

佐甲細胞情報研究室  
Cellular Informatics Laboratory

主任研究員 佐甲 靖志 (理博)  
SAKO, Yasushi (Ph.D)



キーセンテンス：

1. 1分子計測で細胞内情報処理を探る
2. 細胞内情報処理蛋白質の構造ダイナミクスを知る
3. 細胞運命情報処理の分子機構
4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発

キーワード：

生体膜、受容体、1分子生体情報学、細胞内情報伝達、複雑系、細胞増殖・分化、蛋白質ダイナミクス、計算機実験

研究概要

当研究室は、蛋白質分子から分子システム、細胞、細胞間相互作用の各階層で生体システムの示す情報処理機能の性質とその発現機構を明らかにすることを目標としている。特に、生体分子反応を左右する根本原理である熱ゆらぎ、数のゆらぎ、自己組織化、自己集合を計測・解析することにより、環境ノイズと同レベルの低エネルギーで働く生体素子が集積して、内在性あるいは外来性の情報を処理し、柔軟な細胞応答を生み出す仕組みを探っている。さらに、これらの素子がどのように集積して高次機能を発現しているかを明らかにするため、細胞内1分子計測技術を始めとする顕微計測、細胞工学、生体システムの再構成、反応ネットワークの数理解析、計算機実験などの技術を開発・応用している。現在の主要な研究対象は、RTK-Ras-MAPKシステムと呼ばれる、細胞増殖・分化・プログラム細胞死などの細胞運命決定に関わる細胞内反応ネットワークである。我々は、この分子システムで働く個々の蛋白質の分子反応と分子動態を、詳細に1分子解析すると共に、細胞内における分子反応の定量的計測技術と計算生物学を利用して、細胞運命を決定する反応ネットワークの動態がどのように決定されてくるかを解析している。

1. 分子計測で細胞内情報処理を探る (佐甲、佐藤、白、日比野、廣島)

複雑で柔軟な細胞応答や細胞運命は、細胞内分子反応のネットワークによって制御・決定されている。複雑な細胞内反応ネットワークの働きを理解するには、個々の反応素過程を反応場である生きた細胞の中で、定量的に解析すると共に、素反応情報を集積して、計算科学・数理解析を応用した、反応ネットワーク解析を行う必要がある。我々は、RTK-Ras-MAPKシステムと呼ばれる一群の細胞内蛋白質反応ネットワークの動態を、細胞内1分子計測による定量的反応計測と、計算科学によって解析している。RTK-Ras-MAPKシステムは、細胞増殖・細胞分化・プログラム細胞死・癌化など、細胞運命決定に関わる反応ネットワークである。我々は最近、RTK super family に所属する ErbB family の反応ネットワークに関して、細胞外情報の入り口である、細胞外リガンド、膜受容体(ErbB)、ErbB の活性化を認識する細胞質蛋白質の3層の反応ネットワークに注目した研究を行っている。第1層に関しては、細胞増殖と分化をそれぞれ誘導するリガンドである EGF と NRG と、各々の膜受容体(ErbB1 と B3/4)との結合および2量体形成を1分子可視化計測し、モデル解析によって、どちらの場合も反応パラメータの絶対値は異なるものの、ErbB の前2量体形成と、情報分子結合後の動的構造変化が、情報受容の効率と速度を決定していることが分かってきた(図1)。細胞膜内の第2層に関しては、ErbB の動的会合体形成が細胞応答に重要であると示唆されていることから、超解像光学顕微鏡技術を利用した会合体分布計測(図2)と1分子運動計測により、ErbB1 の会合数分布と細胞膜での拡散運動が、コレステロールに富む細胞膜ドメイン構造により制御されていることが明らかになった。現在、計測された会合数分布および1分子運動パラメータに基づいた、数理的な会合体形成モデルを作成中である。第3層の ErbB と細胞質蛋白質の認識反応に関しては、蛍光相関分光法・蛍光相互相関分光法を利用した膜蛋白質と細胞質蛋白質との動態計測法、相互作用計測法を開発・応用して、種々の ErbB 結合蛋白質の動態計測を開始した(図3)。Shc, PI3K などの細胞質蛋白質に関しては、EGF と NDF の情報入力に対する、動態の違いが見えてきており、また、生化学実験で結合が予想されてきた蛋白質間の相互作用が計測されないことや、特定の細胞質蛋白質が分子量から予想される値から大きく逸脱した拡散係数を持つことなど、興味深い現象が観察されてきている。

