

# 佐甲細胞情報研究室

## Cellular Informatics Laboratory

主任研究員 佐 甲 靖 志  
Sako, Yasushi

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的としている。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る。この目的のため、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、細胞内情報伝達機構の研究を行っている。

### 1. 細胞内情報伝達システムの1分子解析

#### (1) 上皮成長因子受容体の動的会合状態 (佐甲, 西田\*1)

多くの細胞膜蛋白質は同種蛋白質間の相互作用を利用して機能する。細胞増殖反応に関わる上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) では、EGF の結合なしに前2量体を形成していること、受容体を多く発現する細胞では、20-30分子ものEGFRが集合体を作っていることが示唆されている。EGFR 会合体の構造と動態、それらが情報伝達反応に果たす役割を解明するため、EGFRの会合数分布と側方拡散運動をEGFR-GFPの1分子可視化法によって計測した。細胞あたり  $10^4$  分子のEGFRを発現するCHO-K1細胞(EGFR-null)で、EGFR-GFPが単量体と2量体を構成単位とする階層構造を持った会合体(単量体から6量体程度まで)を形成していること、会合数分布は細胞骨格系によって制御されているが、会合数と運動の間には相関が無いことが明らかになった。

#### (2) 上皮成長因子受容体の情報伝達2量体の形成 (佐甲, 西田\*1)

EGFRはEGFの結合によって構造変化し、2量体内の相互リン酸化によって活性化する。HeLa細胞において、蛍光標識EGFの1分子可視化により、EGFとEGFRの結合およびEGF,EGFR各2分子からなる情報伝達複合体の形成反応キネティクスを解析した。個々のEGFとEGFRの結合事象に要する時間の分布から、結合過程に新規な中間体があることを明らかにし、また、中間体形成速度定数と、EGFのEGFR前2量体にたいする結合速度定数を決定した。これらの1分子計測値と、細胞当たりのEGF結合速度から、数理モデル解析により、情報伝達2量体の形成反応ネットワークの構造と各反応素過程の速度定数を推定した。得られた結果は、細胞膜に存在する数万分子のEGFRの内、1-2%が特にEGFに対する結合反応速度が大きく、さらに、EGF1分子が結合したEGFR2量体が、よりEGF結合速度の大きい新規中間体へ構造変化することにより、ごく低濃度のEGF存在下でも情報伝達2量体の形成反応を加速し、高感度な細胞応答を実現していることを示した。

#### (3) RasとRafの分子認識反応 (佐甲, 日比野\*2)

EGFを含む多くの細胞外情報分子によって刺激された細胞では、細胞膜裏側に存在する低分子量GTPase Rasが活性型となり、無刺激時には細胞質に浮遊するリン酸酵素Raf分子と結合能を有するようになる。これによるRafの細胞膜への局在変化は、Raf分子の活性化に必須であると考えられている。Rafのサブファミリーであるc-Raf1とGFPの融合分子をHeLa細胞に発現させ、Rasの活性化によって起こるRafの細胞膜結合を1分子計測した。結合時間分布の解析から、細胞膜へ結合したRaf分子は中間状態を経て解離することが明らかになった。RafはRBD, CRDの2つのドメインで活性型Rasと結合すると言われている。RBDドメインだけでは中間状態は見られなかったが、RBD, CRDドメインだけを残して他を切断したRaf分子は中間体を経由して解離した。一方、Raf分子は、分子内結合の有無による閉状態、開状態の2つの構造が存在するとも言われている。Rafは開状態になって初めてRBD, CRDの両方でRasと結合することが可能になる筈である。中間体形成と分子開閉の相関を明らかにするため、反応キネティクス解析をおこなった結果、中間体形成以前の初期結合状態ですでにRBD, CRD両者がRasに結合していることが示唆された。すなわち、活性型Rasは単純なRaf結合部位としてではなく、積極的にRafの構造変化を誘導することによって分子認識を行っており、さらにその後Rafの膜結合状態の変化が起こることが分かった。

### 2. 細胞内反応ゆらぎとその伝搬に関する研究

#### (1) 上皮成長因子受容体とGrb2の認識反応 (佐甲, 太田\*1)

EGFRとアダプター蛋白質Grb2の相互作用の1分子計測をおこなった。細胞をEGFで処理して受容体を活性化した後、細胞膜分画を精製し、ガラス基盤に貼り付け、N末端を蛍光色素Cy3で標識したGrb2(Cy3-Grb2)を加え、同一結合部位への複数回の結合解離反応を1分子観察し反応速度論解析を行った。

