

平成 23 年 5 月 30 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17012014

研究課題名（和文）細胞がん化過程の時空間制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis on the spatio-temporal regulation of cellular oncogenesis

研究代表者

松田 道行 (MICHİYUKI MATSUDA)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：10199812

研究成果の概要（和文）：

癌遺伝子情報伝達系の統合的理解を目指し、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の原理の基づくバイオセンサーの開発とシミュレーションモデルの構築とを行った。上皮細胞増殖因子受容体の制御機構を理解するために、多くの FRET バイオセンサーを開発した。これらのバイオセンサーや生化学的手法を使って、細胞内情報伝達因子の活性制御に関わるパラメータを計測し、実測データに基づくシミュレーションモデルを構築した。

研究成果の概要（英文）：

We aimed at understanding the oncogene signal transduction network. For this purpose, we have developed biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and developed simulation models. These models will be bases of further improved simulation models, which allow us to draw the global picture of oncogene signal transduction network.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	72,492,930	0	72,492,930
2006 年度	62,500,000	0	62,500,000
2007 年度	62,500,000	0	62,500,000
2008 年度	62,500,000	0	62,500,000
2009 年度	62,500,000	0	62,500,000
総計	322,492,930	0	322,492,930

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん、FRET バイオセンサー、蛍光イメージング、システム生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 21 世紀生物学の大きな流れは、生命現象のコンピューター上での再現である。がん研究においては、がん化の過程をコンピューター上で再現するシステムを構築し、これを使うことによって、がん細胞の増殖をもっと効率的に止めうる分子を狙い撃ちにしたピンポイントの創薬や、理論に基づいた個人に至

適なオーダーメイドの治療法の選択し、その効果を予測してから治療を開始することなどが期待されている。

(2) がん化過程のシミュレーションを構築する上での最大の技術的問題点は、細胞内情報伝達系の活性化状態を生きた細胞で解析する手法がなく、各分子がいつどこで活性化され

るのかという時空間パラメータが得られないという点にあった。

2. 研究の目的

- (1) 蛍光蛋白と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を用いた分子プローブ群を開発し、細胞がん化に重要な役割を果たす分子群の活性化状態の画像化を行う。
- (2) 上記データをもとに細胞増殖情報の伝播過程を定量的に解析し、蓄積されたデータをもとに、細胞増殖情報伝達系のインシリコでの再構築を行う。

3. 研究の方法

- (1) 上皮細胞増殖因子 (EGF) 情報伝達系は、がん細胞の増殖制御系の主たるものである。この情報伝達系の主要分子の活性を測定する FRET バイオセンサーを作成し、情報伝達分子活性化状態のイメージングを行う。
- (2) 上皮細胞増殖因子 (EGF) 情報伝達系のシミュレーションモデル構築のために、上記 FRET や、光応答性蛍光タンパク質、あるいは、FKBP 誘導系などを駆使して、細胞内情報伝達因子の活性制御に関わるパラメータを取得する。
- (3) 取得したパラメータをもとにシミュレーションモデルを構築し、実際の挙動との相違点を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) B-Raf タンパク質活性化機構の解明：B-Raf の構造変化を検出できる FRET バイオセンサー Prin-B-Raf を作成し、B-Raf 活性化機構の解析を行った。その結果、B-Raf は c-Raf と異なり、カルシウムにより制御をうけること、それは、B-Raf の特有の N 末端領域が重要な働きをすることを見出した。

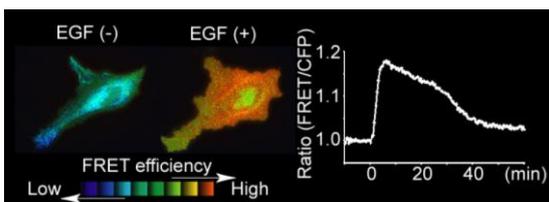


図1 B-Raf 活性化の可視化

- (2) TC10 活性の可視化とその制御機構の解明：EGF 受容体は活性化されると細胞内に取りこまれて不活化されることが知られている。そこで、小胞輸送に関わる TC10 の活性化を FRET バイオセンサーと全反射蛍光顕微鏡とを用いて行なった。その結果、p190RhoGAP が活性化され TC10 が不活化することが小胞の形質膜との融合に必須であることを見出した。
- (3) 実測したパラメータに基づくシミュレーションモデルの構築：FRET バイオセンサ

