

# 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。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。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 (廣島<sup>\*1</sup>)

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 集合体の構造と動態、それらが情報伝達反応に果たす役割を解明するための基礎情報として、EGFR の会合数分布と側方拡散運動の1分子計測を行っている。計測系を最適化し、さらに1分子画像に点像分布関数による逆畳込みを行うことにより、分子可視化の空間分解能を180 nm まで向上させ、細胞当たり  $10^5$  分子(従来の2倍の分子密度)の EGFR-GFP を発現する細胞での計測を可能にした。

### (2) 上皮成長因子受容体ファミリーとリガンドの結合反応 (廣島<sup>\*1</sup>)

EGF受容体ファミリーはErbB1-B4の4種の細胞膜受容体で構成されている。この内、ErbB1がいわゆるEGF受容体であり、B3およびB4はneu differentiation factor (NDF)の受容体である。MFC-7細胞に対して、EGFは細胞増殖を誘導しNDFは脂肪細胞への分化を誘導する。このように極めて類似した細胞内反応システムが異なった細胞運命を導く仕組みを明らかにするには、反応ネットワークの定量的解析が必須であり、その第一段階として、ErbB受容体群に対するEGFおよびNDFの結合反応速度解析を行う。蛍光色素TMRで標識したEGFを細胞に与え、斜光照明蛍光顕微鏡でMCF-7細胞のアピカル膜に対するEGFの結合を1分子計測した。細胞当たりのEGF結合数、単量体および2量体としてEGFが結合した結合部位数の時間変化を計測することができた。今後、詳細な反応速度論解析を行う。また、無細胞蛋白質発現系と人工蛍光アミノ酸導入によるNDFの蛍光標識を開始した。

### (3) RasとRafの分子認識反応 (日比野<sup>\*1</sup>)

EGFを含む多くの細胞外情報分子は、細胞膜裏側に存在する低分子量GTPase Rasの活性化を誘導し、Rasは細胞質に浮遊するリン酸酵素Raf分子と結合能を獲得する。Ras/Raf間の相互作用は、多くの発癌に関係するなど重要な細胞内情報伝達反応である。RafはRBD, CRDの2つのRas結合ドメインを持ち、CRDとそれに続くリン酸化酵素ドメインが分子内結合した閉状態と、分子内結合が解離した開状態の2つのコンフォメーションを持つことが示唆されている。我々はRas/Rafの解離反応を細胞内で1分子計測した結果から、RafがRasの活性化状態を見分けるに際し、Rafのコンフォメーションダイナミクスが利用されているという仮説を得た。すなわち、非活性化状態のRasに対して、Rafは閉状態でRBDドメインのみで相互作用するが、結合状態は単寿命(0.3-0.4 s)で指数関数的に解離する。これに対し、活性化状態のRasはRafの開状態から開状態への構造変化を誘発し、RafはRBD, RCD両ドメインでRasに結合する。この初期結合状態は約1秒でなにかしかな中間状態へ移行し、その後解離が起こる。この仮説を検証するためにRafの両末端にGFP, YFPをそれぞれ結合したFRETプローブを作製し、Rafの構造変化を細胞内で1分子計測した。Rasの活性化が起こっていない細胞ではプローブのGFPからYFPへのFRET効率は高く(平均70%程度)、Rasを活性化すると効率はほぼ0%に減少した。このFRET効率の差は、Rasとプローブの結合直後(<0.1 s)から観察された。この結果は活性型Rasへの結合によってRafが開状態から開状態へ変化することによって両末端の距離が増加したものと解釈され、我々の仮説を支持している。FRET効率の変化が結合直後から観察されたことは、1分子解離反応計測で示唆された非活性型と活性型RasへのRafの初期結合状態の違いに対応する。また、リン酸化酵素ドメインを持たず開状態しかとり得ないRBDCRD断片が、活性の有無にかかわらずRasと結合してしまうことから、静止時の細胞におけるRafの構造は閉状態へ大きく偏っているはずであり、細胞質における多分子平均FRET計測の結果もこれを示唆している。従って、Rafの構造変化は活性型のRasによって引き起こされるものと結論される。

