

生体内における ERK MAP キナーゼ活性の動態と生理的意義

今城 正道^{1,3}, 牟田 優², 松田 道行^{1,2}

1. はじめに

多細胞生物において細胞増殖の適切な制御は個体の発生と維持に不可欠であり、その異常はがんをはじめとするさまざまな病気と関連している。そのため、細胞増殖の制御機構の解明は生物学における中心的な命題の一つとして、精力的に研究されてきた。特に動物組織では、種々の増殖因子によって活性化される ERK MAP キナーゼ経路が細胞増殖の制御に中心的な役割を果たすことが知られている。培養細胞等を用いた研究により、この経路の構成因子や基本的な動作原理については理解が進んできた。その一方で、実際に生きた動物の体内で ERK 経路が「いつ、どこで、どのように」働くのかについては、未解明の部分が多く残されている。最近著者らは、細胞増殖が特に盛んな哺乳類の腸上皮において ERK 活性を可視化することに成功し、その動態の変化が腫瘍細胞に特異的な性質を賦与することを明らかにした¹⁾。本稿では、この研究成果を中心として、最新の生体イメージング技術によって解明された生体内での ERK 活性の動態とその生理的意義を紹介する。

2. 古典的 ERK 活性動態：持続的および一過的活性化と細胞運命の制御

ERK 経路は、種々の増殖因子によって活性化し、細胞運命の制御に重要な役割を果たすシグナル伝達経路である^{2,3)}。細胞表面の受容体に増殖因子が結合すると、低分子量 G タンパク質の Ras を介してセリン／トレオニンキナーゼである Raf が活性化する。活性化した Raf は MEK をリン酸化により活性化し、さらに MEK が ERK をリン酸化することで、ERK 経路が活性化される (図 1)。活性化した ERK は細胞質および核内で多数の基質タンパク質をリン酸化し、それにより適切な細胞応答を誘導する。

この ERK 経路による細胞応答の制御では、ERK 活性の強度に加えて継時的な活性変化、すなわち活性の動態が重要であると考えられてきた。この概念を支持する古典的な例として、増殖因子によるラット PC12 細胞の運命制御があげられる^{4,5)}。この細胞を神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) で刺激すると神経様細胞へと分化するが、一方で上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) で刺激しても分化は誘導されず、細胞増殖が促進される。この PC12 細胞の応答の違いを生むのが、ERK 活性化パターンの時間的な違いである。すなわち、EGF 刺激では ERK は一過的に短時間のみ活性化されるが、NGF 刺激ではより持続的に活性化される。EGF 受容体 (EGF receptor : EGFR) はリガンド結合後速やかにエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リソソームへと運ばれて分解されること、一方で NGF 受容体である tropomyosin receptor kinase A (TrkA) はエンドソームに長時間局在し、持続的に活性化することが、ERK 活性化パターンの違いの一因である。この受容体の動態の差異に加えて、下流で働く低分子量 G タンパク質も、EGFR と TrkA では異なっている。EGFR と TrkA はともに一過的に Ras を活性化するが、一方で TrkA のみが Rap1 の持続的な活性化を誘導する。この持続的な Rap1 の活性化が、ERK 経路の持続的な活性化を仲介する。このように、PC12 細胞では受容体の動態およびその下流で働く G タンパク質の違いにより、ERK 活性化パターンの時間的な違いが生じると考えられる。

では、この ERK 活性化パターンの違いが、どのようにして細胞の振る舞いの違いにつながるのでしょうか？ これを説明するモデルの一つが、ERK による転写プログラ

¹ 京都大学大学院生命科学研究科生体制御学分野 (〒606-8315 京都府京都市左京区吉田近衛町)

² 京都大学大学院医学研究科病態生物医学分野 (〒606-8315 京都府京都市左京区吉田近衛町)