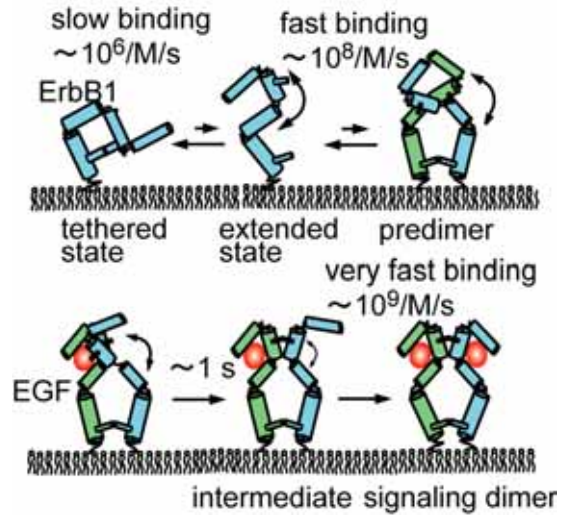
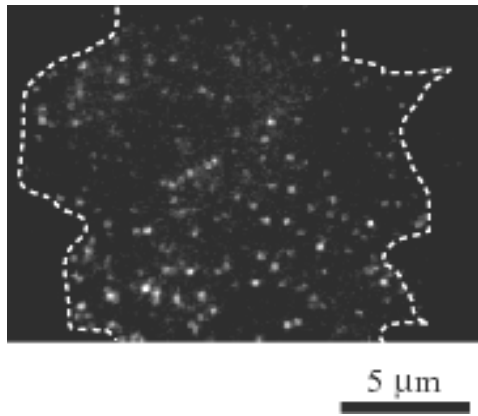


図1 細胞外リガンドと ErbB の結合と 2

左：蛍光標識した EGF, NRG と細胞膜受容体(ErbB1 および B3/4)の結合を 1 分子可視化する。  
 右：ErbB1 と EGF の結合、EGF/ErbB1 複合体の 2 量体形成モデル。ErbB1 の前 2 量体(predimer) 形成と、最初の EGF 結合後の構造変化による intermeidate 形成により、反応速度と感度が決まる。ErbB3/4 も類似の反応スキームで 2 量体形成が起こる。

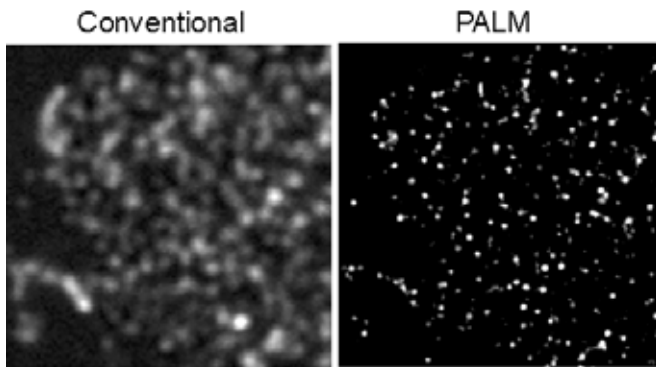
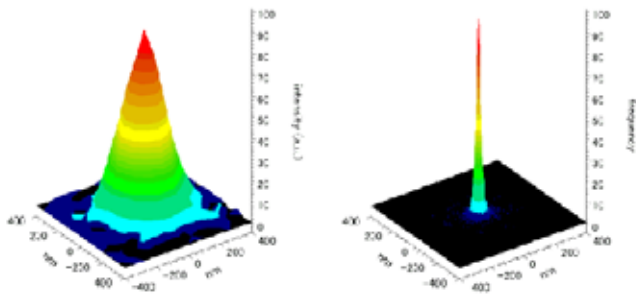