ーおよび光応答性蛍光タンパク質を用いて、Ras-Raf-MEK-ERK 活性化経路のパラメータを決定しシミュレーションモデルを構築した。これまであまり注目されてこなかった Raf の分子数が、この経路の感度を定める上で重要であることを明らかにした。

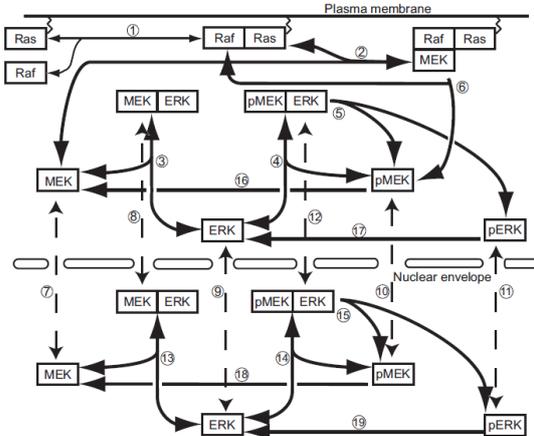


図2 実測データに基づいたシミュレーションモデル

- (4) Raf 活性化に及ぼす Shoc2 スキャッフールド分子の機能解析：c-Raf の機能解析を行う過程で、c-Raf もまたカルシウムによって制御されていることを見出した。これはカルモジュリンが Ras に結合していることが、c-Raf の活性化を防いでおり、細胞内カルシウム濃度の上昇に伴い、カルモジュリンが Ras から解離することが c-Raf の活性化に必要であることを見出した。さらに、このメカニズムには Shoc2 スキャッフールド分子が重要であること、シミュレーションモデルを使った検証により、これは Shoc2 が反応速度を加速する作用によることなどを解明した。

- (5) Rac1/Cdc42 と PI3K とのポジティブフィードバックのシミュレーションモデル構築：神経細胞は、神経細胞増殖因子の刺激により神経突起を伸展するが、EGF の刺激によっては増殖を繰り返す。このメカニズムを探るために、神経突起伸展を誘導する Rac1/Cdc42 の活性制御と PI3K の役割とをシミュレーションモデルを使って解析した。その結果、Turing モデルにより、この制御機構が説明できることが分かった。

- (6) Asef による Rac1 活性化：EGF 刺激により細胞の運動が誘導される機構について FRET バイオセンサーを用いて検討した。EGF 依存性に Asef がリン酸化されて活性化し、これが Rac1 の活性化を引き起こすことが、EGF 依存性の細胞形態変化のメカニズムであるこ

とを明らかにした。

(7) Rab5 活性化機構の解析: EGF 刺激によって EGF 受容体の細胞内への取り込みと分解が起きることが知られている。この過程で Rab5 が重要な働きをすることが知られていたため、Rab5 活性をモニターする FRET バイオセンサーを作成した。さらに、このセンサーを用いて、Rab5 がアポトーシス細胞貪食過程で活性化される機構を明らかにした。

