

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21625

研究課題名(和文) 高速1分子イメージングによる核膜孔局所におけるERK輸送機構の解明

研究課題名(英文) High-speed single molecule imaging for evaluating the ERK transport mechanism locally around the nuclear pore complex

研究代表者

毛利 一成 (Mouri, Kazunari)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：00567513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は外部刺激に応答するかしないかの二値的応答を示す。我々は、リン酸化ERKレベルはアナログな応答を示すが、ERK核移行においてデジタルな応答に変換される結果を得ている。ERKは必ず核膜孔を通過するため、通過の酵素反応に、上記変換の特徴が含まれると考えられる。このキネティクスを計測すべく、蛍光相関分光法を、安価な共焦点顕微鏡装置で開発した。この手法とFRAP計測を統合し、ERKの核膜孔通過の酵素反応速度定数の推定を行うことが可能となった。さらにこのキネティクスと分子機構の詳細を明らかにするため、1分子計測の実験系を全反射顕微鏡により開発し、ERKの核膜での1分子計測を実現した。

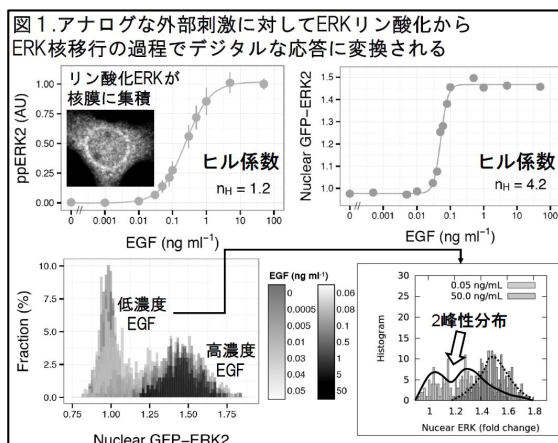
研究成果の概要(英文)：Cells respond to external signals as a binary way. We have revealed that the phosphorylation level of ERK gradually increased depending on external signals, but the translocation of ERK behaved like a switch for them. The characteristics of this analog-to-digital conversion will be reflected in the enzyme reaction of ERK transport through nuclear pore complex (NPC). To verify this kinetics, we developed a new fluorescence correlation spectroscopy (FCS) using a conventional confocal laser scanning microscopy. We integrated this method and FRAP experiments, and enabled the estimation of enzymatic reaction rate constants of NPC in transporting ERK. Furthermore, in order to directly clarify the transport mechanism of ERK, we developed a single molecule imaging system using a total internal reflection fluorescence microscopy and realized a single molecule ERK imaging on NPC.

研究分野：細胞生物学、生物物理学

キーワード：1分子計測 ERK 核膜孔通過 FCS

1. 研究開始当初の背景

我々は EGF 刺激に対する PC12 の運命決定を長期計測し数理モデルを構築・解析した結果、刺激後の増殖・分化応答は確率的だが、その確率は栄養条件に依存して生存に有利に選択されることを示した (毛利, PLoS Comp. Biol., 2013)。さらに長時間ライブイメージングにより ERK 核移行に振動や細胞ごとのばらつきが見られ、運命決定への ERK の関わりが示唆された。そこでこの応答確率性の原因を明らかにするため、ERK リン酸化や核移行など複数の指標で EGF 応答を計測した結果、EGF に対する ERK 核移行は高い Hill 係数の「全か無か」型の応答を示した。つまり低濃度 EGF 下で核内 ERK 濃度は 2 峰性に分布し、一部の細胞のみ確率的に応答した。EGF への細胞質でのアナログ的応答が、ERK 核移行の初期段階でデジタル的応答へと変化することが示唆される (新土, Nat Commun, 2016)。また ERK リン酸化・核移行の同時ライブイメージングにより、リン酸化 FRET プローブの応答から約 1 分後からスタートし約 2 分かけてゆっくり核移行が進み、この核移行途上で核膜周辺に ERK の集積が見られた。これらから核移行が律速段階であり、アナログ・デジタル変換に関与している可能性が強く示唆されたが、その具体的な詳細は不明であった。



2. 研究の目的

(1) 上記キネティクスを明らかにするためには、生細胞内の ERK の絶対定量が必須であ

る。この絶対定量を実現することにより、核膜孔が ERK を通過させる酵素反応速度定数の定量化を行う。

(2) さらに上記キネティクスを直接明らかにするためには 1 分子観察が適している。核膜孔複合体は構造的・機能的に、細胞質線維、細胞質側チャンネル、核質側チャンネル、核バスケットの 4 つのコンパートメントに分かれていることが知られている。これまで、中央部の機能的細孔を小分子が自由拡散により通過し、importin 依存性の核輸送ではチャンネル壁を構成する核膜孔タンパク質 (FG-Nups) との相互作用により通過すると考えられており、いずれもミリ秒程度の高速な輸送過程である。そこで、ERK のユニークな核膜孔通過メカニズムを解明するために、ERK の核膜孔通過キネティクスを時間分解能 1ms 位置精度 30nm の高速 1 分子イメージング顕微鏡法を用いて詳細に計測する。

