



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・反応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と応用

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の解明を目標としている。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る。生体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・応用する。さらに1細胞計測により、細胞毎の応答ダイナミクスとゆらぎを計測する。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・プログラム細胞死の反応ネットワークと、PAR システムと呼ばれる細胞極性形成反応ネットワークである。我々は、これらの細胞運命決定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、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. 細胞内情報処理システムの1分子解析 (荒田、梅木、佐甲、佐藤、中村、白、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。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・数理科学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分子計測と計算科学によって解析している。このシステムは、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っている。最近は特に、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が作る3層の反応ネットワーク (Fig. 1) に注目した研究を行っている。

今年度は第2、第3層間で起こる ErbB から細胞質蛋白質 Grb2 への情報伝達反応の詳細な解析を行った。ErbB1(EGFR)は EGF の結合により構造変化して特殊な2量体を形成し、細胞質部位のリン酸化酵素活性を制御して、細胞質末端部位の相互リン酸化を行う。Grb2はこのリン酸化を認識して ErbB に結合する。

我々は生細胞内で GFP 標識された ErbB1 と、HaLo-tag を介して TMR 標識された Grb2 との2色同時1分子観察法を確立し、ErbB1 と Grb2 の相互作用反応を定量した。両分子の共局在時間を個別に測定し解析することによって、EGF 添加後には、単量体から4量体までどの分子数の ErbB1 会合体においても Grb2 との相互作用確率が上昇するが、特に2量体以上

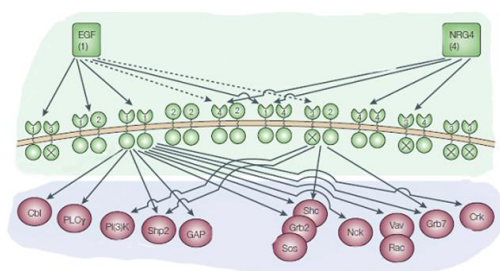


Figure 1. ErbB システムの反応ネットワーク

の会合体では、側方拡散運動の静止時間中に反応がよく起こり、3量体以上ではほとんどの相互作用が静止時間に起こること、さらに、静止中の会合体において、特異的に長時間 (~150 ms) の分子間相互作用が起こることが観測された(Fig. 2)。一方で、単量体にもみられる短時間 (~50 ms) の相互作用は、EGF 添加以前にも観察される遷移的な相互作用と同程度の時定数を持つ反応であることから、静止時の会合体が情報伝達に重要な役割を果たすと推定される。

ErbB1 と Grb2 の相互作用は、細胞膜断片と精製・蛍光標識した Grb2 を用いて、ガラス基板上で計測することもできる。基盤上では ErbB1 分子が固定されているために、単一分子に対する複数回の Grb2 認識反応の時系列を解析することが可能である。我々は、この計測データを北大・小松崎らと協同で multiscale state space network (SSN) という方法で解析した。multiscale SSN では状態を離散化した反応時系列の集団から時定数を系統的に変化させてマルコフ遷移ネットワークを作成し、ネットワークの変化から反応ダイナミクスの時間依存性を読み取る。ErbB1 と Grb2 の反応においては、以前の我々の研究から、多状態性、反応記憶の存在や、分子濃度に依存した2次反応速度定数の変化などが示唆されていた。今回、我々は multiscale SSN が自己相関解析と同等な結果を与えることを示し、ネットワーク構造が時間と共に複雑化していくこと、高頻度結合状態で生じる反応記憶が低頻度状態で失われることを明らかにした(Fig. 3)。この SSN と細胞内で観察された分子間相互作用との関係を知ることが次の課題である。

Grb2 は細胞質で SOS 蛋白質と複合体を形成しており、ErbB1 との相互作用で SOS を細胞膜へ運ぶ。SOS は細胞膜に存在する RAS 蛋白質を活性化する。我々は SOS の細胞内1分子計測で、個々の SOS 分子の膜滞在時間が RAS 分子とのフィードバック回路で制御されていること、単一分子の滞在時間と、細胞膜の SOS 分子密度の持続性の間に相関があることを発見した。さらに RAS とその下流分子との相互作用計測に取り組んでいる。