## 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<sup>\*2</sup>)

EGFR と、その活性化(チロシンリン酸化)を認識するアダプター蛋白質 Grb2 との相互作用を1分子計測している。EGF処理して受容体を活性化した細胞から細胞膜断片を精製し、ガラス基盤に貼り付け、その外液にN末端を蛍光色素 Cy3 で標識した Grb2 (Cy3-Grb2)を加えて、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う。従来の結果から、解離反応は3成分以上の指数関数の足し合わせで近似でき、結合反応は引き延ばされた指数関数(stretched exponential function)で近似できることが分かっている。これらは、いずれも反応の多成分性を意味している。多成分性の起源を検討するため、EGFR の点変異体の反応計測を行った。EGFR のアミノ酸配列において1068番目と1086番目のチロシンに対するリン酸化が、Grb2 の主要な認識部位を作ると言われている。1068番をフェニルアラニン置換した人工変異体(Y1068F)を発現した細胞から細胞膜断片を精製し、野生型と同様に1分子反応を計測した。Y1068FではGrb2との反応頻度が野生型の60%程度に減少し、pY1068が主要な認識部位を構成していることが実証された。しかし、解離反応キネティクスには明かな変化が見られず、結合状態の多成分性はリン酸化チロシン近傍の局所的な結合部位の違いに依るのではなく、全体的な分子間認識に依ると言える。すなわち、リン酸化チロシンは結合反応速度に影響を与えるが、結合状態の構造は、おそら

く大域的な相互作用インタフェースによって規定されている。異なった結合状態の存在は、相互作用インタフェース形成時の反応経路のゆらぎを示唆している。一方、Y1068F と Grb2 の結合反応キネティクスは、低濃度(1 nM)Grb2 条件(すなわち低反応頻度条件)において複雑性を消失させ、1成分の指数関数で近似できた。10 nM 以上の Grb2 条件では、野生型と同様の多成分性が観察された。結合反応の多成分性が Grb2 濃度に依存することは、EGFR と Grb2 の相互作用によってもたらされた分子構造の変化が遅い緩和過程を持つことにより、緩和の途中で異なった反応速度をもつ多数の構造が準安定に現れることを示唆している。野生型の反応において観察された非マルコフ性(反応記憶)が、1 nM Grb2 条件下の Y1068F では消失していることも、構造緩和過程が反応の複雑性をもたらしていることを示唆している。野生型 EGFR と Grb2 の2次結合反応速度は Grb2 の濃度が上昇するほど低下する、すなわち、Grb2 の濃度変動を補償する性質があることが分かっているが、Y1068F の計測結果は、このような複雑で合目的な反応ダイナミクスが、蛋白質の構造ゆらぎによって実現していることを支持している。