³ 北海道大学化学反応創成研究拠点 (WPI-ICReDD) (〒001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 10 丁目 北海道大学化学反応創成研究拠点 (WPI-ICReDD))

In vivo dynamics of ERK MAP kinase activity and their physiological significance

Masamichi Imajo^{1,3}, Yu Muta² and Michiyuki Matsuda^{1,2} (¹ Laboratory of Bioimaging and Cell Signaling, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8315, Japan, ² Department of Pathology and Biology of Diseases, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8315, Japan, ³ Institute for Chemical Reaction Design and Discovery (WPI-ICReDD), Hokkaido University, Kita 21 Nishi 10, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0021, Japan) 本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910546

© 2019 公益社団法人日本生化学会

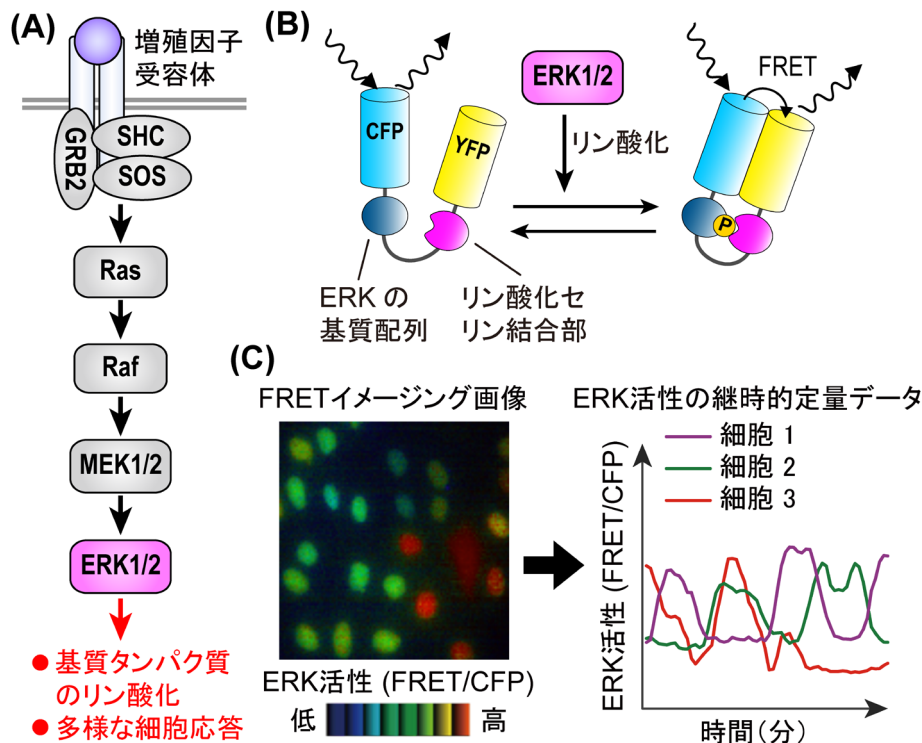


図1 生体イメージングによるERK活性の可視化

(A)増殖因子受容体-ERK経路の概略。(B)FRET型ERKバイオセンサーの構造と作動原理。(C)ERK活性測定の大略。FRETとCFPの蛍光強度比を解析することで、ERK活性を評価する(左)。撮影画像をもとに、各細胞ごとの継続的なERK活性の定量データが得られる。

ムの階層的制御である。たとえば、ERKが活性化すると ternary complex factor (TCF)-serum response factor (SRF) 複合体を介して、早期応答遺伝子 (immediate early gene: IEG) の一つであるc-fosの発現が誘導される。発現したc-fosタンパク質の安定化にはERKによるリン酸化が必要であり、ERKが持続的に活性化した場合のみc-fosタンパク質が蓄積する。さらに、蓄積したc-fosが下流の遺伝子発現を誘導することで、PC12細胞の分化を促進する。このようにERKは、下流の転写プログラムを複数の段階で制御しており、それによりERKの活性化時間の差が遺伝子発現の違いへと反映される。c-fos以外の複数のIEGもERK依存的なリン酸化によって制御されることが報告されており、転写プログラムの階層的制御はERKの活性化時間を特異的な細胞応答に結びつける普遍的機構の一つだと示唆される。