PAR システムによる細胞極性情報形成の研究では、線虫初期胚中での1分子可視化計測法、FCS 計測法を確立し、1細胞期(受精卵)細胞表層の後半分に PAR-2 蛋白質が集積する分子機構を解析してきた。表層から細胞質への解離反応に加えて、細胞質から細胞表層への PAR-2 の結合反応にも、細胞前後での非対称性があることを新たに発見した。解離反応同様、結合反応の非対称性も aPKC (PKC-3) による PAR-2 のリン酸化に依存している。これを取り込んだ極性形成モデルの作成を開始した。

PAR システムによる細胞極性情報形成の研究では、線虫初期胚中での1分子可視化計測法、FCS 計測法を確立し、1細胞期(受精卵)細胞表層の後半分に PAR-2 蛋白質が集積する分子機構を解析してきた。表層から細胞質への解離反応に加えて、細胞質から細胞表層への PAR-2 の結合反応にも、細胞前後での非対称性があることを新たに発見した。解離反応同様、結合反応の非対称性も aPKC (PKC-3) による PAR-2 のリン酸化に依存している。これを取り込んだ極性形成モデルの作成を開始した。

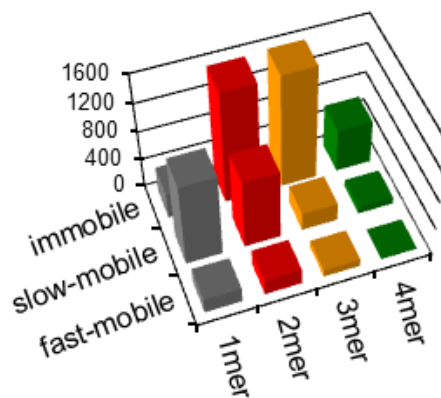


Figure 2. ErbB1 と Grb2 の相互作用時間
細胞膜上の ErbB1 のほとんどは単量体から4量体までの会合体を形成しており、それぞれの会合状態は、いずれも3つの運動状態を持っている。会合・運動状態毎の反応頻度(相対値)を示す。

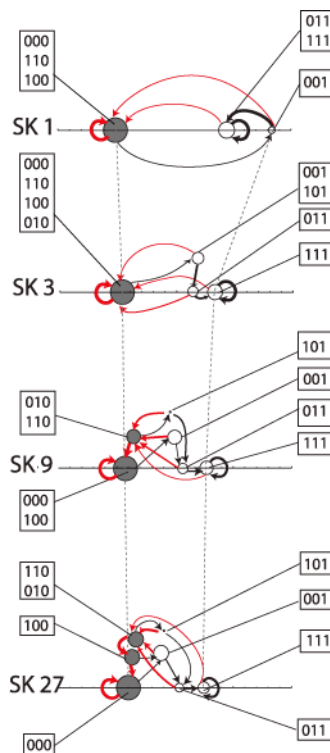


Figure 3. ErbB1 と Grb2 の相互作用反応の SSN

黒丸、白丸はそれぞれ解離および結合状態を示し、丸の大きさは状態の頻度、矢印の太さは状態間遷移の速度を示す。上(SK1)から下(SK27)へ向けて、解析の時定数を 33 ms から 0.9 s へ変化させている。より長い時定数で反応を観測するほど、状態数が増え、反応の複雑性が増すことがわかる。

2. 細胞内情報処理蛋白質の構造ダイナミクス計測 (岡本、佐甲、佐藤、廣島)

1分子計測は、生体高分子の複雑な反応・構造ダイナミクスを計測する有力な方法である。我々は、複雑な蛋白質反応の構造的基盤を明らかにするため、単一分子内蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)を利用して、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。

ErbB1 の分子認識に使われている細胞質末端ドメインは特定の構造を持たない天然変成ドメインであり、リン酸化と分子認識において複雑な構造ダイナミクスが予想される。末端ドメイン約200アミノ酸残基を発現・精製し、Alexa488 と Alexa555 の二種の蛍光色素で標識して1分子内

の単一色素対 FRET 計測を行った。これまでアミノ末端と末端から 65 残基にあるシステインの間で、FRET 効率の異なる複数の構造状態が存在することが我々の研究で示されていたが、さらに 74 残基と 162 残基のシステインの間でも FRET 信号が計測されることが明らかになり、詳細な解析を行っている。