#### (2) 細胞内反応伝搬とそのゆらぎの計測(佐甲, 日比野<sup>\*1</sup>)

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。RTK(EGFRやNGFRなど)の活性化はGrb2やShcの細胞質から細胞膜への局在変化、Rasの活性化はRafやRalGDS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。3者の反応を比較することによって、反応ネットワークの情報とゆらぎの伝搬を研究する。細胞膜を選択的に透過性にしたセミンインタクト細胞を利用したEGF-Ras-MAPKシステムの再構成系において、単位面積当たりのCy3-Grb2あるいはGFP-RalGDSRBDの結合分子数変動から情報伝達反応のゆらぎを計測したところ、平均結合量を1と規格化した、Grb2では0.008、RalGDSでは0.02の反応ゆらぎ(r.m.s.)が観察された。また、後者のゆらぎの時定数がより大きくなっていた。過剰応答性を示す反応カスケードにおいては、Shibata & Fujimotoの解析(PNAS 102:331, 2005)により、カスケード後段においてより大きくゆっくりしたゆらぎが現れることが予想されている。今回の結果は定性的にこれと一致しており、すなわちEGF-Ras-MAPKシステムの過剰応答性において、従来他の経路で示されているようなMAPKカスケードの応答性に加えて、EGF-Rasシステムの寄与が示唆された。一方生細胞における計測では、反応が最大値を迎える時間をEGF濃度の関数として表すと、その細胞間ゆらぎ(SD/average)は、Shc、Rafにおいては0.3 nM、ERKでは3 nMのEGF濃度に最大値を持ち、これらの濃度付近に閾値を持つ過剰応答性の存在が示唆された。これらの濃度値は再構成系における過剰応答性の閾値0.6 nMとほぼ一致する。また、反応経路の上流(Shc)・中流(Raf)と下流(ERK)が異なる閾値を持つことは、上流側の過剰応答性による過剰ノイズを下流に伝えないためには合目的である。生細胞中で反応の持続時間の細胞間ゆらぎは、少なくとも低濃度(<0.03 nM) EGFでは、中流域が下流に比べて大きい。反応持続時間は主として不活性化(この場合GTPase)反応の速度で決定されていると考えられるが、不活性化反応においても上流の反応ゆらぎを容易には下流に伝えられないような反応システムが存在する可能性がある。

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

活性化したERK(MAPK)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。ERK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蛍光色素蛋白質CeruleanとVenus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。融合遺伝子を構築し、哺乳類細胞への発現ベクターにクローニングしてPC12細胞で発現確認を行った。Cerulean, Venus両者の蛍光が細胞質中で観察された。

### 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>\*2</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の合成を進めている。分子の生理活性を評価する方法を種々検討し、GFP-ERK2を安定に発現したPC12細胞において、EGFもしくはNGFによって起こるGFP-ERK2の細胞質から核への局在変化を観察し、細胞の応答率をもって活性を評価する方法が最も安定であることが分かった。この方法で、ケージドEGFの粗製品を評価したところ、非ケージドEGFに比べて1/30~1/100に活性が低下していることが分かった。また、UV照射によるケージド解除で、元の1/10~1/3まで活性が回復した。ケージド化による不活性化、UVによるケージド解除とも実用化にはまだ不十分である。そこで化合物の精製と光解除反応の評価のため、逆相クロマトグラフィーを用いて反応物を分析・精製する方法を確立した。今後、精製された各分画の生理活性評価と光解除条件の検討を行う。NGFに関してケージド化を進めている。

#### (2) チップ増強型SNOM蛍光法の開発(田中<sup>\*1</sup>)

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である。大阪大学グループと協力して、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った。基盤上に単分散した量子ドットを評価試料として、約40 nmの空間分解能で単一の量子ドットの蛍光画像が取得できた。さらなる装置評価のための標準試料として、DNA上に5 nmと8 nmの量子ドットを交互に配列させる技術の開発を行った。

#### (3) パターン投影光学顕微鏡の開発(山本<sup>\*4</sup>)

光による細胞反応制御を可能にするため、任意の空間・時間パターンで細胞に光照射を行うパターン投影光学顕微鏡の開発を開始した。この顕微鏡はマイクロメートルサイズの微小なミラーの2次元配列であるデジタルミラーデバイス(DMD)の縮小像を試料面に投影し、各ミラーの反射率を個別に制御することにより、光学分解能に等しい空間分解能と75 Hzの時間分解能で任意の光照射パターンを作る。照射光学系の設計と、DMDとPCのインタフェースの動作確認が終了した。

#### (4) 細胞内1分子FRET計測法の開発(日比野<sup>\*1</sup>)

単一の分子間、あるいは分子内で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を検出する1分子FRET法は、分子反応や分子構造変化のダイナミクスを検出する優れた方法である。生細胞における1分子FRET計測技術を開発した。生細胞での特異的な蛍光標識には、蛍光蛋白質と目的分子との融合遺伝子を細胞に発現させる方法が有力である。細胞内で最も安定な1分子可視化が可能な蛍光蛋白質の組み合わせであるeGFPとeYFPを1分子FRET計測の蛍光標識とした。多分子計測でよく用いられるCFP/YFP等の組み合わせに比べ、eGFP/eYFPの組は蛍光励起・吸収スペクトルの差がいずれも小さい。両者の励起・発光