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 3 件) すべて査読有

- ① Kamioka, Y.; Yasuda, S.; Fujita, Y.; Aoki, K.; Matsuda, M., Multiple decisive phosphorylation sites for the negative feedback regulation of SOS1 via ERK, *Journal of Biological Chemistry*, 285(43):33540-8, 2010
 - ② Nishioka, T.; Frohman, M.A.; Matsuda, M.; Kiyokawa, E., Heterogeneity of phosphatidic acid levels and distribution at the plasma membrane in living cells as visualized by a Foerster resonance energy transfer (FRET) biosensor, *Journal of Biological Chemistry*, 285(46):35979-35987, 2010
 - ③ Kumagai, Y.; Kamioka, Y.; Yagi, S.; Matsuda, M.; Kiyokawa, E., A genetically encoded Foerster resonance energy transfer biosensor for two-photon excitation microscopy, *Analytical Chemistry*, 413(2):192-199, 2011
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 熊谷悠香、清川悦子、松田道行、Development of FRET probes for two-photon excitation microscopy、第 62 回日本細胞生物学会大会(大阪)、2010 年 5 月 19 日
 - ② 小松直樹、青木一洋、松田道行、Development of a FRET-based system monitoring Ser/Thr kinase activity in living cells、第 62 回日本細胞生物学会大会、2010 年 5 月 21 日
 - ③ 幸長弘子、平田英周、程久美子、松田道行、Transcriptome Analysis of Glioblastoma Cells Expressing FRET Biosensors for GTPases、第 62 回日本細胞生物学会大会 (大阪)、2010 年 5 月 19 日-5 月 21 日
 - ④ Naoki Komatsu, Kazuhiro Aoki, Michiyuki Matsuda, Development of a

FRET-based system monitoring Ser/Thr kinase activity in living cells、第 62 回日本細胞生物学会大会 (大阪)、2010 年 5 月 21 日

- ⑤ 後藤明弘、中村岳史、星野幹雄、松田道行、PC12D 細胞における、dbcAMP 及び NGF によって誘導される神経突起生成のシグナル伝達経路の FRET を用いた解析 *Neuro 2010* (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会(神戸))、2010 年 9 月 3 日
- ⑥ 国田勝行、青木一洋、松田道行、Identification of molecular network based on FRET imaging and statistical signal processing in randomly migrating HT1080 cells、第 48 回日本生物物理学会年会 (東北大学)、9 月 20 日
- ⑦ 八木俊輔、松田道行、清川悦子、管腔構造形成過程における信号伝達分子の FRET による可視化、第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、2010 年 10 月 22 日
- ⑧ 幸長弘子、平田英周、程久美子、松田道行、Regulation of Transcriptomes by Stochastic Change in Rho-family GTPase Activity グローバル COE 国際シンポジウム / リトリート 2010(淡路)、2010 年 11 月 5 日-11 月 6 日
- ⑨ Naoki Komatsu, Kazuhiro Aoki, Michiyuki Matsuda, Rational design of intramolecular FRET biosensors for monitoring Ser/Thr kinase activity, APRU Research Symposium (京都), 2010 年 11 月 25 日
- ⑩ 西岡照子、Michael A. Frohman、清川悦子、松田道行、Monitoring of phosphatidic acid distribution in the living cells by FRET probes、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)、2010 年 12 月 7-10 日
- ⑪ Kazuhiro Aoki, and Michiyuki Matsuda, Quantitative kinetic analysis revealed processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells、第 33 回日本分子生物学会年会・第 82 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)、2010 年 12 月 7-10 日
- ⑫ 国田勝行、青木一洋、松田道行、FRET イメージングと統計的信号解析に基づく自発的な細胞遊走を制御する分子ネットワークの解析、第 83 回日本生化学会大会 (神戸)、2010 年 12 月 7 日
- ⑬ Hiroko Yukinaga, Eishu Hirata, Kumiko Ui-Tei, Michiyuki Matsuda, Regulation of Transcriptomes by

Stochastic Change in Rho-family GTPase Activity., American society for Cell Biology 50th Annual Meeting, 2010/12/15

- ⑭ 八木俊輔、松田道行、清川悦子、上皮管腔形成における Rac1 活性パターンの可視化と制御、第一回 新学術領域研究「蛍光生体イメージ」Vivid Workshop (蓼科)、2011年3月10日
- ⑮ Hiroko Yukinaga, Eishu Hirata, Kumiko Ui-Tei, Michiyuki Matsuda, Regulation of Transcriptomes by Stochastic Change in Rho-family GTPase Activity., American society for Cell Biology 50th Annual Meeting, 2010/12/15

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fret/project.htm> (研究内容)

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fret/publications.htm> (発表論文)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 道行 (MATSUDA MICHIOYUKI)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：10199812

(2) 研究分担者

中村 岳史 (NAKAMURA TAKESHI)
東京理科大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：60362604
清川 悦子 (ETSUKO KIYOKAWA)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80300929

(3) 連携研究者

なし