解離反応は指数関数の重ね合わせで近似できた。主成分(約95%)は解離速度定数  $8\text{ s}^{-1}$  で、Grb2の濃度に依存しなかった。一方、結合反応はStretched exponentialキネティクスでよく近似できた。これは、解離状態が多数存在してそれぞれが結合状態へ異なった速度を持つ反応経路を持っている可能性や、結合状態へ至る特定の解離状態へ至るまでの多数の解離状態間の遷移が反応速度を決めている可能性を示しているが、反応部位毎の反応速度の解析から、2つの可能性の中間的なものが実際の反応であると結論された。状態遷移は秒オーダーで起こっていると考えられる。結合反応の特性時間はGrb2濃度に反比例せず、濃度が上昇するにつれて反応が起きにくくなっていた。この現象の分子機構は明らかではないが、non-Markovian functionの解析から、反応時系列に非マルコフ性(メモリー)があることが示唆された。したがって、EGFRとGrb2の衝突(結合に至らない部分的相互作用)によってもたらされた分子の構造変化が、遅い緩和過程を持つことにより、結合を起りにくくする影響を与えている可能性がある。このようなEGF受容体とGrb2の認識反応の濃度依存性は、細胞内のGrb2濃度変動による分子認識反応の変動を抑制する効果を持っており、膜蛋白質分子の構造ゆらぎが細胞内情報伝達反応に利用されていることを予想させる。

#### (2) 細胞内反応伝搬の計測系の開発 (佐甲, 日比野\*2)

EGFやNGF(神経成長因子)の情報は、RTK-Ras-MAPKシステムとよばれる細胞内反応ネットワークによって処理される。この反応ネットワークの情報伝搬、ゆらぎの伝搬を計測するためのプローブとして蛍光標識蛋白遺伝子を作成し、安定に発現する細胞株を樹立する必要がある。RTK(EGFRやNGFRのような細胞膜受容体)の活性化は、リン酸化型(活性型)RTKに結合するアダプター分子Shcの細胞質から細胞膜への局在変化、Rasの活性化はRafの細胞質から細胞膜への局在変化、ERK(MAPK)の活性化はERK自身の細胞質から核への局在変化で、それぞれ可視化計測することができる。本年度は、GFP-Shc52, YFP-c-Raf1, GFP-ERK2の遺伝子を作成し、これらを安定に発現するPC12細胞、HeLa細胞のクローンを樹立し、EGF依存的にそれぞれの情報蛋白質の活性化を可視化計測できることを確認した。

### (3) ERK2の活性化ゆらぎ計測法の開発(佐甲, 高橋\*<sup>1</sup>)

活性化したERKは核内に移行し転写因子を活性化するだけでなく、細胞質においても機能を持っているといわれる。ERK2の活性化をより直接的に計測するための分子プローブの開発を行っている。ERKとその活性化を認識するペプチドの融合蛋白質両端に異なる蛍光色素蛋白質を融合し、分子内蛍光共鳴エネルギー移動によって活性化を検出する。本年度は遺伝子設計をおこなった。

## 3. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発

### (1) 光感受性情報伝達分子の開発(佐甲, 太田\*<sup>1</sup>)

細胞内情報伝達反応の時空ダイナミクスを明らかにするには、細胞への情報入力を時空制御する方法の開発が必要である。光化学反応による入力制御は最も簡便で自由度が高い。光感受性のEGF, NGFの合成をおこなった。EGFの特定のアミノ酸残基をケージド化合物で修飾することにより、生理活性を失わせることを検討し、細胞内カルシウム応答を誘起する能力として、1/100以下に活性を落とした分子を作成することができた。NGFについても、特定のアミノ酸残基修飾で、PC12細胞の分化誘導能が抑制されることが明らかになった。

### (2) チップ増強型SNOMの開発(佐甲)

1分子レベルでの細胞機能解析を進展させるには、現在の光学顕微鏡の分解能(~200 nm)は不十分であり、蛋白質分子サイズに迫る分解能(10-30 nm)を実現する必要がある。チップ増強型の走査型近接場顕微鏡(SNOM)は、10 nmレベルの実用的な生体試料観察を実現する有力な候補技術である。大阪大学グループと協力しチップ増強型SNOMによる高分解能蛍光観察の予備実験を行い、近接場効果による蛍光信号増強を確認した。また、装置評価のための、種々の標準試料作成技術、特にDNA上にnmサイズの微小粒子を配列させる技術の開発を行った。