ERK活性化パターンの時間的な違いは、PC12細胞だけでなく他のさまざまな細胞の応答の制御にも重要であると考えられている。たとえば、線維芽細胞では細胞増殖の促進には一過的なERKの活性化では不十分であり、持続的なERKの活性化が必要である。その際、ERKは細胞増殖を促進する遺伝子を誘導するだけでなく、増殖を抑制する遺伝子の発現を継続的に阻害することで、細胞増殖を促進

する⁶⁾。また、T細胞の発生過程ではERKの活性化時間がCD4あるいはCD8陽性細胞への系譜の決定を制御しており⁷⁾、ERK活性の時間的な動態は細胞応答の重要な制御因子であると考えられる。

3. 生体イメージングによる単一細胞レベルでのERK活性動態の解明

上記のようにERK活性の時間的な動態の違いが、異なる細胞応答を誘導しうことは古くから知られていた。そのため、ERK活性を生きた細胞内で継続的に測定する方法の開発が望まれていた。これを可能としたのが、蛍光バイオセンサーを用いた生体イメージング技術の発展である。これまでに、蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer: FRET) 型^{8,9)} および核-細胞質移行型 (kinase translocation reporter: KTR)¹⁰⁾ の2種類の高感度なERKバイオセンサーが開発されており、観察対象や研究目的によって使い分けられている。これらのERKバイオセンサーを用いた生体イメージングにより、単一細胞レベルではERK活性はこれまで考えられていた以上に複雑な動態を示すことが明らかになってきた(図1)。たとえば、一定量の血清を含む古典的な培養環境においても、個々の細胞内ではERK

活性は時折パルス状に上昇したり、またそれが隣の細胞に伝搬したりして、活発に変動する¹¹⁾。このERK活性の伝搬はEGFR阻害剤やメタロプロテアーゼ阻害剤によって抑制されることから、膜結合型として分泌されたEGFRリガンドのシェディングとそれによるEGFRの活性化がERK活性の伝搬を仲介すると考えられる。また、パルス状のERK活性化の頻度が細胞増殖の速度を制御することも報告されている。細胞増殖の制御に加えて、ERKの活性動態は細胞の移動の制御にも関わっている。培養上皮細胞を用いた古典的な創傷治癒実験では、創傷部から遠位部へとパルス状のERK活性の波が伝搬し、このERK活性の伝搬が創傷部方向への細胞移動を駆動することが示されている¹²⁾。このように、パルス状のERKの活性化やその伝搬によって形成される複雑なERK活性の動態が、細胞増殖や移動など、重要な細胞機能を制御することが明らかになってきた。

4. 生体内におけるERK活性の動態と生理的意義

蛍光バイオセンサーを用いたERK活性のイメージングは、生体内におけるERK活性動態の解析にも応用されている。すでにERKバイオセンサーを発現するトランスジェニックマウスが作製されており、その組織を二光子励起顕微鏡で観察することにより、生体内でERK活性の動態を継続的に測定することが可能になっている¹³⁾。それにより、ERK活性が生体内でも複雑に変化し、その動態が生命現象の制御に重要であることが明らかになりつつある。たとえば、培養細胞で観察されるパルス状のERKの活性化とその隣接細胞への伝搬はいくつかのマウス組織でも観察される。表皮では、パルス状のERK活性が時折放射状に伝搬すること、その頻度がG2期からM期への細胞周期の進行に関わることが報告されており、組織内で細胞増殖を同調させる新たな機構だと考えられている¹⁴⁾。また、表皮に創傷が生じた際には、創傷部から遠位部へとパルス状のERK活性が伝搬し、そのことが創傷部への上皮細胞の集団的な移動を制御している¹⁴⁾。一方、胸腺ではERK活性は胸腺細胞の移動を負に制御しており¹⁵⁾、細胞の種類や組織によって細胞移動をさまざまに制御すると考えられる。