また、蛋白質によっては、適当な部位に蛍光標識を施して色素周辺の環境に依存した発光強度変化から 1 分子構造ダイナミクスを計測することもできる。視細胞の光受容体である膜タンパク質ロドプシンはそのような分子の例である。ロドプシンは光受容後にインバーサゴニストとして結合しているレチナールの構造変化を引き金として一連の中間状態を経由する反応サイクルを持つが、その中でメタ I 中間体とメタ II 中間体は平衡状態にあり、メタ II が活性化状態であるとされてきた。メタ I とメタ II はレチナールの光吸収スペクトルにより区別できる。一方、ロドプシンの細胞質側に存在するシステイン 316 に蛍光標識を行うと、G タンパク質との相互作用に関係した分子構造変化を蛍光強度に基づいて 1 分子計測できる。両者の比較から、我々はメタ I もメタ II も活性型と不活性型の 2 状態平衡にあり、メタ I からメタ II へのレチナールの構造転移により活性型の割合が増加することを示した。すなわちロドプシンにおいては光受容と異性化反応を行うレチナールの構造変化と、分子認識を行うタンパク質部分（オプシン）の構造変化はゆるく共軛していることが実測された(Figure 4)。これは京大・今元らとの共同研究である。

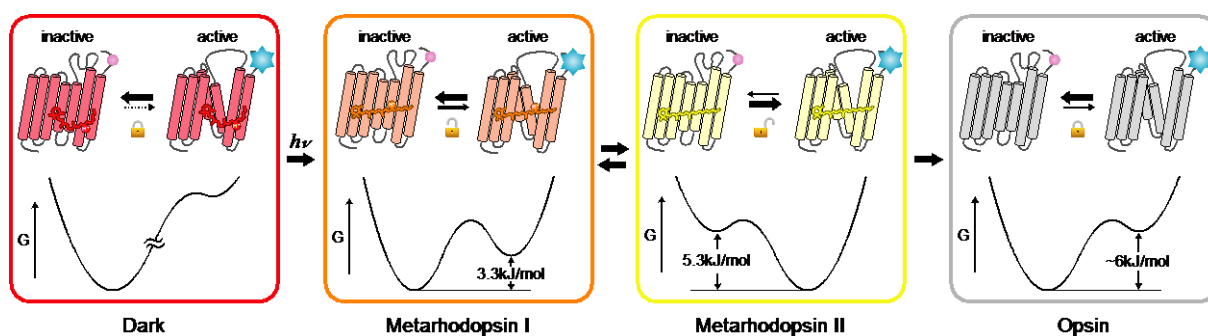


Figure 4. 各状態におけるロドプシン分子の活性・不活性平衡

3. 細胞運命情報処理の分子機構 (佐甲、毛利)

PC12 細胞においては EGF および神経成長因子(NGF)のどちらによっても RAS-MAPK システムが活性化されるが、EGF が細胞増殖を促進するのに対し、NGF は神経様細胞への分化因子であるとされてきた。また、プログラム細胞死の経路においても RAS-MAPK システムの活性化が起こる。実際の細胞運命決定は、いかなる状況下においても見かけ上確率的に選択されるものであり、同一環境下においても個々の細胞の運命は異なっている。また、増殖・分化等の因子が存在しない条件でも、運命選択は自発的に起こる。

細胞運命選択の自発性と応答性の関係を知るため、異なった血清濃度で PC12 細胞を培養し、自発性および EGF, NGF 存在下で、増殖・分化・死の 3 状態にある細胞密度の時間変化を計測した。簡単な増殖・分化・細胞死の確率的運命選択モデルに基づいて、単一細胞の増殖・分化・脱分化・増殖状態からの死・分化状態からの死、それぞれの運命選択速度を推定できる。同時に各状態における細胞密度の比から、運命決定の乱雑性を Shannon entropy として計算する。