## 4. 細胞情報処理システムの再構成

### (1) ERK活性化反応の大腸菌内再構成(佐甲, 高橋\*<sup>1</sup>)

低濃度あるいは低分子数条件での生体分子反応ゆらぎの解析は、分子の動的構造と機能発現メカニズムを理解する上で重要である。「微小体積を持ち、自発的に様々な濃度条件を超並列化する試験管」として大腸菌内にERKの活性化・不活性化反応を再構成している。ERK2(MAPK)はMEK1(MAPKK)による2重リン酸化で活性化し、MKP1による脱リン酸化で不活性化する。本年度、恒常的活性化型MEK、MKP1(恒に活性化している)、ERK2およびERK2の活性化計測プローブ(2-(3)項参照)の遺伝子作成がほぼ終了した。

---

\*<sup>1</sup> 研修生, \*<sup>2</sup> 協力研究員

The goal of this laboratory is to understand principles of signal processing which carried out by biological systems including proteins, protein networks, cells, and cell communities. Special attention is being paid to the ground rules of bio-molecular reaction, which are thermal fluctuation, number fluctuation, self organization and self assembly, in studies how bio-molecules, using energy as small as environmental noise, assemble and process the inter- and extra-cellular information to express flexible cellular responses. Single-molecule measurements and related optical microscopy, cell engineering, reconstruction of biosignal systems, and mathematical analysis and computer simulations of reaction networks are the main techniques of this laboratory.

### 1. Single-molecule analysis of cell signaling systems

#### (1) Dynamic clustering of epidermal growth factor receptor

Most of the membrane proteins functions via inter-molecular interactions. Epidermal growth factor receptor (EGFR), which is responsible for cell proliferation, forms pre-dimers before association with the ligand EGF. In cells which express many numbers of EGFR molecules, clustering of 20-30 molecules of EGFR has been reported. We carried out single-molecule analysis of the cluster size and movements of EGFR-GFP to reveal dynamic structures and functions of EGFR clusters. In CHO-K1 cell (EGFR null) expressing  $10^4$  molecules/cell of EGFR-GFP, clusters of EGFR-GFP which has the size distribution from monomers to hexamers were observed. Monomers and dimers were the fundamental units of the clusters. Cluster size was regulated by the actin cytoskeletons. And there was no correlation between the cluster size and the movements of EGFRs.

#### (2) Formation of the signaling dimers of epidermal growth factor receptors

Global cellular responses induced by epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR) occur immediately with a less than 1% occupancy among tens thousands of EGFR molecules on single cell surface. Activation of EGFR requires the formation of a signaling dimer of EGFR bound with a single ligand to each molecule. How sufficient numbers of signaling dimer are formed at such small occupancy rate is still not known. We have analyzed the kinetics of EGF-binding and the formation of the signaling dimer using single-molecule imaging and mathematical modeling. A small number of EGFR on the cell surface formed dimeric binding sites which bound with EGF two-orders of magnitude faster than the monomeric binding sites. There was a positive cooperative binding of EGF to the dimeric binding sites through a newly discovered kinetic intermediate. These two mechanisms facilitate the formation of signaling dimers of the EGF/EGFR complexes.

#### (3) Molecular recognitions between Ras and Raf.

When cells are stimulated by various growth factors including EGF, small GTPase Ras is activated in the plasma membrane and recruits Raf, a cytoplasmic serine/threonine kinase, through two Ras binding domains, RBD and CRD. This recruitment is essential for activation of Raf. We have visualized individual GFP-Raf molecules in living cells using TIRF microscopy to investigate the kinetics of Ras and Raf interaction. The results suggest: 1) binding between Ras/Raf involves an intermediate state; 2) formation of the intermediate state requires both RBD and CRD; 3) the transition from only RBD bound to Ras to both RBD and CRD bound to Ras is not rate limiting for the intermediate formation but is used to distinguish active Ras from inactive Ras; and 4) formation of the intermediate state is related to serine/threonine- and tyrosine-phosphorylation of Raf.

