



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生ま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、佐久間、佐藤、中村、白、広島、宮城)

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。

(1) ErbB-RAS-MAPK システムの反応動態

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に注目した研究を行っている (Figure 1)。

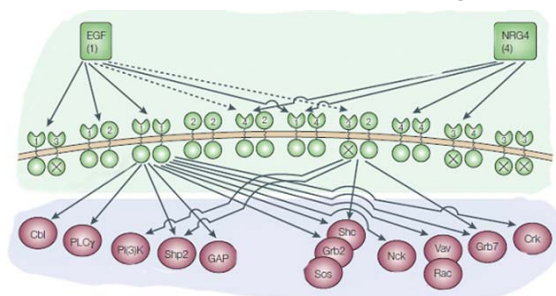


Figure 1. ErbB システムの反応ネットワーク (NatRevMolCellBiol 2:127(2001)より改変)

ErbB は膜1回貫通型蛋白質であるため、細胞内外の情報伝達には、分子複合体の形成が必須である。我々は ErbB 2量体の形成機構や、3, 4量体が主要な情報伝達単位であることを明らかにしてきた。リガンド結合以前は主として単量体、2量体で存在する ErbB が3量体以上の高次複合体を形成するには、細胞膜での動態変化がなければならない。蛍光1分子可視化法で ErbB の運動・会合を詳細に解析し、リガンド添加から15~30秒という短期間に、2量体の一過的な運動

範囲拡大が起こり、その間に高次多量体が形成されることを発見した。リガンド結合による単一分子内の構造変化が ErbB のリン酸化酵素活性を上昇させることが分かっていたが、構造変化は運動状態とも共役し、大域的な膜内分子分布を変化させて、情報伝達ドメイン形成に関与することが示された。(Hiroshim et al. in prep.)

## (2) PAR システムによる細胞極性情報形成

線虫初期胚中での 1 分子可視化計測法、蛍光相関分光(FCS)計測法を確立し、1 細胞期 (受精卵) 細胞表面の後半分に PAR-2 蛋白質が集積する分子機構を解析してきた。PAR2 分子の主要な細胞内ダイナミクス、すなわち細胞表面への結合・解離と細胞膜および細胞質での運動を全て定量的に 1 分子計測し、計測結果のみに基づく数理モデルを構築して極性形成を再現することに成功した。野生型および極性形成異常変異体のモデルの解析から、PAR2 の極性維持は反応システムの双安定性に基づくことが理解された。(Arata et al. submitted; Figure 2)

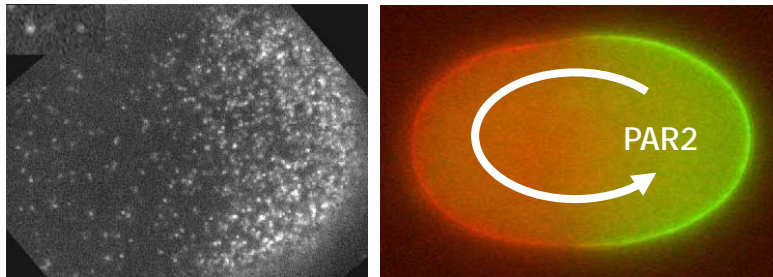


Figure 2 PAR2 の極性形成  
GFP-PAR2 の受精卵内 1 分子可視化 (左) と極性形成(右) 正のフィードバックを持つ反応システムの双安定性により、極性が形成されている。

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

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。

### (1) 細胞内環境を模した 1 分子計測系の開発

計測技術の一端として、細胞膜を模した試験管内環境における蛍光 1 分子計測系の開発に取り組んだ。我々が研究対象とする情報処理蛋白質の多くが細胞膜で機能しており、生体内環境に近い計測条件の確立は重要である。ガラス基盤上に展開した人工脂質 2 重層膜上で、良好な 1 分子観察が可能であること、脂質分子種と計測温度の選択により、人工膜の流動性の有無を制御して 1 分子計測できることが分かった。

