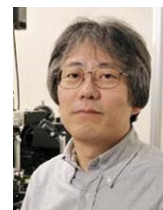


佐甲細胞情報研究室
Cellular Informatics Laboratory

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の仕組みを探る
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. 細胞運命決定のダイナミクスを明らかにする
4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発と応用
5. 脂質の細胞生物学

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、細胞膜、膜脂質

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、ErbB-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、PAR システムと呼ばれる細胞極性形成反応ネットワーク、および情報処理蛋白質 GPCR 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研究している。

1. 細胞内情報処理システムの1分子解析 (阿部、荒田、梅木、佐甲、佐藤、廣島、宮城、吉澤)
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

ErbB-Ras-MAPK システムと呼ばれる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。ErbB family の反応ネットワークにおいては、細胞外リガンドと膜受容体 ErbB の結合から、活性化した低分子量 GTPase RAS と種々のエフェクター分子の相互作用に到る情報伝達・処理反応は細胞膜で起こり、細胞運命決定の重要な初期過程である。ErbB, RAS はいずれも情報処理ネットワークのハブ分子であり、これらの反応を解析することでネットワーク全体の性質が見えてくると期待される。

ErbB1(EGF 受容体)は EGF 等のリガンドの添加によって2量体内の相互リン酸化反応が昂進し活性化される。その後さらに高次会合体を形成することが以前から知られていたが、その意義は明らかでなかった。我々は細胞膜での ErbB1 の運動と会合、ErbB1 と細胞質蛋白質 Grb2 の相互作用を1分子計測し、高次会合体が Grb2 との相互作用に重要なシグナル伝達構造であることを明らかにした(Hiroshima et al. J. Mol. Biol. in press)。ErbB1 分子は1, 2分子毎に細胞膜の微小ドメインに閉じ込められているが、EGF の結合によって2量体の運動範囲が一過的に上昇し、他の ErbB1 分子と会合して高次構造を作る(Fig.1)が、2量体化能やリン酸化能をもた

ない変異体は、高次会合体を形成することができない。また、PHLD1 蛋白質は ErbB1 の情報伝達反応を阻害するが、その分子機構は明らかでなかった。我々は野生型と PHLD1 を強発現した細胞で ErbB1 の会合体形成を 1 分子計測し、PHLD1 が ErbB1 の高次会合を抑制することによって、情報伝達反応を抑制していることを実験と数理モデル解析によって明らかにした (Magi et al. J. Biol. Chem. 293:2206, 2018)

