

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790273

研究課題名（和文） 生細胞イメージングとシステム生物学によるERKリン酸化過程の統合的理解

研究課題名（英文） Analysis of mechanisms of ERK MAP kinase phosphorylation.

研究代表者

青木 一洋 (AOKI KAZUHIRO)

京都大学・大学院生命科学研究科・講師

研究者番号：80511427

研究成果の概要（和文）：細胞の増殖、分化や癌化に関連する ERK MAP キナーゼのリン酸化様式をイメージング、及びコンピューターシミュレーションにより解析を行った。MEK-ERK 分子の反応に関与する 30 以上の反応速度論のパラメーターを実験により実測し、シミュレーションを行った。その結果、これまで報告されていた「分配的（distributive）リン酸化反応モデル」ではなく「一連（processive）リン酸化反応モデル」に従って ERK 分子が細胞内でリン酸化されていることが予測された。阻害剤などによる実験によるリン酸化反応モデルを検証したところ、processive リン酸化反応モデルを支持する結果が得られた。これらの結果より、哺乳類細胞においては、ERK は MEK 分子により一連リン酸化反応モデルに従ってリン酸化されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：ERK MAP kinase is essential for cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. We analyzed molecular mechanisms of ERK phosphorylation by using imaging and computer simulation. Approximately 30 kinetic parameters were measured by experiments. Based on these empirical parameters, we built a simulation model, and found that ERK was processively, but not distributively, phosphorylated by MEK.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	700,000	450,000	1,150,000
2011年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：FRET・イメージング・シグナル伝達・システム生物学・癌

1. 研究開始当初の背景

ERK MAP キナーゼは細胞の増殖、分化、癌化に深く関与することが知られている。ERK はその上流の MEK 分子によってチロシン残基とスレオニン残基の二つのアミノ酸がリン酸化されて活性化する。これまでに、MEK は ERK 分子の二か所のリン酸化サイトを

別々の反応で触媒する「distributive リン酸化反応（図1）」を起こしていると考えられてきたが、近年、哺乳類細胞や酵母を用いた解析から、この distributive リン酸化反応モデルでは説明がつかないという報告が相次いだ。

2. 研究の目的

哺乳類細胞における ERK 分子のリン酸化モデルを明らかにすることを目的として研究を行った。

Distributive model

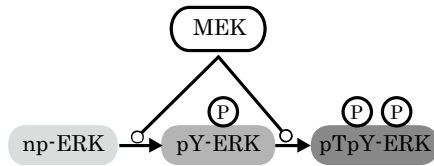


図 1

3. 研究の方法

コンピューターシミュレーションによるリン酸化モデルの予測を行うことが必要と考え、ERK 分子のリン酸化反応に関与する反応パラメーターを全て実験により計測する、という方法を採用した。さらに、ERK 分子のリン酸化アイソフォームを定量するために、phos-tag 化合物を使って分離し定量した。

4. 研究成果

ERK 分子をリン酸化する MEK 分子と ERK 分子の反応に関与する反応の反応速度論的パラメーター（濃度、結合解離速度定数、核内核外移行速度、リン酸化速度、脱リン酸化速度）を全て実験により測定し定量した。これらの反応パラメーターを基に、コンピューターシミュレーションを行った。その結果、これまで報告されてきた distributive リン酸化反応モデルでは細胞内の ERK リン酸化が再現できないことが分かった。そこで、processive リン酸化反応を用いてシミュレーションをしたところ、実験結果とよく一致することを見出した（図 2）。

Processive model

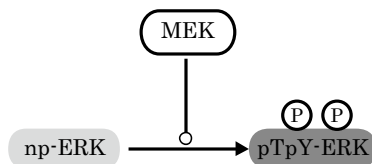


図 2

次に、どちらのリン酸化モデルが妥当かどうかをリン酸化阻害剤等により実験的に検証したところ、我々が予測した processive リン酸化モデルを支持する実験結果が得られた。以上の結果より、ERK 分子は哺乳類細胞内において、Processive にリン酸化される、ということを示した。これらの結果は、MEK の阻害剤が抗がん剤の有効なターゲット

として開発されていることを鑑みると、癌の治療戦略に関与する重要な結果であると言える。

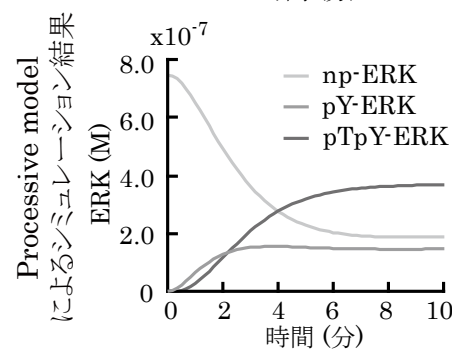
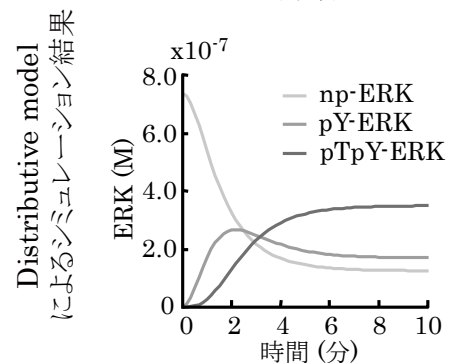
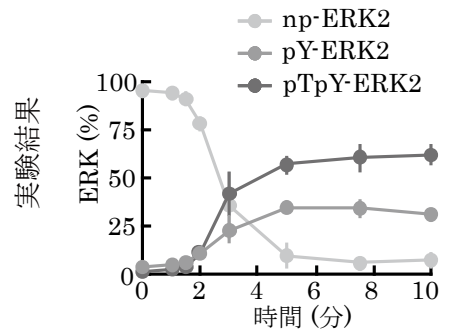