5. 腫瘍形成におけるERK活性の動態と病理的意義

多くの細胞種においてERK経路は細胞増殖の促進に必須の役割を果たしており、がん細胞ではRasやRaf、増殖因子受容体の変異や過剰発現によって高頻度にERK経路が活性化していることが知られている。このERK経路の異常な活性化が、がん細胞の活発な増殖能や転移能を支持している。けれども、腫瘍形成の過程でERK活性の動態が実際にはどのように変化し、それが細胞の性質にどのよ

うに影響するのかを解析することは技術的に難しく、これまで未解明であった。最近我々は、FRET型ERKバイオセンサーを用いた生体イメージングにより、細胞増殖が特に活発なマウス腸上皮組織内でERK活性を可視化することに成功し、その動態の変化が腫瘍形成に関わることを明らかにした¹⁾。マウス腸上皮では、ERK活性はパルス状活性と持続的な基底状活性の二つの成分から構成されていた。このうちパルス状の活性は、個々の細胞内での自発的な発火とその隣接した細胞への伝搬によって引き起こされていた。同様のERK活性の動態は、単離・培養した腸上皮オルガノイドでも観察された。ERK活性の伝搬はEGFR阻害剤やメタロプロテアーゼ阻害剤で抑制されたことから、EGFRリガンドのシェディングとそれによる隣接細胞内でのEGFRの活性化がERK活性の伝搬を担うと考えられる。また、個々の細胞内での自発的なERKのパルス状活性もEGFR阻害剤で抑制されたことから、EGFRシグナルは腸上皮におけるERKのパルス状の活性化を担う主要なシグナル伝達経路であると考えられる。一方、ERKの基底状活性はEGFR阻害剤では抑制されず、ErbB2の阻害剤で抑制された。つまり、腸上皮ではERK活性の動態は、EGFRシグナルが誘導するパルス状活性とErbB2シグナルが担う持続的な基底状活性によって規定されることが明らかになった(図2)¹⁾。このEGFRとErbB2のERK活性動態への

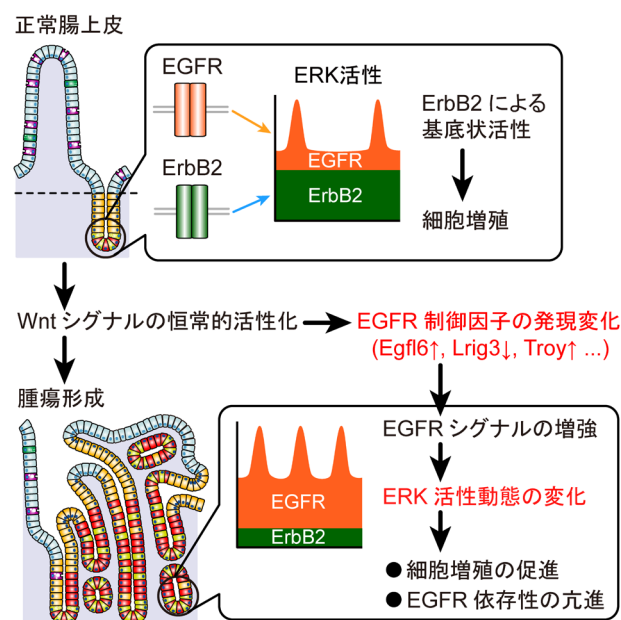


図2 腸上皮におけるERK活性の動態とその腫瘍形成過程における変化

腸上皮では、ERK活性はEGFR依存的なパルス状活性とErbB2依存的な基底状活性から構成される。腫瘍形成過程では、Wntシグナル依存的にEGFR制御因子の発現が変化し、それによってEGFRシグナルが増強される。その結果、ERK活性動態が変化し、細胞増殖の促進やEGFR依存性の亢進の原因となる。