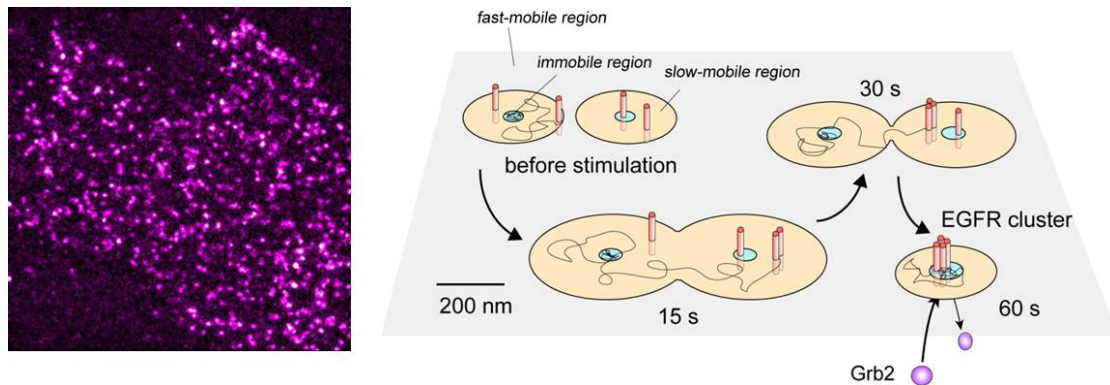


Fig.1. EGFR-GFP の細胞内 1 分子動態

ErbB の下流で RAS を活性化する蛋白質 SOS には、Noonan syndrome (NS) と呼ばれる、SOS の活性昂進による遺伝病が存在する。SOS は 6 つのドメインからなる細胞質蛋白質であり、Cdc25 ドメインが RAS の活性化を行うが、NS 変異は Cdc25 ドメイン以外にも SOS の様々な部位にみられ、各々の変異による活性向上メカニズムの詳細は明らかでない。SOS の異なるドメインにおける 3 種の NS 変異体の分子動態を生細胞内 1 分子蛍光測定した。酸性脂質に結合する H ドメインの変異 M269 では、細胞質から細胞膜への結合速度定数が野生型に較べて増大していた。この性質は不活性型 RAS に結合する REM ドメインに依存的事であることから、M269 は細胞質中で構造不安定性が増し野生型では隠されている REM ドメインが露出していると考えられる。DH ドメインと REM ドメインの間のヘリカルリンカーの変位 R552 は、膜結合反応は野生型同様であるが、解離速度定数が低下しており、膜上での構造変化ダイナミクスの異常が示唆された。また、Grb2 と結合し間接的に活性型の細胞膜受容体を認識する G ドメインの変異 R1131 は、その他のドメインに依存せずに膜結合速度定数が上昇しており、G ドメインと Grb2 の親和性が上昇しているために活性が昂進していると考えられる。以上のように、変異部位に応じて SOS/RAS 反応の異なった過程を促進していることが明らかとなり、細胞内 1 分子計測の反応作用点解析における有用性が示された (Nakamura et al. Sci Rep 7; 14153, 2017)。

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

1 分子計測は、生体高分子の複雑な運動・構造・反応の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、単一分子の追跡や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 分子のダイナミクス計測に取り組んでいる。

(1) ErbB 受容体と脂質の相互作用による機能調節

膜蛋白質の機能は環境因子である境界脂質との相互作用で調節を受けていると予想されるが、その具体的な様相は一般に明らかでない。ErbB1 の膜貫通(TM)および膜近傍(JM)ドメインを含む蛍光ペプチドを合成し、直径 10 nm 程度の脂質ナノディスク膜へ再構成して、JM ドメイン間の 2 量体形成ダイナミクスを 1 分子 FRET 法で計測した (Fig. 2)。TM ドメインは膜中で安定な 2 量体構造を採っているが、JM ドメイン間の FRET 効率は秒オーダーで変化し、自発的な結合解離ダイナミクスが存在する。ディスク膜に PS や PIP₂ のような酸性脂質を加えると 2 量体形成確率が上昇することから、JM 部位に多数含まれる塩基性アミノ酸と酸性脂質の相互作用が JM 2 量体の安定化に寄与することが示唆された。JM 部位のアミノ酸 T654 は細胞内でリン酸化を受けて ErbB1 の活性を阻害することが知られている。T654 のリン酸化ペプチドで同様の計測を行うと、PS を含む膜でのみ JM 2 量体の形成が阻害された。これらの結果は JM 部位と膜脂質の相

相互作用が JM 間の相互作用と共役していることを示しており、酸性脂質による ErbB1 2 量体化の調節機構が明らかになった。(Maeda et al. Biophys J 114:893, 2018)