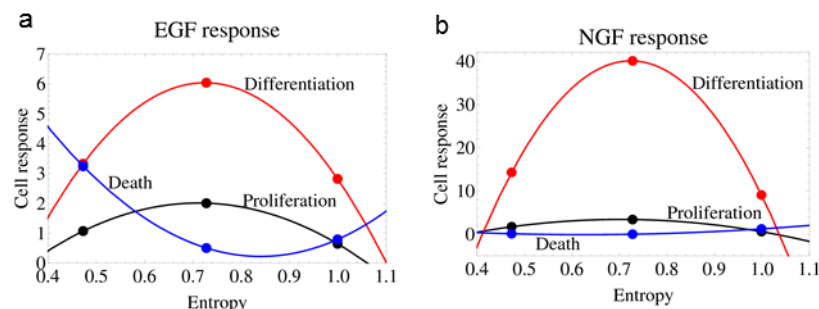


Figure 5. 細胞運命決定の自発性(Entropy)と成長因子 EGF, NGF に対する応答性の関係

同一環境下での乱雑性の違いは、個々の細胞の自発性の差に基づくものと考えられる。培地中の血清濃度と運命選択の乱雑さに関係があり、血清濃度が低下するほど乱雑さが上昇する。EGF, NGF に対する応答性も血清濃度により変動し、増殖因子(EGF)が分化を促進したり、

分化因子(NGF)が増殖を促進したりする条件がある。それぞれの因子に対する応答性（選択速度の上昇）は、適度に乱雑な自発性をもたらす条件で最大値を示すことが分かった（Figure 5）。さらに、細胞密度の空間的ゆらぎを確率的反応モデルで解析することにより、平均密度と密度の分散の間にみられる冪関係が、平均値から推定された状態遷移確率（運命決定速度）で再現された。驚くべきことに、状態遷移確率にゆらぎを導入したモデルは、固定した確率をもつモデルよりも再現性が悪く、同一条件下での細胞間の遷移確率には有為な差が存在しないことが示唆された。

4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発および応用研究（岡本、佐甲、高根沢、白、廣島、盛田、山本、柳川）

上記1－3の研究テーマそれぞれに、光学顕微鏡による新たな計測技術開発が含まれているが、その他に特筆すべきものとして、以下のような技術開発と応用研究を行っている。

(1)高速高感度カメラと蛍光相関分光法(FCS)を利用した細胞質内粒子運動の直接観察。表面不活性な粒子であれば、直径 50 nm 程度でも細胞質内で自由に動き得ることを明らかにした。(2) 単一細胞のラマンスペクトルダイナミクスに基づいて、細胞内部状態の多次元・無染色・連続計測を可能にする方法の開発。増殖因子と分化因子とでは、応答直後の細胞内部状態の変化速度が大きく異なることが明らかになった。(3) 単一リボソーム上における蛋白質合成反応の1分子速度計測法の開発。2種の非天然アミノ酸を蛋白質中に取り込ませて惹起される FRET 信号を計数することにより、合成速度が計測できる。(北大・阿部らとの共同研究)(4) G蛋白質共役型グルタミン酸受容体の高次会合体形成と細胞内ダイナミクスの1分子計測

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 and their applications

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. In these studies, we develop and use techniques of single-molecule measurements, optical microscopy, cell engineering, reconstruction of biosignaling systems, as well as mathematical analysis and computer simulations of the reaction networks. The recent main targets of us are 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 also studying the PAR system which is responsible for the formation of cell polarity in embryogenesis and morphogenesis. We are investigating functions and dynamics of proteins involved in these systems. Also, we are analyzing how various dynamics of reaction systems, which lead to higher-order biological function, emerge from the accumulations of elemental protein reactions.

1. Single-molecule analysis of information processing in living cells (Arata, Back, Hiroshima, Nakamura, Sako, Sato, Umeki)

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. Among various RTK-Ras-MAPK systems, recently, we are focusing on the ErbB-Ras-MAPK

system.

In this year, we concentrated on the signal transduction from the membrane receptor ErbB to a cytoplasmic protein Grb2. Upon association of the ligand EGF, ErbB1 molecules form signaling dimers in which mutual phosphorylations between ErbB1 molecules takes place on their cytoplasmic tail domain. Grb2 recognizes the phosphorylations of ErbB1.

We have measured the interactions between GFP-fused ErbB1 and HaLo-tag-fused Grb2, labelled with TMR, in living CHO cells using a simultaneous dual-color single-molecule imaging technique. ErbB1 formed oligomers monomers to tetramers on the plasma membrane, and we found that after EGF association, the interaction probability increased for every size of ErbB1 oligomers. Although every oligomer showed three kind of motional modes in lateral diffusion, specific for the dimers and larger oligomers, interactions were observed more frequently for the immobile period (Figure 2). Moreover, especially for the immobile oligomers, we found long-lasting (~150 ms) interactions. Since short interactions (~50 ms) were observed even between ErbB1 before EGF stimulation and Grb2, we expect the long interaction is important for signal transduction.