### (2) GPCR の 3 次・4 次構造ダイナミクス

1 分子蛍光計測によって、3 量体 G 蛋白質共役型受容体(GPCR)の構造ダイナミクス計測を開始した。GPCR は RTK とならぶ主要な細胞膜情報処理蛋白質群である。最近の GPCR 研究では、ホモあるいはヘテロな多量体形成による情報伝達経路や伝達強度の変動・調節の可能性が示唆されている。

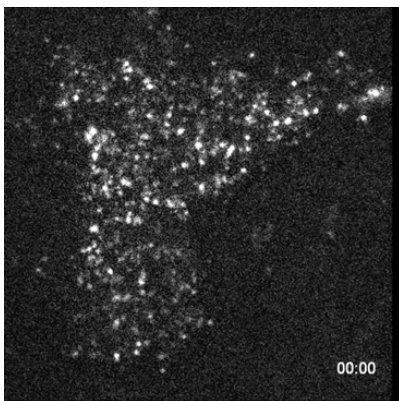


Figure 3. mGluR の細胞内 1 分子可視化

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)とセロトニン受容体(5HT<sub>2</sub>)の間ではヘテロ多量体形成が示唆されているが、実体や役割は不明である。両受容体の種々の細胞内ループに蛍光標識可能なタグ蛋白質を挿入した変異体を作製し(Figure 3)、分子間 FRET 信号を測定した。タグ挿入位置と蛍光標識の選択によって、mGluR のアゴニスト依存的に FRET 強度が変化する標識蛋白質を作製することができたので、今後詳細な構造ダイナミクス計測を行う。

光受容 GPCR であるロドプシンでは、適当な部位に蛍光標識を施して色素周辺的环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ができる。我々は、光反応サイクルの中間体であり、G 蛋白質への情報伝達に重要なメタ I

中間体とメタ II 中間体の構造・機能関連 1 分子計測で明らかにしてきたが、本年はリガンド (レチナール) 非依存的な構成的活性変異体である M257Y の構造ダイナミクスを計測した。M257Y は野生型が活性化しない暗状態においても自発的活性化を示す構造転移が観察された。リガンドを結合しない状態 (opsin) では野生型でも活性型への転移が起こるが、M257Y の opsin は活性型の寿命が長く、蛋白質部分の安定性が自発的活性化と関係することが示された。(Maeda et al. in prep.)

以上の GPCR に関する研究は京大・七田グループとの共同研究である。

### 3. 細胞運命情報処理の分子機構 (佐甲、高根沢、山本)

細胞分化・増殖・死などの運命決定過程において、細胞の内部状態がどのようなダイナミクスを持つかは未解明の問題である。細胞内部状態の遷移は、細胞内の包括的な化学成分の変動によって表すことができると考えられ、我々は、Raman 分光を利用して、多次元・非破壊・無染色の細胞内化学組成変動計測に取り組んでいる。

ヒト上皮癌由来の MCF-7 細胞は ErbB-RAS-MAPK 回路を活性化する heregulin の培地添加によって、乳腺細胞様に分化する。我々はこの分化経路に沿って 12 日間にわたり、細胞質の Raman および自家蛍光からなる誘導発光スペクトル計測を行った。Raman スペクトルの主成分は蛋白質・脂質・水に由来し、それらの成分比が分化過程につれて循環的に変動することが分かった (Figure 4)。自家蛍光にも分化過程によって振動的に変化する成分が存在し、Raman および自家蛍光の主成分を用いて、相空間上に分化の道筋を書くことができる。分化過程は一直線に進行するのではなく、相空間を行きつもどりつしたり、中間段階で細胞毎の状態分布が広がったりすることが明らかになった。(Morita, Takanezawa et al., Biophys J 107:2221, 2014) このような分化ダイナミクスを制御する分子の探索が今後の課題である。