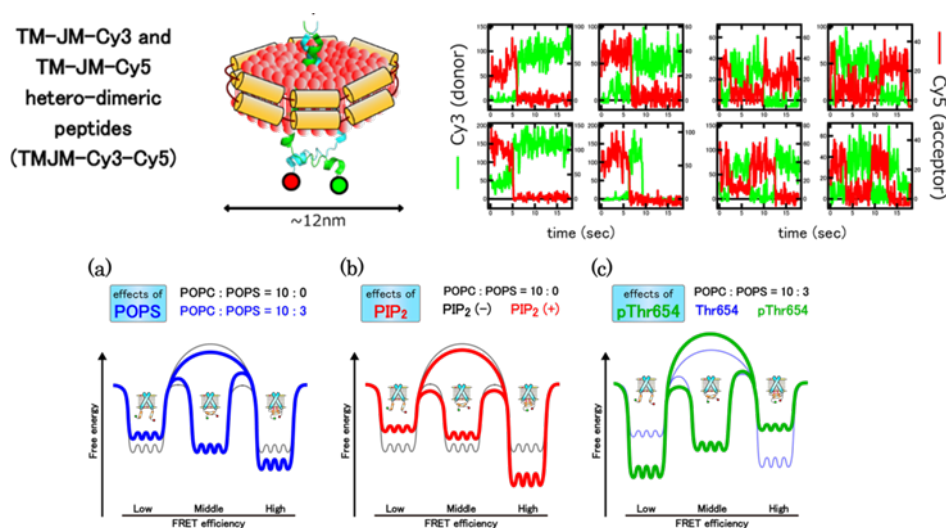


Fig.2 EGFR TM-JM ペプチドのナノディスク膜への再構成 (上左) と 1 分子 FRET 計測 (上右)

JM ドメインは解離状態・中間体・2 量体を遷移する (下)。状態遷移のエネルギー地形は、PC 膜内(黒細線)に比べて、PS 存在下 (a 青線)、PIP₂ 存在下 (b 赤線)、T654 のリン酸化 (c 緑線) で図のように変化する。

(2) RAF 分子の細胞内構造分布

RAF は RAS 下流で活性化されるリン酸化酵素である。RAF の活性は分子構造の開閉によって制御されており、そのダイナミクスは分子の両端に蛍光標識を施した RAF プロブの分子内 FRET 計測で検出できる。RAF のリン酸化部位に関する変異体プロブを作成し、分子構造がリン酸化によって変化することが分かってきた。

(3) GPCR の運動・会合・構造変化

生細胞表面の 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)の側方拡散運動が計測できる。GPCR は主要な細胞膜情報処理蛋白質群のひとつである。GPCR の一種 III 型代謝型グルタミン酸受容体(mGluR3)は統合失調症等にかかわる細胞膜受容体である。mGluR3 は拡散係数の異なる 4 つの運動状態を遷移していることがわかった。受容体を活性化するアゴニスト存在下では遅い拡散状態の割合が増加し、平均の拡散係数が低下する。逆に不活性化因子であるアンタゴニストを与えると平均拡散係数が増加する。このような拡散係数の変化は、受容体と 3 量体 G 蛋白質との相互作用や、受容体の細胞内取り込みに関連していることが明らかになっている。(Yanagawa et al. bioRxiv 205161)

3. 細胞運命情報処理の分子機構 (稲葉、佐甲)

NF-κB は種々の細胞において分化誘導のための転写制御に関与している。免疫系 B 細胞の成熟過程のモデルである DT40 細胞では、NF-κB は B cell receptor (BCR) に対する抗体刺激強度に対してスイッチ的に応答して核内へ移行し、その後細胞質と核内で振動的な濃度変動ダイナミクスを示す。このようなダイナミクスの生理学的意義を明らかにするため、単一細胞での NF-κB の核移行ダイナミクスと遺伝子発現の相関計測を行っている。GFP を融合した NF-κB は、BCR 活性化後に核内へ移行して凝集輝点を形成する。輝点の一部は RNA ポリメラーゼ II と共局在し、転写開始点であることが予想された。発現遺伝子の同定のため、3D FISH による染色と 1 細胞遺伝子解析のための細胞分取装置の作成を行っている。

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

我々は 1 分子蛍光顕微鏡法によって、蛋白質の構造変化ダイナミクスや、細胞内における蛋白質の運動・会合ダイナミクス、或いは細胞内分子間相互作用のキネティクスを計測し数理モデル解析する方法を作ってきた。本年度はこれまでの計測法開発の結果をとりまとめて 2 つの総説を発表した。(Okamoto et al. Biophys Rev, 2018, doi: 10.1007/s12551-017-0366-3; Iino et al. Biochem. Biophys. Acta. General Subjects, 1862:241, 2017)

5. 脂質の細胞生物学 (小林、富重、牧野、村手)

細胞膜脂質の構成や分布は極めてヘテロであり、脂質の機能を明らかにするためには特定脂質をイメージングするためのプローブ開発が重要である。我々のグループでは本年度、新規光変換型リン脂質アナログ、N-nitroBIPS-DPPGを合成した。このプローブはリン脂質頭部に光感受性基で標識した蛍光発色団 NBD を持ち、紫外光 (340 nm) と可視光 (543 nm) の交互照射で光感受性基が可逆的に構造変化を起こすために、繰り返し蛍光発光を点滅できる。(Sumi et al. *Sci Rep* 7:2900, 2017) このプローブは将来的に超解像蛍光顕微鏡法や細胞内脂質ダイナミクスの追跡に利用できると期待している。