寄与の違いは、これらの受容体の動態の違いに起因すると考えられる。EGFRはリガンド結合後速やかに分解されるが、ErbB2は既知のリガンドを持たず、より持続的なシグナルを伝達することが報告されている。この動態の差が、これらの受容体のERK活性動態への寄与の違いの一因だと考えられる。重要なことに、正常な腸上皮ではEGFRよりもErbB2の阻害によって細胞増殖が強く抑制された。このことは、ErbB2依存的な基底状のERK活性が、腸上皮細胞の増殖に重要であることを示している。

腸上皮では、APCや β -catenin遺伝子の変異によるWnt経路の恒常的活性化が、腫瘍形成を誘導することが知られている。そこで、このWnt経路依存的な腫瘍形成過程で、ERK活性の動態がどのように変化するか解析した。その結果、APC変異マウスの腫瘍細胞内では、パルス状のERK活性の頻度がEGFR依存的に上昇していることを見いだした。それに加えて、腫瘍細胞では基底状ERK活性もEGFRに依存していた。したがって、腸上皮の腫瘍形成過程ではEGFRシグナルが増強され、それによりパルス状のERK活性が増加し、同時に基底状活性もEGFRに依存するようになると考えられる。さらに正常な腸上皮細胞においても、Wnt経路を活性化させるとEGFR依存的に同様のERK活性動態の変化が誘導され、細胞増殖が促進された。以上の結果は、腸上皮の腫瘍形成過程において、Wnt経路の活性化がEGFRシグナルを増強してERK活性の動態を変化させること、それにより細胞のEGFR依存性を高めることを示している (図2)¹⁾。

では、腸上皮においてWnt経路の活性化はどのようにしてEGFRシグナルを増強するのだろうか？ この点について我々は、Wnt経路が複数のEGFR制御因子の発現を制御することを見いだしている。腸上皮においてWnt経路が活性化すると、EGFRシグナルの促進因子であるTroyとEgfl6の発現が上昇し、一方でEGFRシグナルの抑制因子であるLrig3の発現が低下する。また、TroyあるいはEgfl6の発現抑制やLrig3の恒常的な発現は、腫瘍細胞におけるERK活性動態の変化を抑制する。したがって、腸上皮においてWnt経路の活性化はこれらのEGFR制御因子の発現を変化させることでEGFRシグナルを増強し、それによって腫瘍特異的なERK活性の動態が形成され则认为られる (図2)¹⁾。

EGFR-ERK経路の活性化は種々のがんに関連づけられており、この経路の特異的な阻害はがん治療の有望な治療戦略であると考えられてきた。実際に大腸がんの治療でも、EGFR阻害剤が抗がん剤として使用されているが、大腸がん細胞には効果を示す一方で正常な腸上皮には重篤な副作用を示さないことが知られている。Wnt経路の活性化によるEGFR依存性の亢進は、腫瘍細胞特異的なEGFR阻害剤への高い感受性を説明するものである。また、Wnt経

路やEGFRシグナルの活性化、EGFR制御因子の発現変化は他のさまざまながんでも報告されており、今回明らかにした分子機構もそれらのがんで働いている可能性があると考えられる。より一般的には、今回の研究成果は分子活性の絶対的な強度だけでなく、動態の変化が腫瘍細胞の性質や機能の制御に重要であることを示しており、今後がん研究においても生体内における分子活性の可視化技術の重要性が増すことが予想される。