図2 ErbB 会合体の高分解能計測

通常の蛍光顕微鏡による 1 分子画像(左)は分子サイズ(~10nm)にくらべ遙かに大きいぼけ(~300nm)を持っているが、個々の分子画像の中心は分子サイズに迫る精度(~20nm)で決定できる(右)ので、分子の位置に基づいて、擬似的に高分解能画像が作製できる(PALM)。定量的な PALM 手法を開発して、ErbB1 受容体の会合を計測した。



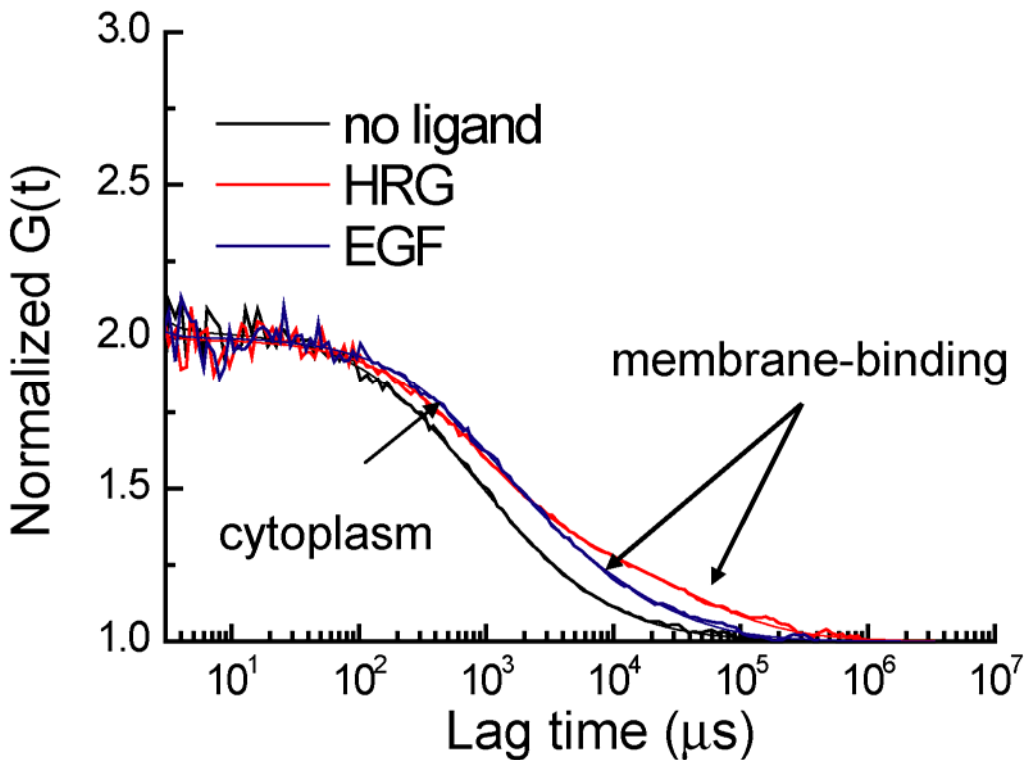


図3 PI3K-GFPのFCS計測

蛍光相関分光法(Fluorescence correlation spectroscopy: FCS)によって、蛍光標識した蛋白質の細胞内動態を計測できる。PI3K-GFPを細胞内で計測すると、細胞への入力がない時(no ligand)では、細胞質内の自由拡散運動だけが見えるが、HRGやEGFによって、細胞膜の受容体に結合して運動する遅い拡散成分が現れる。遅い成分の動態は入力に依存して異なっている。