### 2. Studies on the propagation of reaction fluctuations in living cells

#### (1) Molecular recognitions between epidermal growth factor receptor and Grb2

Phosphorylation of EGFR upon binding of EGF induces recognition of various intracellular signaling molecules, including Grb2. The reaction kinetics between EGFR and Grb2 was analyzed by visualizing single molecules of Grb2 conjugated to the fluorophore Cy3 (Cy3-Grb2). The dissociation kinetics could be explained using a multiple-exponential function with a major (>90%) dissociation rate of  $8 \text{ s}^{-1}$  and a few minor components suggesting the presence of multiple bound states. In contrast, the association kinetics could be described by a stretched exponential function, suggesting the presence of multiple reaction channels from many unbound substates. Transitions between the unbound substates were also suggested. The rate of association was not proportional to the Grb2 concentration: an increase in Cy3-Grb2 concentration by a factor of ten induced an increase in the association rate only by a factor of approximately three. This effect can compensate fluctuation of the signal transduction from EGFR to Grb2 caused by variations in the expression level of Grb2 in living cells.

#### (2) Development of assay systems of the propagation of reaction fluctuations in living cells

RTK-Ras-MAPK system is processing signals of EGF and nerve growth factor (NGF) through reaction cascade of cell signaling proteins. Measurement systems were developed for probing propagation of reaction fluctuation through RTK-Ras-MAPK system. Activation of RTK, such as EGFR and TrkA (NGF receptor), can be detected by the translocation of Shc to the plasma membrane. Activation of Ras can be detected by the translocation of GFP to the plasma membrane. And the activation of ERK (MAPK) can be detected by the translocation of ERK to the nucleus. Expression vectors of Shc-GFP, YFP-Ras and GFP-ERK were made and stable clones of HeLa and PC12 cells expressing each protein were established. It is confirmed that the activations of RTK, Ras and ERK can be analyzed in these clones.

#### (3) Development of assay systems of the fluctuation of ERK activity

Activated ERK has been reported to have roles in signal transduction in the cytoplasm as well as the activation of transcription factors in the nucleus. A molecular probe to detect activation of ERK directory independent on the translocation is being developed. The probe will detect the changing of fluorescence energy transfer signal between two fluorescent proteins conjugated to the both end of a fusion protein between ERK and its substrate. Design of the probe has been finished and now the gene of the probe is under construction.

### 3. Development of new technologies on optical microscopy

#### (1) Development of photo-sensitive cell signaling molecule

Techniques to allow spatio-temporal regulation of cells signaling inputs are desired to reveal dynamics of cell signal processing. Photo-activation is the most easy and flexible technique to realize spatio-temporal regulation. We are developing photo-sensitive EGF and NGF. Modification of a specific amino acid residue of EGF with a photo-sensitive caged compound reduced activity of EGF to induce intracellular calcium response less than 1/100. Also in NGF, modification of specific amino acid residues suppressed activity of NGF to induce neuron-like differentiation of PC12 cell.

(2) Development of tip-enhanced scanning near-field fluorescence microscope

Spatial resolution of optical microscopes using for single-molecule detection such as total internal reflection fluorescence microscope is not enough to analyze precise cell structure in molecular-level. Tip-enhanced scanning near-field fluorescence microscope is a powerful candidate to realize 10-nm level optical resolution. In collaboration with a research group in Osaka University, we are developing this type of microscope for biological studies. We have confirmed fluorescence signal amplification expected by tip-enhancement and prepared several standard samples including nanometer size particles aligned along DNA fragments.

#### 4. Reconstruction of cell signaling systems

(1) Reconstruction of EKR activation system

Analysis of the fluctuations of biological reactions at very low concentrations or very small number of molecules is important to reveal dynamic molecular structures related to the expression of molecular functions. Reconstruction of protein reaction in E. coli cells can be used to realize an array of very small volume test tubes which autonomously prepare different reaction conditions. We are reconstructing the ERK activation system in E. coli. ERK2 is activated through phosphorylation by MEK1 (MAPKK) and inhibited through dephosphorylation by MKP1. Expression vectors for constitutively active MEK1, MKP1, ERK2 and fluorescence probe for ERK2 activation (see 2-(3)) have been almost finished.

*Staff*

*Head*

Dr. Yasushi SAKO

*Members*

Dr. Kayo HIBINO\*<sup>1</sup>

---

\*<sup>1</sup> Contract Researcher

*Trainees*

Mr. Kosuke Ota (Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Mr. Masahiro TAKAHASHI (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

Mr. Kenji NISHIDA (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)