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. Novel technologies on optical microscopy and their applications
5. Cell biological functions of membrane lipids

Key Word :

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

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 biomolecules 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 target of us is an intracellular protein reaction network that called ErbB-RAS-MAPK system. This system is 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. In addition, we are investigating functions and dynamics of proteins, including GPCRs, involved in cell signaling. 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 (Abe, Arata, Hiroshima, Miyagi, Sako, Sato, Umeki, Yoshizawa)

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.

(1) ErbB-RAS-MAPK system

It has long been known that associations of ligand molecules including EGF induce not only mutual phosphorylation of ErbB1 (EGFR) in its dimers but also higher-order cluster formation. However, physiological functions of ErbB1 clusters have not yet understood. We observed movements of ErbB1 receptors fused with GFP in living cells as well as their molecular clustering and interaction with GRB2 by using single-molecule imaging (Hiroshima et al. *J. Mol. Biol.* in press). Our study revealed that the higher-order ErbB1 clusters are the primary sites of signal transduction to Grb2. ErbB1 molecules before EGF association were solitary confined into small (~200 nm) membrane domains, but EGF transiently releases the ErbB1 confinement to allow molecular clustering (Fig.1). ErbB1 mutants having a defect in dimer formation or phosphorylation could not produce higher-order clusters. In another study, we found that PHL1, which inhibits ErbB1

activation, inhibits ErbB1 clustering and by using mathematical modelling, we suggested this inhibition by PHL1 is the reason of its inhibitory function on ErbB1 signaling (Magi et al. *J. Biol. Chem.* 293:2206, 2018).

Activation of ErbB induces GDP/GTP exchange on RAS by SOS on the plasma membrane. SOS has various genetic mutations that cause the Noonan syndrome (NS) disease. Although SOS function on RAS activation depends on the Cdc2 domain of SOS, NS mutants are found not only in Cdc25 domain but every other domain of SOS and of which pathological mechanism is still unclear. We examined behaviors of three different NS mutants of SOS on the cell surface using single-molecule imaging. M269 mutation in the acidic lipid-binding H domain increased the membrane association rate constant of SOS depending on the REM domain, another domain of SOS to interact with RAS-GDP. R552 mutation in the helical linker between DH and REM domains decreased dissociation rate constant of SOS from the plasma membrane, suggesting an abnormality in the structural dynamics in the membrane association state. Another mutation R1131 in the G domain, which associates with Grb2, increased the membrane association rate constants independent of the other domains. As shown here, single-molecule imaging allows precise analysis of the action points of individual mutations (Nakamura et al. *Sci Rep* 7; 14153, 2017).

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

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

(1) Lipid-protein interplay in regulation of ErbB1 dimerization

ErbB1 needs to adopt a specific dimer structure for signal transduction after ligand binding. We constructed a ten nanometer-scale proteolipid membrane (nanodisc) including the transmembrane and juxtamembrane (TM-JM) fragments of ErbB1 to detect monomer-dimer transitions at the JM region in single molecules (Fig. 2). Presence of acidic lipids, including PS and PIP₂, increased JM dimer fraction suggesting that interaction between the acidic head group of the membrane lipids and positively charged amino acids in JM results in the increase of JM-JM dimerization. JM contains a threonine residue (T654) which is known to be phosphorylated to decrease ErbB1 activity. Mechanism of inhibition by this phosphorylation was unknown. In our experiment, the threonine phosphorylation decreased JM dimer only in the presence of PS in membrane. These results indicated that lipid-JM interaction and JM-JM interaction are coupled in regulation of dimeric structure of ErbB1 (Maeda et al. *Biophys J* 114:893, 2018).