## 2. 細胞内情報処理蛋白質の構造ダイナミクスを知る (太田、岡本、佐甲、佐藤、日比野)

1分子計測は、蛋白質の複雑な反応・構造ダイナミクスを明らかにしてきた。細胞内情報処理反応の素過程で活躍する蛋白質の反応においても、我々は1分子反応計測によって、反応キネティクスの多状態性や複雑な濃度依存性、反応記憶の存在などを発見している。このように複雑な蛋白質反応の構造的基盤を明らかにするため、細胞内情報処理蛋白質1分子の構造変化や、構造ゆらぎの計測に取り組んでいる。セリン・スレオニンリン酸化酵素であるRAFは、これまでの研究で分子内相互作用により、構造的に閉じた状態と開いた状態の2つを取り得ると考えられていたが、構造変化のタイミングや制御機構は明かでなかった。我々は、GFPとYFPを蛋白質の両末端に融合したRAF分子を細胞内に発現させ、生細胞内の1分子FRET計測により、個々のRAF分子の構造を検出した。閉じた構造では両末端が近づくためFRET効率が高くなり、GFP蛍光が抑制されるが、開状態では抑制が解除される。不活性化状態のRAFは閉構造をとるが、RasGTPとの相互作用により、細胞膜でRAFが開状態に遷移することが分かった。現在細胞質内での1分子FRET計測による構造検出に取り組んでいる。

## 3. 細胞運命情報処理の分子機構 (佐甲、高橋、毛利)

RTK-Ras-MAPKシステムは、細胞増殖・分化など複数の細胞運命決定に関与しているが、同一の分子システムが異なった細胞運命を導く機構は、完全には解明されていない。MAPKの活性化の時間パターンが一過性になるか、持続性になるかが増殖と分化の差異を生むという提案が一応受け入れられているが、MAPKの活性化・不活性化反応のメカニズムや、個々の細胞内でのMAPKダイナミクスと細胞運命の関係は、詳細には調べられていない。MAPKの活性化反応には双安定性の存在が予想されており、持続的活性化の安定な維持に関与している可能性が強い。我々はMAPKおよび、MAPKの活性化・不活性化酵素であるMEK, MKPを大腸菌に発現させた再構成システムを構築し、活性化反応の応答関数を計測することにより、MAPKの反応機構や双安定性の解析を行っている。計測システムの構築が終了し、反応計測とシミュレーションを行っている。また、哺乳類細胞(PC12)の長期培養システムで単一細胞のMAPKダイナミクスと、細胞運命の対応付けを行っている。MAPKの活性

化は、GFP-MAPK の核移行で計測できる。培養条件の制御によって、PC12 が異なった確率で増殖・分化・細胞死の運命を選択することが明らかになった。EGF, NGF などの成長・分化因子は、運命選択の確率を変動させることにより、細胞の挙動を支配している。

#### 4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発 (岡本、佐甲、日比野、廣島、山本)

サブミリ～マイクロ秒領域での1分子ダイナミクス観測のため、高速1分子計測・可視化装置を開発中である。1分子から蛍光発光した光子を実時間で捉え、光子密度変化から分子の状態変化を最尤推定することにより、100 photon (~ 100  $\mu$ s)程度の精度で分子ダイナミクスを計測する方法(time stamp)のプロトタイプが完成し、DNA 標準試料で検証実験を行った。また、1光子検出素子を2次元配列して高速(10 ns)・並列読み出しをおこなう方法(G-APDcamera)の開発を昨年引き続き行っている。(後者は戎崎研、超分子科学研究室、BSI 武藤チームとの共同開発)

1分子内 FRET 可視化によって、生細胞内で蛋白質1分子毎の構造変化を検出する方法を作った。また、定量的な PALM(photoactivation localization microscopy)法を開発し、膜蛋白質の会合数分布の計測に応用した。

