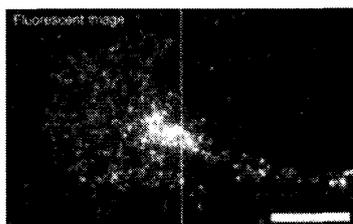


図4成長円錐上での1分子可視化。
輝点の1段階褪色(右)から、1分子が検出されていることがわかる。

成長円錐伸展運動と NGF 信号

Cy3-NGF の添加によって、成長円錐のフィロポディアは退縮し、ラメリポディアの伸展が起こる。成長円錐上の Cy3-NGF 分子結合数の時間変化と成長円錐の伸展運動を同時計測し、伸展に必要な NGF 分子数を求めた (図 5)。0.4nM Cy3-NGF を培養液に添加し、成長円錐の面積変化を計測して、添加約 1 分後から伸展が起こることを観察した (図 5 B)。おなじ成長円錐で計測した Cy3-NGF の結合分子数は、添加 1 分後には 40 分子であった (図 5 A)。従って、平均 40 分子の結合が成長円錐の伸展運動が引き起こすに十分であることが明らかになった。

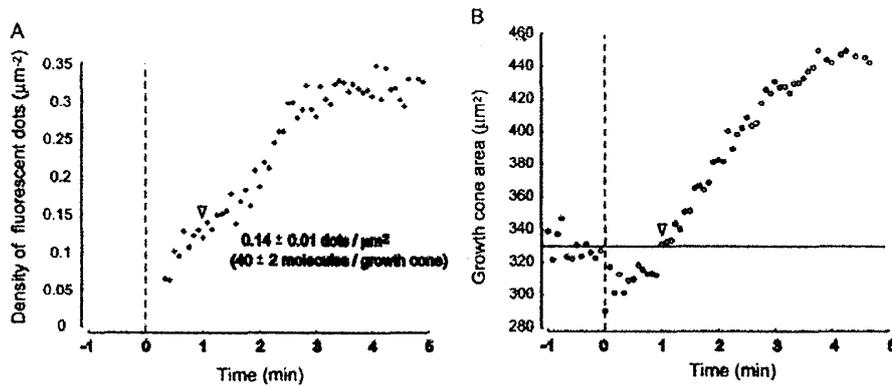


図 5. Cy3-NGF の結合と成長円錐の伸展
細胞外液に 0.4nM の Cy3-NGF を加え、成長円錐への結合分子数(A)と、成長円錐の面積(B)の時間変化を計測した。6つの成長円錐の平均を示す。

成長円錐における NGF/NGF 受容体の結合・解離反応

成長円錐上の NGF 受容体に対する Cy3-NGF の結合反応を観察し、結合速度を求めた (図 6)。0.4nM Cy3-NGF では成長円錐あたりの結合数は、添加後の時間と共に増加し、数分で平衡状態に到達した (図 6 A)。1 次の反応速度は $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、平衡状態での結合数は 160 分子であった。

同様の計測を Cy3-NGF 濃度を変えて行い、結合曲線を作製した (図 6 B)。単純な結合・解離

反応を仮定したモデルに実験データを近似し、解離定数 $2.7 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、成長円錐上の結合部位数 180 と求められた。

次に、結合が平衡状態に達してから細胞外液を洗浄して、その後の成長円錐上の蛍光強度減少を計測して、解離速度定数を求めたところ、 $8.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ という値が得られた (図 7)。

この解離速度定数の値と、先に求めた 0.4nM Cy3-NGF における結合速度から計算される解離定数 $3 \times 10^{-11} \text{ M}$ は平衡状態の結合曲線 (図 6 B) から求めた解離定数 $2.7 \times 10^{-11} \text{ M}$ とよく一致している。

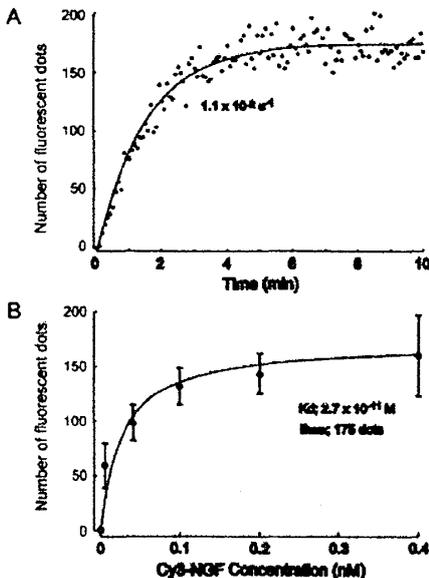


図 6. 成長円錐における Cy3-NGF と受容体の結合反応
A 0.4nM Cy3-NGF での結合速度
B Cy3-NGF と受容体の結合曲線

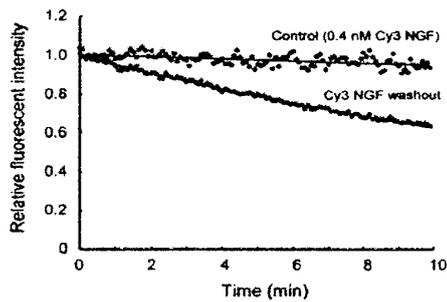


図7. Cy3-NGFとNGF受容体の解離反応
0.4nM Cy3-NGF存在下で結合が平衡状態に達してから時間0に外液を洗浄しCy3-NGFを取り除いた。その後の成長円錐に結合した蛍光強度の時間変化を示す。Controlは洗浄しなかった場合で、わずかな強度の減少は光褪色による。速度定数を求める際には褪色の影響を補正している。

従来、多細胞・多分子を扱う生化学的な方法により、細胞には親和性の異なる2種のNGF結合部位が存在することが知られている。上で求められた解離定数は高親和性結合部位の解離定数と一致している。すなわち、成長円錐には高親和性のNGF結合部位が180存在し、その内の40箇所にはNGFが結合すると成長円錐の伸展が起きると考えられる。

以上のように、生細胞における1分子可視化計測によって、300-400 μm^2 の成長円錐という細胞局所において(細胞膜全体は数千 μm^2)、数十から数百分子の反応を計測し(細胞全体の受容体数は数千から数万分子)、反応速度パラメータを求めることが出来るようになった。

参考文献

Tani, T., Miyamoto, Y., Fujimori, K., Taguchi, T., Yanagida, T., Sako, Y. and Harada, Y. (2005.3)

Trafficking of ligand-receptor complex on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of the axon: a single-molecule analysis. *J. Neurosci.* 25, 2181-2191.

Uyemura, T., Takagi, H., Yanagida, T. and Sako, Y. (2005) Single-molecule analysis of epidermal growth factor signaling that leads to ultrasensitive calcium response. *Biophys. J.* in press.