図 3

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）

〔雑誌発表〕（計 7 件）

①Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, Matsuda M. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell.* 2011, 22:4647-56. DOI: 10.1091/mbc.E11-01-0072

②Aoki K, Yamada M, Kunida K, Yasuda S, Matsuda M. Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011, 108: 12675-80. DOI: 10.1073/pnas.1104030108

③Kiyokawa E, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M. Spatiotemporal regulation of small GTPases as revealed by probes based on the principle of Förster Resonance Energy Transfer (FRET): Implications for signaling and pharmacology. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 2011,51:337-58.

DOI:

10.1146/annurev-pharmtox-010510-100234

④Kamioka Y, Yasuda S, Fujita Y, Aoki K, Matsuda M. Multiple decisive phosphorylation sites for the negative feedback regulation of SOS1 via ERK.

J. Biol. Chem. 2010, 285: 33540-33548.

DOI: 10.1074/jbc.M110.135517

⑤Yoshiki S, Udagawa R, Aoki K, Kamioka Y, Kiyokawa E, Matsuda M. Ras and Calcium Signaling Pathways Converge at Raf1 via the Shoc2 Scaffold Protein. **Mol. Biol. Cell**, 2010, 21:1088-96.

DOI: 10.1091/mbc.E09-06-0455

⑥Matsunaga-Udagawa R, Fujita Y, Yoshiki S, Terai K, Kamioka Y, Kiyokawa E, Yugi K, Aoki K, Matsuda M. The Scaffold Protein Shoc2/SUR-8 Accelerates the Interaction of Ras and Raf. **J. Biol. Chem.**, 2010; 285:7818-26.

DOI: 10.1074/jbc.M109.053975

⑦Aoki K, Matsuda M. Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. **Nature Protoc.**, 2009; 4: 1623-31.

DOI: 10.1038/nprot.2009.175

[学会発表] (計 10 件)

①Kazuhiro Aoki, FRET imaging reveals a functional link between cell growth and oscillation frequency of ERK activity. Molecular Imaging and Systems Biology, Tokyo, Japan, Jan 30-31 (口頭発表、招待講演)

②Aoki K, and Matsuda M, FRET imaging revealed a functional link between frequency of ERK oscillation and growth control by cell density.

The 12th International Conference on Systems Biology, Heidelberg/Mannheim, Germany, August 28- September 1, 2011 (ポスター発表)

③Aoki K, Yamada M, Kunida K, and

Matsuda M, Evidence that ERK is processively phosphorylated in mammalian cells.

The 10th International Conference on Systems Biology, Stanford, California, August 30- September 4, 2009 (ポスター発表)

④青木一洋 「分子混み合いの反応速度論的展開と実証」, 『定量生物の会 第四回年会』, 名古屋、2012年1月10日(口頭発表)招待講演

⑤青木一洋, 松田道行, 「FRET イメージングを用いた ERK による細胞増殖制御機構の解析」, 『第 84 回日本生化学会大会』, 東京、2011年9月21日(口頭発表)招待講演

⑥青木一洋, 「実測パラメーターに基づく細胞内シグナル伝達系の定量的シミュレーション」, 『第 6 回トランスポーター研究会』, 宮城県仙台市、2011年6月11日(口頭発表)招待講演

⑦青木一洋, 「がんの制御に向けたシステム的なアプローチ」, 『日本のライフ研究開発を元気にする「夢」と「攻め」ーバイオ研究と計算・情報科学の次世代型融合を探るー公開シンポジウム』, 神戸、2011年1月22日(口頭発表)招待講演

⑧Kazuhiro 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(口頭発表)招待講演

⑨青木一洋 「分子混み合いを加味した反応速度論モデルの構築と実証」, 『定量生物の会 第三回年会』, 東京、2010年11月27-28日(ポスター発表)

⑩青木一洋, 国田勝行, 松田道行, 「細胞内シグナル伝達系のフィードバック制御による細胞の形態形成機構」, 『第 82 回日本生化学会大会』, 神戸、2009年10月24日(口頭発表)

[その他]

ホームページ等

http://researchmap.jp/kazuhiro_aoki/

6. 研究組織
(1) 研究代表者

青木 一洋 (Aoki Kazuhiro)
京都大学・大学院生命科学研究科・講師
研究者番号： 80511427