#### Key Sentence :

1. Single-molecule analysis of information processing in living cells
2. Single-molecule dynamics of cell signaling proteins
3. Molecular mechanism of cell fate decision
4. New technologies on optical microscopy

#### Key Word :

Biomembrane, Receptors Single-molecule bioinformatics, Cell signaling, Complex systems, Cell proliferation and differentiation, Protein dynamics, Computational biology

#### Outline

The aim of us is to understand principles of signal processing carried out by biological systems in the classes of proteins, protein networks, cells, and cell communities. We are studying how bio-molecules assemble to process the intra- and extra-cellular information and express flexible higher-order cellular responses by developing and applying techniques of single-molecule measurements, optical microscopy, cell engineering, reconstruction of biosignal systems, as well as mathematical analysis and computer simulations of reaction networks. The recent main targets of us are an intracellular protein reaction networks that called RTK-Ras-MAPK systems. These systems are responsible for cell fate decisions including cell proliferation, differentiation, and apoptosis. We are studying functions and dynamics of proteins involved in these systems. We also are analyzing how various dynamics of reaction systems are emerged from the accumulations of elemental protein reactions.

#### 1. Single-molecule analysis of information processing in living cells (Back, Hibino, Hiroshima, Sako, Sato)

Decision making of biological cells is carried out by intracellular reaction network of proteins. To understand this process, quantitative measurements of intracellular reactions followed by theoretical and computational analysis are indispensable. We are analyzing intracellular reaction networks called RTK-Ras-MAPK systems which are responsible for cell fate decision into proliferation, differentiation, apoptosis, and even carcinogenesis. Quantitative single-molecule measurement in living cells in combination with mathematical analysis is our main technology. Recently, we are studying about ErbB-Ras-MAPK system, a member of RTK-Ras-MAPK system. By stimulating this system, EGF induces cell proliferation, but using the same system, HRG induces cell differentiation. The membrane receptor ErbB family consists of four members of which EGF and HRG associate to ErbB1 and B3/4, respectively. We have measured association between EGF and HRG to their receptors that induces dimerization of receptors and found that for both receptor systems, predimerization and allosteric conformational change of receptors regulate dimerization of the ligand/receptor complex which is required for cell signaling (Fig. 1). We have suggested that after the ligand association, dynamic clustering of ErbB's important for signal amplification and propagation. Applying quantitative PALM (photoactivation localization microscopy) that allows super resolution imaging of fluorescent molecules, we analyzed the

cluster size distribution of ErbB1 molecules on the cell surface (Fig. 2). At the same time, we measured lateral diffusion movements of ErbB1 clusters. These measurements provided basic information for the modeling of receptor dynamics which is in progress. We also measured dynamics of various cytoplasmic proteins that recognize activation of ErbB receptors using FCS (fluorescence correlation spectroscopy) and FCCS (fluorescence cross correlation spectroscopy). We have detected the differences in the regulation of protein dynamics after cell stimulation depend on the species of ligands (EGF or HRG) in cases of some cytoplasmic proteins (Fig. 3). By integrating the results of these measurements by aid of computational biology, we expect to understand the mechanism of cell signaling.

Figure 1. Associations between extracellular ligands and ErbB.

Left: Single-molecule imaging of fluorescently labeled EGF or NRG on the surface of a living cell. Right: Associations between EGF and ErbB1 is accelerated by predimerization and allosteric formation of the association intermediate. Associations between HRG and ErbB3/4 take place basically in the same manner.

Figure 2. Super localization imaging of ErbB clusters.

Even though the spatial resolution of single-molecule images in the conventional fluorescence microscopy (left) is less than 250 nm, the center of mass of each image can be determined <20 nm accuracy (right). By determining the location of single-molecules one-by-one, we can construct super resolution images of ErbB clusters on the cell surface.