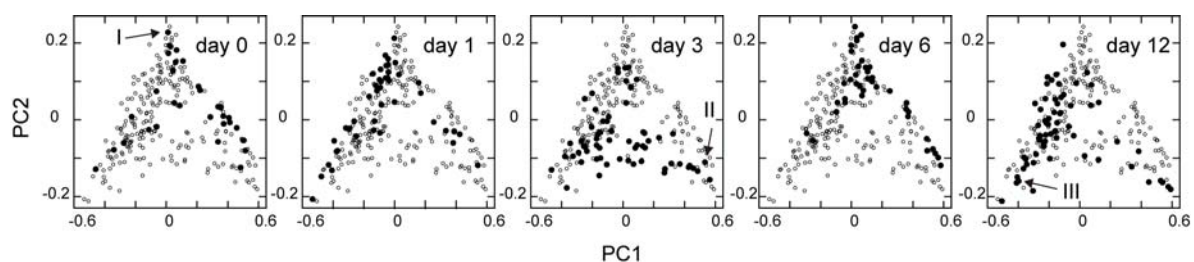


Figure 4. 細胞分化過程における細胞質 Raman スペクトルの変動

黒丸は図に示された計測日、白丸はその他の日の計測結果を示す。主成分空間における一つの丸が単一スペクトル。I, II, III で示された位置は、それぞれ蛋白質、脂質、水に富むスペクトルが占める。

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

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た。

#### (1) FCS を利用した細胞質内超分子複合体「プロテアソーム」の動態計測

細胞内で蛋白質分子の分解を行うプロテアソーム (26S 複合体) は、直径 10 nm、長さ 50 nm にも及ぶ巨大な分子複合体であり、細胞質と核に存在することが分かっていた。細胞質で合成されたプロテアソーム構成蛋白質は、サブユニット単位で核に運ばれると考えられていたが、我々はプロテアソームが完成された状態で核膜を通過して核内へ輸送されることを明らかにした。核膜孔の直径 (10 nm) からするとプロテアソームは相当に大きく、これまではサブユニットに分解したプロテアソームが核膜を通過し、核内で再構成されると考える研究者が多かったが、本研究は従来説を覆すことになった。(都立医学総合研究所・佐伯などとの共同研究。Pack et al. Nat Commn 5:4396, 2014)

#### (2) 転写因子動態の単一細胞計測

NF- $\kappa$ B は、炎症や免疫応答を制御する蛋白質因子であり、細胞質と細胞核を行き来して遺伝子転写を調節する。我々は免疫 B 細胞の細胞応答において、NF- $\kappa$ B の情報伝達が細胞内反応ネットワークの内、IKK と TAK1 が足場タンパク質 CARMA1 の上で形成する情報増幅機構によって、細胞毎に応答するかしないかのデジタル情報に変換されていることを明らかにした。この研究において、斜光照明顕微鏡を用いた、細胞核内の NF- $\kappa$ B 濃度変動の 1 細胞計測技術開発を



行い、CARM1 の機能欠失変異体を発現する細胞では、応答がアナログ的に変化することを実証した。(理研統合生命科学研究センター・岡田らとの共同研究。Shinohara, Hiroshima et al. Science 344:760, 2014)

#### **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 diverse dynamics of reaction systems, which lead to higher-order biological function, emerged from the accumulations of elemental protein reactions.

#### **1. Single-molecule analysis of information processing in living cells** (Arata, Back, Hiroshima, Miyagi, Nakamura, Sako, Sakuma, 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 (Figure 1). Another major target of us is PAR system, which is responsible for cell polarization in various kinds of cells (Figure 2). PAR system regulates morphogenesis in the developmental program.