を区別するため、光学系の最適化と画像処理法の開発を行い、細胞内 1 分子 FRET 計測を可能にした。開発した方法を応用して Raf1 分子の細胞内構造変化計測を行った(1-(3)項参照)。

#### (5) 低分子量GTPaseの活性化可視化法の開発 (佐甲)

Ras, Rho 等の低分子量 GTPase は、結合している GDP が GTP に交換されることで活性化する。低分子量 GTPase 研究が困難な理由のひとつは、活性化反応そのものを可視化する良い方法が無いことである。我々は GDP/GTP の交換を可視化する方法を開発した。この方法は YFP と融合させた GTPase と、蛍光色素 Bodipy-TR でラベルした GTP (BPTR-GTP)との間で発生する FRET 信号を可視化する。YFP-GTPase と BPTR-GTP の間で GTPase の活性化に依存して FRET が起こることを *in vitro* で示し、さらに YFP-GTPase を発現する細胞に BPTR-GTP を顕微注入し、細胞の活性化による FRET 信号の増加を可視化した。この方法で、細胞 - 基質間接着を制御する Rho および Rac の活性化を計測し、Rac ではなく Rho の活性が接着構造を個別に制御していることを示した。

### 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>\*3</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、ごく少数分子の活性化で起こる細胞機能の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。ERK はMEK による 2 重リン酸化で活性化し、MKPによる脱リン酸化で不活性化する。恒常的活性化型MEK、MKPおよびERKを大腸菌内で発現制御可能なプロモータ下流へクローニングした。また、ERKの活性化反応を解析するための反応シミュレータを構築した。このシミュレータは分子の少数性による反応ゆらぎを取り扱うため、マスター方程式に基づいている。

---

\*1 協力研究員, \*2 研究生, \*3 研修生, \*4 前任技師

The goal of this laboratory is to understand principles of signal processing carried out by biological systems including proteins, protein networks, cells, and cell communities. Special attention is being paid to thermal fluctuation, number fluctuation, self organization and self assembly. This laboratory studies how bio-molecules assemble to process the intra- and extra-cellular information and express flexible higher-order cellular responses. Single-molecule measurements, optical microscopy, cell engineering, reconstruction of biosignal systems, as well as mathematical analysis and computer simulations of reaction networks are the main techniques developed and employed by this laboratory.

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

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

Epidermal growth factor receptor (EGFR), which is responsible for cell proliferation, forms dimers even absence of the ligand EGF and in some cells, clustering of 20-30 molecules of EGFR has been reported. We analyzed dynamics and functions of EGFR clusters using single-molecule imaging. Optimizing parameters of single-molecule microscopy and applying digital deconvolution by the point spread function, we improved spatial resolution to allow single-molecule imaging in cells expressing  $10^5$  molecules of EGFR-GFP per cell.

### (2) Association between EGF receptor families and their ligands

The family of EGFR consists of four members (ErbB1-4). ErbB1 is the receptor for EGF and ErbB3 and 4 are the receptors for neu differentiation factor (NDF). In MFC-7 cell, EGF and NDF induce proliferation and differentiation to adipocyte, respectively. Toward understanding how these two (EGF and NDF) ligands induce completely different cell fates using almost similar protein networks, we started quantitative analysis of the reaction networks. As the first step, we measured association between EGF and EGFR. Using single-molecule imaging, we measured timecourse of EGF association in total number of molecule as well as the numbers of monomeric and dimeric binding sites. Precise kinetic analysis is on going. We also started fluorescence labeling of NDF.