Figure 3. FCS measurements of PI3K.

FCS is the technique to measure lateral diffusion of fluorescent molecules in living cells. In cells before stimulation (no ligand), PI3K-GFP diffuses rapidly in the cytoplasm. After stimulation of cells with EGF or HRG, a slow diffusion component representing the movements of PI3K complexed with ErbB's has been observed. The diffusion coefficients and percent fractions of the slow diffusion component were different for EGF and HRG.

## 2. Single-molecule dynamics of cell signaling proteins (Hibino, Okamoto, Ota, Sako, Sato)

In single-molecule measurements of the interactions between cell signaling proteins, we have found complex protein reaction properties including multiple states, abnormal concentration dependency, and reaction memory. We are examining structural dynamics of cell signaling proteins in single-molecules to understand structural basis of these complexities in protein reactions. Even though two conformational states, closed and open, has long been proposed for RAF, a threonine/threonine kinase, it has not understood yet when, how, and to what the RAF conformation is regulated in cells. We constructed a FRET probe of RAF in which GFP and YFP were fused to N- and C-terminus of RAF and detect RAF conformation in living cells. The results suggest that RAF takes a closed conformation in quiescent cells but association of RasGTP, the active form of Ras on the plasma membrane, induced opening of RAF conformation. This structural regulation of RAF increased accuracy of Ras/RAF signal transduction.

## 3. Molecular mechanism of cell fate decision (Mouri, Sako, Takahashi)

It is largely unknown how RTK-Ras-MAPK systems can induce different cell fates according to the different inputs and circumstances to cells. MAPK is thought to be a key molecule in cell fate decision, since its activation is temporal or sustained under the conditions that induce cell proliferation or differentiation, respectively. However, precise kinetics of MAPK activation has not been known and single-cell analysis of the MAPK activation has not been done carefully. In the activation of MAPK, presence of a bistability has been suggested in theory. We reconstruct activation and inactivation of MAPK in E. coli cells to investigate the response function of MAPK activation. Reconstitution has been finished and now we are analyzing the response function comparing the experiments and computer simulation. We are also analyzing MAPK activation and cell fate determination in the same single cells. Activity of MAPK can be observed by nuclear transport of GFP-MAPK. A rat cultured cell, PC12, select proliferation, differentiation, and cell death stochastically according to the culture condition. The growth factors, EGF and NGF, regulate by changing the probability of the cell fate selection.

## 4. New technologies on optical microscopy (Hibino, Hiroshima, Okamoto, Sako, Yamamoto)

For the single-molecule detection of molecular dynamics in subms  $\sim$   $\mu$ s of time domain, developments of high-speed single-molecule measurements and imaging are in progress. The prototype of time stamp detection system has been developed to allow determination of molecular states using  $\sim$ 100 photons emitted from a fluorophore during  $\sim$ 100  $\mu$ s. We are also developing a G-APD camera that enables single-photon imaging with 10 ns sampling time (in collaboration with Computational Astrophysics Laboratory, Supramolecular Science Laboratory, and BSI Laboratory of Molecular Biophysics).

Methods to detect conformations of individual protein molecules in living cells using intramolecular single-pair FRET imaging and quantitative PALM (photoactivation localization microscopy) to measure cluster size distributions of membrane proteins have been developed.

***Principal Investigator***

佐甲 靖志      Yasushi Sako

***Research Staff***

岡本 憲二      Kenji Okamoto

佐藤 裕美      Hiromi Sato

白 燦基      Chan-Gi Back

日比野 佳代      Kayo Hibino

廣島 通夫      Michio Hiroshima

毛利 一成      Kazunari Mouri

山本 明弘      Akihiro Yamamoto

***Students***

太田 康友      Kosuke Ota

高橋 正裕      Masahiro Takahashi

***Assistant and Part-timer***

澤井 年子      Toshiko Sawai