##### (1) ErbB-Ras-MAPK system

Because ErbB is a single membrane-spanning protein, it requires complex formation to transduce signals across the plasma membrane of cells. As we have previously revealed, tri- and tetramers of ErbB are the major signaling sites on the cell surface. Before cell stimulation with the ligands of ErbB, ErbB molecules mainly present as monomers and dimers on the cell surface. Therefore, molecular dynamics along the cell surface should be altered during the formation of higher-order clusters larger than dimer. Using single molecule imaging of GFP-tagged ErbB1, we analyzed lateral movements of ErbB and found that at the very early stages (15~30 s) of cell stimulation, a subpopulation of ErbB transiently enlarges the areas of molecular movements, and higher-order clusters of ErbB are formed during this period. Structural changes in ErbB molecule, which induce activation (phosphorylation) of ErbB dimers, have been suggested from X-ray crystallography. Our result indicates that the structural changes of ErbB are coupled to the alteration of molecular dynamics to induce a global molecular rearrangement on the cell surface regulating cell signaling. (Hiroshima et al. in prep.)

## (2) PAR system

Using single-molecule imaging and fluorescence correlation spectroscopy (FCS), we are analyzing mechanism of PAR-2 accumulation at the posterior half of the cortex in nematode zygotes. All major intracellular dynamics of PAR2, i.e., association and dissociation of cytoplasmic PAR2 with the cell cortex, and lateral diffusion of PAR2 both in the cytoplasm and on the cortex, were measured quantitatively in living zygotes. Based on the measurement results, we constructed a mathematical reaction network model. The model succeeded to reproduce polarization of PAR2 in model systems. Model analyses suggested that the PAR2 polarization is maintained by a bistable mechanism. (Arata et al, submitted.; Figure 2)

Figure 1. ErbB-RAS-MAPK system (modified from Nat Rev Mol Cell Biol 2:127, 2001)

Figure 2. Asymmetric localization of PAR-2 in nematode zygotes.

(left) Single molecule imaging of PAR-2 conjugated with GFP observed in a living zygote.

(right) Oppositely asymmetric localizations of PAR-2 (green) and PAR-6 (red). PAR-6 is an anteriorly localizing PAR protein. PAR-2 and PAR-6 negatively regulate each other, thus PAR-2 has a positive (double negative) feedback. Polarization of PAR-2 was explained by a bistable mechanism depending on the positive feedback of PAR-2.

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

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

### (1) Single molecule measurement system mimicking intracellular environments

We developed single-molecule measurement systems mimicking biomembranes. Because most of the cell signaling proteins that we are studying recently work on the plasma membrane of cells, this technical development is important for us to understand protein structures and reactions in physiological conditions. We confirmed that single fluorescent molecules are well observed on the aqueous surface of an artificial lipid bilayer expanded along a glass surface. By selecting appropriate lipid species and environmental temperature, we can control the lateral movements of proteins on the lipid surface.

### (2) Protein dynamics of GPCRs

In addition to RTKs, we studied structural dynamics of trimeric G-protein coupled receptors (GPCRs), which is a major super family of cell surface receptors. Recently, many species of GPCRs were reported or expected to form homo- and/or hetero-oligomers to be regulated pathways and strengths of their signal transduction.

For example, hetero-oligomerization has been suggested between two species of GPCRs, metabotropic glutamate receptor (mGluR) and serotonin receptor (5HTR). However, substantial information about structure and function of the hetero-oligomer is still lacking. We constructed protein-tag fused molecules of the receptors at various cytoplasmic loops in their structures, and finally succeeded to detect glutamate dependent changes in the FRET signals between the two receptor species. We are planning detailed analysis of the structural dynamics of the hetero-oligomer using single-molecule imaging. (Figure 3)

In rhodopsin, another type of GPCR, which is the visual pigment of retinal rod cells, fluorescence labeling at the cytoplasmic cysteine 316 residue allows detection of the structural dynamics between inactive and active states. Using this probe, we are studying correlation between structure and function of rhodopsin. This year, we measured dynamics of a constitutively active mutant, M257Y. Spontaneous structural transition was observed in the dark state of M257Y, different from the wild type. In the opsin form, which is free from the intrinsic inverse agonist, retinal, spontaneous transition was observed for both M257Y and wild-type, however, transition to the active form was more frequent in M257Y than in the wild-type. These results suggest that structural instability of the protein part (opsin) of M257Y produces constitutive activity. (Maeda et al. in prep.)