(2) Intracellular structural distribution of RAF

RAF is a cytoplasmic kinase regulated by RAS. RAF has two different conformations (open and closed). The open form is the active state of RAF, and the open/close dynamics can be detected from single-pair FRET between two fluorescent proteins conjugated to the two ends of a single RAF molecule. We improved the FRET probe of RAF to measure the structure of single RAF molecules in living cells. We are searching for the regulation mechanism of RAF conformation.

(3) Movements and oligomerization of GPCRs

We are studying the dynamics of trimeric G-protein coupled receptors (GPCRs), which is a major super family of cell surface receptors. The type III metabolic glutamate receptor (mGluR3) is a GPCR involved in outbreak of schizophrenia. Based on single-molecule tracking of mGluR3 tagged with a fluorescent protein on the cell surface, we detected transition of single mGluR3 particle among four motional modes different in the lateral diffusion coefficient. Association of an agonist to the receptor increased the fractions of slower moving states causing a decrease of the lateral diffusion coefficient in average. On the other hand, association of an antagonist increased the diffusion coefficient. Such changes in the mobility of mGluR3 were the results of interactions with trimeric G proteins

and clathrin coated pits (Yanagawa et al. bioRxiv 205161).

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

NF- κ B is a transcription factor responsible for induction of differentiation in various types of cells. Responding to the B-cell receptor (BCR) stimulation, NF- κ B shows switch-like and oscillatory dynamics to regulate gene expression for the maturation of immune B-cell. This process can be analyzed in a B-cell model DT40. To reveal the physiological meaning of NF- κ B dynamics, we are constructing single cell measurement system of NF- κ B dynamics and genome-wide gene expression in DT40. After stimulation of BCR, NF- κ B translocated from the cytoplasm to the nucleus and formed foci in the nucleus. A part of the foci colocalized with RNA polymerase II, suggesting that they are the initiation sites of mRNA transcription. We are constructing a single-cell collection system and trying 3D-FISH for identification of the genes regulated by NF- κ B foci.

4. Novel technologies on optical microscopy and their applications (Hiroshima, Okamoto, Sako, Yamamoto)

In the studies described above, we are developing various technologies of bioimaging and data processing. This year, we have published two review works summarizing recent developments of single-molecule imaging technologies (Okamoto et al. *Biophys Rev*, 2018, doi: 10.1007/s12551-017-0366-3; Iino et al. *Biochem. Biophys. Acta. General Subjects*, 1862:241, 2017).

5. Cell biological functions of membrane lipids (Kobayashi, Makino, Murate, Tomishige)

Because the compositions and distributions of lipid species in the biomembrane are extremely heterogeneous, development of probe molecules for imaging specific lipid species is highly important to reveal functions of lipids. Recently, we synthesized a novel photo-switchable lipid analogue N-nitroBIPS-DPPG (Sumi et al. *Sci Rep* 7:2900, 2017). This lipid analogue contains a fluorophore moiety NBD conjugated with a photo-sensitive functional group. By irradiating UV (340 nm) and visible (543 nm) lights alternately, the photo-sensitive group changes its structure reversibly, as the result, the NBD fluorescence is switched on and off repeatedly. N-nitroBIPS-DPPG will be used for super-localization microscopy and tracking of lipid dynamics in living cells.

Principal Investigator

佐甲 靖志 Yasushi Sako

Research Staff

阿部 充宏 Mitsuhiro Abe
荒田 幸信 Yukinobu Arata
稲葉 岳彦 Takehiko Inaba
梅木 伸久 Nobuhisa Umeki
岡本 憲二 Kenji Okamoto
佐藤 裕美 Hiromi Sato
富重 斉生 Nario Tomishige
永峰 俊弘 Toshihiro Nagamine
廣島 通夫 Michio Hiroshima
前田 亮 Ryo Maeda
牧野 麻美 Asami Makino
宮城 拓 Hiraku Miyagi
村手 源英 Motohide Murate
柳川 正隆 Masataka Yanagawa
山本 明弘 Akihiro Yamamoto

Students

吉澤 亮 Ryo Yoshizawa

Visiting Scientist

小林 俊秀 Toshihide Kobayashi
白 燦基 Chan-gi Back

Company-Sponsored Resaercher

鈴木 達也 Tatsuya Suzuki

Assistant

澤井 年子 Toshiko Sawai