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

Activation of small GTPase Ras under the plasma membrane to recruit Raf, a cytoplasmic serine/threonine kinase. Raf has two Ras binding domains, RBD and CRD, and is thought to have two conformations, closed and open. Single-molecule kinetic analysis of dissociation between Ras and Raf1 suggested that Raf interacts with inactive Ras using only RBD domain in the closed conformation, but interacts with activated Ras using both RBD and CRD domain in the open conformation. To confirm this suggestion, we constructed a FRET probe in which, GFP and YFP were conjugated to both ends of Raf, respectively. We have measured single-pair FRET in this probe in living cells. When Ras was inactive, FRET efficiency was high (~70% in average) suggesting closed conformation of Raf. Activation of Ras reduced FRET efficiency to almost 0% suggesting open conformation of Raf. Reduced FRET efficiency was observed immediately ( $<0.1$  s) after the association of Raf to Ras. The conformational change of Raf is not spontaneous but induced by active Ras. Thus, spFRET measurement supported the suggestion from single molecule kinetics.

## 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 EGF binding induces recognition by an intracellular signaling protein, Grb2. Reaction kinetics between EGFR and Grb2 was analyzed. Plasma membrane fraction containing phosphorylated EGFR was prepared from cells and attached on a glass coverslip and association with Grb2 conjugated with the fluorophore Cy3 (Cy3-Grb2) was observed in single molecules. Previous experiments indicated that the dissociation kinetics and association kinetics could be explained using a three-component multiple-exponential function and a stretched exponential function, respectively. These results suggest presence of multiple substates both in dissociation and association. Origin of the multiplicities was analyzed using a point mutant of EGFR in which one of the major association sites of Grb2 (tyrosine 1068) was substituted with phenylalanine (Y1068F). We prepared membrane fraction from cells expressing Y1068F and analyzed single-molecule kinetics with Grb2. Frequency of interaction of Y1068F with Grb2 was reduced to 60% of the wild type EGFR in consistent to the report that Y1068 is one of the major association sites. There was, however, no obvious change in the dissociation kinetics suggesting that the multiplicity in the dissociation was not caused by local variance of the phosphotyrosines but determined by the global interaction between EGFR and Grb2. On the other hand, complexities in the association kinetics between Y1068F and Grb2 disappeared at 1 nM Grb2 and the reaction could be described by single exponential function. Under the Grb2 concentrations 10 nM or more, multiplicity similar to those in wild type was observed. Therefore, it is probable that the complexity in association kinetics is caused by structural hysteresis of EGFR after dissociation of Grb2 and that multiple quasi steady states with different association rate are present during the slow relaxation process. We have observed that the 2nd order association rate between Grb2 and wild type EGFR decrease with increase of Grb2 concentration. This type of concentration dependency can compensate fluctuation of Grb2 concentration. Results of Y1068F support complex and purposive reaction dynamics is realized using structural fluctuations of protein molecules.

### (2) Propagation of reaction fluctuations in living cells

RTK-Ras-MAPK systems are intracellular reaction cascade processing signals of EGF and nerve growth factor (NGF). 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 effector molecules such as Raf and RalGDS to the plasma membrane. And the activation of ERK (MAPK) can be detected by the translocation of ERK to the nucleus. Comparison between these three reactions at different stages of the reaction cascade gives information of signal transduction and propagation of reaction fluctuations. In semi-intact cells, we have measured number fluctuation of Cy3-Grb2 and GFP-RasGDSRBD bound with EGFR and Ras with time, respectively. Normalized number fluctuation and the time constant of the fluctuation was larger for RalGDSRBD compared to those for Grb2. This result suggests ultrasensitivity in EGFR-Ras system in addition to the ultrasensitivity in MAPK cascade which has long been suggested

(Shibata and Fujimoto, PNAS 102:331, 2005). In living cells, cell-to-cell fluctuations in the peak time of reaction showed maximum at 0.3 nM EGF for Shc and Raf and 3 nM EGF for ERK. Presence of maximum suggests the reactions are ultrasensitive. Increase of the threshold (3 nM) for the downstream reaction (ERK) cut off large fluctuations around the threshold input (0.3 nM) to upstream reactions (Shc, Raf). Cell-to-cell fluctuation of the duration of reaction was larger for Shc and Raf compared to that for ERK. The duration should be determined by inactivation process and this result suggests presence of a mechanism to cut off fluctuation of inactivation.