The interaction between ErbB1 and Grb2 can also be studied on a glass substrate using membrane fragments from EGF-stimulated cells and recombinant Grb2 molecules conjugated with a fluorophore. Because ErbB1 molecules are fixed on the substrate, in this system, we can analyze single-molecule trajectories. Collaborating with Komatsuzaki's group at Hokkaido University, we analyzed the data using the multiscale space state network (SSN) analysis. The multiscale SSN describes the networks of Markovian state transition by scanning the time domain for the populations of discretized reaction trajectories. Time dependency of the reaction dynamics is interpreted from the time-dependent changes of the structure of transition networks and parameters. In this reaction, we previously suggested presence of multiple states, reaction memory, and a concentration dependency of the second order reaction rate constant. We indicated the multiscale SSN can reproduce the results of usual autocorrelation analysis, moreover, reveals an increase of the complexity of the network with time (Figure 3). A low frequency reaction state reset the reaction memory possessed by the high frequency reaction states.

Grb2 brings SOS molecules which is a RAS activator to the plasma membrane. In single-molecule imaging of SOS, we noticed the dwell time of single SOS molecules on the plasma membrane was regulated by the feedback loop between SOS and RAS. In addition, the dwell time was correlated with the sustainability of SOS translocation on the membrane. We are also analyzing interactions between RAS and its effector molecules.

Using single-molecule imaging and FCS, we are analyzing mechanism of PAR-2 accumulation at the posterior half of the cortex in nematode zygote. In addition to the dissociation reaction of PAR-2 from the cortex into the cytoplasm, the association reaction from the cytoplasm to the cortex showed reaction rate constant varied along the a-p axis of the embryos. Similar to that in the dissociation reaction, the asymmetry in the association rate constant depended on the phosphorylations of PAR-2 by the aPKC (PKC-3).

Figure 1. Reaction network of ErbB system.

Figure 2. Total interaction periods between EGFR and Grb2 in EGF-stimulated cells.

Interactions were mainly observed in immobile clusters of EGFR. Although significant amount of interactions were observed in slow-mobile monomers and dimers, individual on-times of these interactions were short.

Figure 3. Multiscale space state network for the interactions between ErbB1 and Grb2 in vitro.

Black and white circles represent unbound and bound states, respectively, with the area proportional to the fractions of the states. Thickness of the arrows between the states indicates the state transition rates. Time constant of the analysis was increased from SK1 (33 ms) to SK27 (0.9 s). As the increase of the time constant, complexity of the network increased with increased number of states.

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

We are examining structural dynamics of cell signaling proteins in single-molecules to understand structural basis of the complex protein reactions. To use single-pair

fluorescence resonance energy transfer (spFRET) measurement of single molecules, we developed a time-stamp (TS) detection apparatus and a new method of data analysis depending on a hidden Markov model (HMM) and variational Bayes (VB) inference (TS-HMM-VB).

The cytoplasmic tail of ErbB1 is a molecular recognition domain between ErbB1 and various cytoplasmic proteins. We are studying structural dynamics of this domain in single-molecules combined with TS-HMM-VB. The tail domain is an intrinsically disordered region, which has no rigid conformation and is expected to show complex structural dynamics depending on the phosphorylation states and molecular interactions. We purified recombinant tail domain (about 200 amino-acid residues), labelled it with two different colors of fluorophores, Alexa488 and Alexa555, and measured spFRET signals. Based on the signal distributions, we noticed that the tail domain has several different structures between the amino-terminus and the cysteine at 65 amino-acid residue from the amino-terminus. In addition, we newly detected spFRET signals between the two cysteines at 74 and 162 residues from the amino-terminus. Precise analysis of the dynamics of this newly found FRET signals is now in progress.