6. おわりに

ERK経路は、細胞外からのさまざまな刺激を組織の状況に応じて多様な細胞応答へと結びつける重要なハブとなるシグナル伝達経路である。その多様な機能を可能としているのが、ERK活性動態の時空間的な制御である。高感度バイオセンサーを用いた生体イメージング技術は、複雑なERK活性の動態を生きた細胞や組織内で解析する唯一のツールである。本稿でも紹介したように、すでに生体イメージングを用いた研究により、細胞の増殖や移動、腫瘍形成などさまざまな現象におけるERK活性の複雑な動態とその生理的・病理的な意義が報告されている。今後、これらの過程においてERK活性の動態がどのように制御され、どのように特異的な細胞応答へと結びつけられるのか解明されることで、多様な生命現象の制御機構について多くの知見が得られると期待される。

文 献

- 1) Muta, Y., Fujita, Y., Sumiyama, K., Sakurai, A., Taketo, M.M., Chiba, T., Seno, H., Aoki, K., Matsuda, M., & Imajo, M. (2018) Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumour-specific traits in the intestine. *Nat. Commun.*, **9**, 2174.
- 2) Nishida, E. & Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 128–131.
- 3) Chang, L. & Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37–40.
- 4) Greene, L.A. & Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2424–2428.
- 5) Huff, K., End, D., & Guroff, G. (1981) Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor. *J. Cell Biol.*, **88**, 189–198.
- 6) Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., & Nishida, E. (2006) Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr. Biol.*, **16**, 1171–1182.
- 7) Germain, R.N. (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 309–322.
- 8) Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., & Matsuda, M. (2011) Development of an opti-

- mized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4647–4656.
- 9) Harvey, C.D., Ehrhardt, A.G., Cellurale, C., Zhong, H., Yasuda, R., Davis, R.J., & Svoboda, K. (2008) A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19264–19269.
 - 10) Regot, S., Hughey, J.J., Bajar, B.T., Carrasco, S., & Covert, M.W. (2014) High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell*, **157**, 1724–1734.
 - 11) Aoki, K., Kumagai, Y., Sakurai, A., Komatsu, N., Fujita, Y., Shionyu, C., & Matsuda, M. (2013) Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Mol. Cell*, **52**, 529–540.
 - 12) Aoki, K., Kondo, Y., Naoki, H., Hiratsuka, T., Itoh, R.E., & Matsuda, M. (2017) Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. *Dev. Cell*, **43**, 305–317.
 - 13) Kamioka, Y., Sumiyama, K., Mizuno, R., Sakai, Y., Hirata, E., Kiyokawa, E., & Matsuda, M. (2012) Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell Struct. Funct.*, **37**, 65–73.
 - 14) Hiratsuka, T., Fujita, Y., Naoki, H., Aoki, K., Kamioka, Y., & Matsuda, M. (2015) Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *eLife*, **4**, e05178.
 - 15) Konishi, Y., Terai, K., Furuta, Y., Kiyonari, H., Abe, T., Ueda, Y., Kinashi, T., Hamazaki, Y., Takaori-Kondo, A., & Matsuda, M. (2018) Live-Cell FRET Imaging Reveals a Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity Dynamics in Thymocyte Motility. *i Science*, **10**, 98–113.

著者寸描

●今城 正道 (いまじょう まさみち)

北海道大学化学反応創成研究拠点特任准教授。博士 (生命科学)。

■略歴 2004年京都大学理学部卒業。04～10年同大学院生命科学研究科シグナル伝達学分野 (西田栄介教授)。10年京都大学博士 (生命科学) を取得。10～12年同研究科博士研究員 (シグナル伝達学分野)。12～19年同研究科生体制御学分野 (松田道行教授) 助教。19年4月より、現職。

■研究テーマと抱負 細胞外からの様々なシグナルがどのようにして細胞内の分子活性の変化につながり、それが幹細胞の機能や組織の恒常性にどのような影響を与えるのか、イメージング等の手法で解き明かしたいと考えている。また、得られた知見をもとに、幹細胞機能を制御する新しい技術の開発につなげていきたい。

■趣味 子供と遊ぶこと、食べ歩き。