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

A molecular probe to detect activation (phosphorylation) of ERK is being developed. The probe is designed to detect changes of FRET signal between Cerulean and Venus conjugated to the both end of the probe. cDNA of the probe was constructed and expressed in PC12 cells. Fluorescence from both Cerulean and Venus were observed in the cytoplasm.

3. Development of new technologies on optical microscopy

(1) Photo-sensitive cell signaling molecule

We are developing photo-sensitive EGF and NGF. We assayed activity of EGF by imaging translocation of GFP-ERK from the cytoplasm to the nucleus in PC12 cells after stimulation with EGF. A crude fraction of caged EGF showed reduced activity compared to non-label EGF by a factor of 1/30 – 1/100. The activity was recovered to 1/3 – 1/10 of non-label EGF after uncaging by UV irradiation. To improve the performance of caged EGF, we have established the methods to purify caged EGF and analyze uncaging reaction using reversed-phase column chromatography. Caging of NGF is in progress.

(2) Tip-enhanced scanning near-field fluorescence microscope

In collaboration with a research group in Osaka University, we are developing tip-enhanced scanning near-field fluorescence microscope for biological studies. We have succeeded to image single quantum dots with 40-nm spatial resolution. For a standard sample, we developed alternated alignment of 5-nm and 8-nm quantum dots along DNA fragments.

(3) Pattern projection microscope

We started to develop pattern projection microscope (PPM) which allows photo irradiation to microscope specimens with arbitrary spatial and temporal pattern. In PPM, spatio-temporal patterns are made with diffraction-limited spatial resolution and 75-Hz time resolution using digital mirror device (DMD). We determine the design of PPM and checked action of DMD making interface to PC.

(4) Single-pair FRET imaging in living cells

We developed a technique to image FRET between single pairs of fluorophores (spFRET) in living cells. We used eGFP and eYFP as the FRET pair, since these two are most stable fluorescent proteins for single molecule imaging in living cells. We needed to optimize optics and to develop image processing method. Using spFRET imaging in living cells, we measured conformations of Raf1 (see 1-(3)).

(5) A FRET-based detection of activation of small GTPases

We developed a technique to image GDP/GTP exchange on small GTPases in living cells. This method visualizes FRET between small GTPases fused with YFP and a fluorescent GTP analogue Bodipy-TR GTP (BPTR-GTP). BPTR-GTP is microinjected into cells expressing YFP-GTPases. Using this technique, we observed activation of Rho and Rac which regulate cell-substratum adhesion and revealed that Rho but not Rac controls cell adhesion structure individually.

4. Reconstruction of cell signaling systems

(1) Reconstruction of ERK activation system

We are reconstructing reactions for activation and inactivation of ERK in *E. coli*. ERK is activated through phosphorylation by MEK and inhibited through dephosphorylation by MKP. Constitutively active form of MEK, MKP, and ERK were cloned into expression vectors in *E. coli* under promoters which can regulate expression level at will. Reaction simulator was developed to analyze dynamics of ERK activity. This simulator based on master equations of reaction to deal with reaction fluctuation under small numbers of reactants.

*Staff*

*Head*

Dr. Yasushi SAKO

*Members*

Mr. Akihiro YAMAMOTO\*<sup>1</sup>

Dr. Kayo HIBINO\*<sup>2</sup>

Dr. Michio HIROSHIMA\*<sup>2</sup>

Dr. Shin-ichi TANAKA\*<sup>2</sup>

---

\*<sup>1</sup> Senior Technical Scientist, \*<sup>2</sup> Contract Researcher

*Research Fellow*

Mr. Kosuke G. Ota

*Trainee*

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