3. 研究の方法

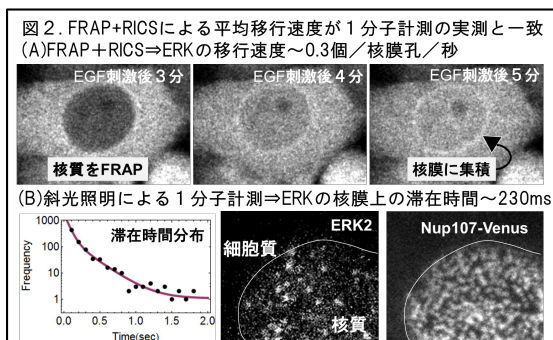
(1) 細胞内蛍光タンパク質濃度を絶対定量するためには従来蛍光相関分光法 (FCS) が用いられるが、高価な装置が必要であった。これに代わって、一般的な共焦点顕微鏡の画像解析により拡散係数や濃度を推定する Raster-scan Image Correlation Spectroscopy (RICS) が開発されたが、この手法を生細胞に適用した場合、細胞の動きや細胞内小器官の動きの影響を受け、正確な測定が難しいことがわかってきた。そこで我々は、安価な共焦点顕微鏡装置をベースに FCS に匹敵する情報を得られる手法を開発した。

(2) In vitro での 1 分子計測 (岡田, Science, 1999) や細胞膜上の in vivo 1 分子計測法 (佐甲, Nat Cell Biol, 2000) が開発されて久しいが、核付近のような細胞深部での 1 分子計測は困難であった。我々は、核内および核膜表面での 1 分子計測・超解像イメージングのための顕微鏡を開発し、さらに時

間分解能を 1ms まで向上させることで(岡田ら、投稿準備中)、細胞質を自由拡散するタンパク質分子の 1 分子計測まで可能となっている。この手法を ERK に応用することで、ERK の 1 分子計測を実現する。

4. 研究成果

(1) 汎用の共焦点顕微鏡装置を用いて、スキャン速度や画像取得領域、画素数やサイズの調整を行うことで、FCS に匹敵するフォトン数の信号時系列を得ることに成功した。生細胞にこの手法を適用するにあたり、RICS 同様細胞の動きなどによる信号のゆらぎが計測されたが、信号解析技術を適用することでトレンド成分の除去を効果的に行うことが可能となった。これらを組み合わせることで、視覚情報である画像から、拡散係数や濃度などの分子に関する物理パラメータを直接引き出す画像解析技術の新規手法を開発した。この手法と FRAP 計測を統合し、細胞内 ERK 濃度と核移行時系列を計測した。この結果を物理モデルにフィッティングすることで ERK 濃度に依存した移行速度の推定が可能となり、核膜孔が ERK を通過させる酵素反応速度定数の定量が行えるようになった(図 2A)。



(2) 上記手法を用いて EGF 刺激後核質に流入する ERK の輸送速度は 1 [個/核膜孔/sec] 以下で、通常の importin 依存性核輸送より 3 桁以上遅いことが示された。この結果を直接検証するため、ERK の核膜通過ダイナミクスを細胞内 1 分子イメージングにより計測した。その結果、ERK は核膜孔付近に平均 230 ミリ秒滞在することが示され、上記結果と定量的

一致を示し、ERK の核膜孔輸送が律速過程であることが示された(図 2B)。以上を基にアナログ-デジタル変換の基盤となる詳細な輸送動態を明らかにする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 11 件)

毛利 一成、岡田 康志、新規蛍光相関分光法による蛍光分子成熟度とキネシンアイソフォームの分子間相互作用の解明、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)、2018 年 3 月 28-30 日

Kazunari Mouri, Yasushi Okada, Quantitative analysis of nuclear translocation of ERK by using a novel single molecule technique, ASCB | EMBO 2017 meeting, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA), Dec. 2-6

毛利 一成、岡田 康志、ERK 情報処理過程の共焦点局所画像を用いた定量解析、第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学(熊本)、2017 年 9 月 19-21 日

Kazunari Mouri, Yasushi Okada, Quantitative analyses for transport dynamics of ERK using novel single molecule measurements, 理研公開シンポジウム「観る・測る・解く」4 次元細胞計測の現状と未来、理化学研究所(埼玉県・和光市)、2017 年 6 月 28 日

毛利 一成、岡田 康志、ERK 核輸送動態の新規 1 分子計測法による定量解析、第 69 回日本細胞生物学会年会、仙台国際センター(宮城・仙台)、2017 年 6 月 13 日

毛利 一成、岡田 康志、ERK 核輸送の 1 分子計測、理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 IX」、理化学研究所(埼玉・和光)、2017 年 4 月 13-14 日

毛利 一成、岡田 康志、局所顕微鏡画像解析法による ERK シグナル伝達系の律速段階の解明、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市)、2017 年 3 月 28-30 日

Kazunari Mouri, Yasushi Okada, Localized confocal image analyses reveal rate-limiting steps of ERK signal transduction processes, ASCB annual meeting 2016, Moscone Center

(San Francisco, California, USA), Dec. 3-7, 2016

毛利 一成、岡田 康志、共焦点画像解析と1分子計測を用いたERKシグナル伝達系のボトルネックの解明、第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場(茨城・つくば) 2016年11月25-27日

Kazunari Mouri, Yasushi Okada, Unraveling origins of bottleneck effects for ERK signal transduction using confocal image analyses and single molecule imaging, QBiC Symposium, DECODING ORGANISMS, Senri Life Science Center (Suita, Osaka, Japan), Sep. 5-7, 2016

毛利 一成、岡田 康志、細胞内ERKリン酸化と核輸送動態定量のための共焦点画像解析と1分子計測法の開発、第68回細胞生物学会年会・第11回ケミカルバイオロジー学会合同大会、京都テルサ(京都府・京都市) 2016年6月15-17日

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

毛利 一成 (MOURI, Kazunari)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員
研究者番号:00567513