Another method for detection of single-molecule structural dynamics is to use changes of fluorescence intensity depending on the microenvironments around the fluorophore. For example, fluorescence labelling of rhodopsin molecule, which is the visual pigment of retinal rod cells, at the cytoplasmic cysteine 316 residue allows detection of activation state. After acceptance of photon, rhodopsin takes several different intermediate states. Among them, meta-II state, which is in equilibrium with meta-I state, is thought to be the active state of rhodopsin interacting with the G-protein. Meta-I and meta-II states are distinguishable from the absorption spectra of retinal binding with rhodopsin. We measured single-molecule dynamics between the active and inactive state from the fluorescence intensity changes of the fluorophore labelling cysteine 316 in comparison with the meta-I/meta-II equilibrium. We found that both meta-I and meta-II states were in equilibrium between the active and inactive states, and in meta-II, the equilibrium was more biased to the active state (Figure 4). Thus, the structural changes of retinal, the inverse agonist of rhodopsin, and opsin, the protein moiety of rhodopsin, were loosely coupled. This work has been done in collaboration with Yasushi Imamoto et al. at Kyoto University.

Figure 4. Active-inactive equilibrium of rhodopsin in different states.

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

Cell fate decision of PC12 into proliferation, differentiation (into nerve like cells), and cell death is thought to be regulated by the dynamics of ERK activation after growth factor stimulations. In the absence of any growth factors, however, cells spontaneously select the three different cell fates. The selection probabilities of these three fates depended on the condition of cell culture, but quantitative measurements of the relationships between heterogeneity and responsiveness to growth factors have not been carried out.

We studied the effects of growth factors (EGF and NGF) under three different serum conditions under which PC12 cell shows different degree of heterogeneity in fate decisions. The heterogeneity in the spontaneous fate decision was defined as the entropy values for a population of cells. The heterogeneity decreased as the concentration of surrounding serum increased. Based on the mathematical model and parameter values, we redefined the effects of growth factors: EGF increased the proliferation rate at the single-cell level, though the effect was unclear and covered by the surrounding serum at the population level as shown in the previous experiments. Under some serum concentrations, EGF (NGF) directed even differentiation (proliferation) at the single-cell level, respectively. Even when the efficient responses to the growth factors were observed at the population level, the growth factors only stochastically control single cells into different cell fates. The strength of responses to EGF and NGF as a function of entropy (cell-fate heterogeneity) has a peak for a moderate entropy value (Figure 5). Thus the reactions in RTK (EGFR and NGFR)-RAS-MAPK systems possibly change their properties according to the environment

that affects the variety of the internal conditions in individual cells, which relates to the spontaneity of cells. Finally, we showed that the relationship between means and variances of the local cell density obeyed a power-law relation, which can be explained by a stochastic simulation that supports cells had a single set of transition rates with constant values at each condition.

Figure 5. Response to growth factors as the functions of heterogeneity.

Ratio of the fate decision rates between in the presence and absence of growth factors are plotted as the functions of entropy values of spontaneous fate selection. Functions show maximal at the moderate entropy value.

4. New technologies on optical microscopy and their applications (Hiroshima, Morita, Okamoto, Sako, Takanezawa, Yamamoto, Yanagawa)

In addition to newly developed technologies used in the above projects, we are developing technologies on optical microscopy and finding applications of them as follows: (1) Direct observation of the movements of nanoparticles in the cytoplasm of living cells. (2) Detection of cellular states based on Raman spectral dynamics: this technology is for non-invasive, non-staining, and multidimensional analysis of temporal series of single-cells. (3) Kinetic measurements of the protein synthesis on single ribosomes in vitro (in collaboration with Hiroshi Abe at Hokkaido University). (4) Single-molecule analysis of higher-order clustering of metabotropic glutamine receptor molecules on the cell surface.

Principal Investigator

佐甲 靖志 Yasushi Sako

Research Staff

荒田 幸信 Arata Yukinobu
梅木 伸久 Nobuhisa Umeki
岡本 憲二 Kenji Okamoto
佐藤 裕美 Hiromi Sato
白 燦基 Chan-Gi Back
廣島 通夫 Michio Hiroshima
毛利 一成 Kazunari Mouri
盛田 伸一 Shinichi Morita
柳川 正隆 Masataka Yanagawa
山本 明弘 Akihiro Yamamoto

Students

高根沢 聡太 Sota Takanezawa
中村 由樹 Yuki Nakamura

Assistant and Part-timer

澤井 年子 Toshiko Sawai