(Works on GPCR are in collaboration with Shichida's group at Kyoto University.)

Figure 3. Single-molecule imaging of mGluR in a living HEK293T cell.

### 3. Molecular mechanism of cell fate decision (Sako, Takanezawa, Yamamoto)

One of the major unsolved problem in modern physical cell biology is how internal state of cells changes along the pathways of cell fate selection into differentiation, proliferation, and death. Dynamics of the internal state is reflected in the changes in the global chemical composition of cells. Thus, we are using Raman microspectroscopy, which allows multi-dimensional, non-invasive, and label-free measurements, to detect changes in the chemical compositions in single living cells.

MCF-7 cells are a human cancer-derived cell line that can be induced to differentiate into mammary-gland-like cells with the addition of a ErbB3/B4 ligand, heregulin (HRG) to the culture medium. We measured the spectra in the cytoplasm of MCF-7 cells during 12 days of HRG stimulation. The Raman scattering spectrum, which was the major component of the signal, changed with time. A multicomponent analysis of the Raman spectrum revealed that the dynamics of the major components of the intracellular molecules, including proteins and lipids, changed cyclically along the differentiation pathway (Figure 4). The background autofluorescence signals of Raman scattering also provided information about the differentiation process. Using the total information from the Raman and autofluorescence spectra, we can visualize the pathway of cell differentiation in the multicomponent phase space. (Morita, Takanezawa et al., *Biophys J* 107:2221, 2014)

Figure 4. Dynamics in the major components of Raman spectra in single cells.

Each single spectrum obtained in the indicated day of differentiation was plotted in two-dimensional space of the principal component (PC) 1 and 2. Solid dots represent the indicated day and open dots represent the other days, for comparison. Spectra at I, II, III were rich in protein, lipid, and water signals, respectively.

### 4. New technologies on optical microscopy and their applications (Pack, Hiroshima, Sako)

In addition to the newly developed technologies used in the above projects, we are developing technologies on optical microscopy and, in this year, found applications of them as follows:

(1) Dynamics of the supra-molecular complex, proteasome, in living cells using fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

The 26S proteasome is a huge protein complex inside cells, which has the diameter of 10 nm and length of 50 nm, functioning to degradate proteins in cells. Complete proteasome particles have been detected in both the cytoplasm and nucleoplasm, however, it was unknown how large proteasome complexes are constructed in the nucleus after syntheses of their components in the cytoplasm. Our FCS measurements indicated that whole complex of proteasome are formed in the cytoplasm and then transported directly into the nucleus through the nuclear pore. It is a surprising result when we consider the diameter of nuclear pore, 10 nm. (Pack et al. *Nat Comm* 5:4396, 2014; This work was in collaboration with Yasushi Saeki at Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science.)

(2) Single-cell imaging of the transcription factor, NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B is a major transcription factor in the stress, inflammation, and immune responses in cells. In single cell levels, NF- $\kappa$ B is activated in a switch-like manner (on or off), however, the molecular mechanism of this switching had not been known. We revealed that a positive feedback from IKK to TAK1 determines the NF- $\kappa$ B response depending on a scaffold protein, CARMA1. Single-cell imaging of the nuclear transport of NF- $\kappa$ B tagged with GFP demonstrated that disruption of the CARMA1 function abolishes the switch-like response. (Shinohara, Hiroshima et al. *Science* 344:760, 2014; This work was in collaboration with Mariko Okada-Hatakeyama's group in RIKEN, IMS.)

### ***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      Paek Chan-Gi  
廣島 通夫      Michio Hiroshima  
前田 亮      Maeda Ryo  
宮城 拓      Hiraku Miyagi  
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***

佐久間 美子      Yoshiko Sakuma  
澤井 年子      Toshiko Sawai  
谷亀 寛子      Hiroko Yagame