

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. 細胞内情報伝達システムの1分子解析
2. 細胞内反応ゆらぎとその伝搬
3. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発
4. 細胞情報処理システムの再構成

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

研究目的

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基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・応用する。

1. 細胞内情報伝達システムの1分子解析 (廣島、日比野、佐藤、佐甲)

(1) 上皮成長因子受容体の動的会合状態

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。高分解能1分子計測法により、EGFR会合体が2量体を基本とする単位構造を持つことを示唆するデータを得た。

(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

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は乳腺様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る。その第一段階として、蛍光色素TMRで標識したEGFおよびNDFとErbB受容体群の結合反応を1分子計測した。また、結合反応を解析する数理モデルを構築した。(細胞システムモデル化研究チームとの共同研究)

(3) RasとRafの分子認識反応

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。Ras/Rafの解離反応の細胞内で1分子計測と、Rafのコンフォメーションの細胞内1分子可視化により、RafがRasの活性化状態を見分けるに際しRasによるRafのコンフォメーション制御が利用されているという仮説を得た。また、解離反応の速度解析から、Ras, Rafおよび細胞膜の未知のリン酸化酵素3者の相互作用によって起こるRafの活性化過程の反応モデルを構築した。

2. 細胞内反応ゆらぎとその伝搬に関する研究 (岡本、日比野、太田、佐藤、佐甲)

(1) 上皮成長因子受容体とGrb2の認識反応

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、EGFR と Grb2 の 2 次結合反応速度は Grb2 濃度上昇につれて減少し、また、両者の反応には非マルコフ性（反応記憶）が存在することを明らかにした。このような複雑な反応ダイナミクスは EGFR の構造ゆらぎによって実現していると予想している。この予想を検証するため、EGFR の構造ゆらぎを実測するための実験系の構築を始めた。EGFR 細胞質ドメインの大腸菌内発現・精製系と 1 分子内 FRET 計測による構造ゆらぎ計測装置の組み立てを行った。

(2) 細胞内反応伝搬とそのゆらぎの計測

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。定量的な反応ゆらぎの伝搬計測へ向けて、蛍光プローブ分子を遺伝子構築し、安定発現細胞の樹立を行っている。

3. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発（山本、岡本、佐甲）

(1) 光感受性情報伝達分子の開発

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。光感受性かつガラス基盤に結合可能な EGF の合成を進めている。基盤結合のためのタグを融合した EGF の無細胞蛋白質発現系による合成と精製の方法を検討した。

(2) パターン投影光学顕微鏡の開発

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行っている。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。プロトタイプ顕微鏡の作成と画像再構成のアルゴリズム検討を行った。

(3) 高速 1 分子計測・可視化法の開発

サブミリ～マイクロ秒領域での 1 分子ダイナミクス観測のため、高速 1 分子計測・可視化装置の開発を開始した。1 分子から蛍光発光した光子を実時間で捉え、光子密度変化から分子の状態変化を最尤推定することにより、100 photon (10 ~ 100 μ s) 程度の精度で分子ダイナミクスを計測する方法 (time stamp) と、1 光子検出素子を 2 次元配列して高速 (10 ns) ・並列読み出しをおこなう方法 (G-APD camera) を開発中である。（後者は戎崎研、丑田ユニット、BSI 武藤チームとの共同開発）

4. 細胞情報処理システムの再構成（高橋、日比野、佐藤、佐甲）

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 によりこの反応を大腸菌内に再構成した。また、反応シミュレーションを行い、反応体積変化の影響を予測した。

Key Sentence :

1. Single-molecule analysis of cell signaling systems
2. Propagation of reaction fluctuations in living cells
3. New technologies on optical microscopy
4. Reconstruction of cell signaling systems

Key Word :

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

Purpose of Research :

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 (Hiroshima, Hibino, Sato, Sako)

(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. Furthermore in some cells, clustering of 20-30 molecules of EGFR has been reported. We analyze dynamics and functions of EGFR clusters using single-molecule imaging. Applying high spatial-resolution single-molecule imaging, homodimers was suggested to be the unit of hierarchical clustering of EGFR.

(2) Association between EGF receptor families and their ligands

The EGFR family 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 mammary cells, 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 prepared fluorescent EGF and NDF to measure ligand-receptor association in single molecules on the living cell membrane. We also constructed a mathematical model to analyze the association reactions. (collaboration with Cellular Systems Modeling Team)

(3) Molecular recognitions between Ras and Raf.

Activation of small GTPase Ras under the plasma membrane recruits Raf, a cytoplasmic serine/threonine kinase to the cell surface. This interaction is important for cells as one of the major dysregulations in cancer cells. Raf has two Ras binding domains, RBD and CRD, and is thought to have two conformations, closed and open. Single-molecule kinetic analysis of the dissociation between Ras and Raf1 in combination with single-molecule conformation analysis of Raf revealed that the conformational dynamics of Raf is used for Raf to distinguish activation of Ras. Based on the single-molecule measurements, a kinetic model is under construction for the activation process of Raf in the ternary complex among Ras and the plasma membrane kinases.

2. Propagation of reaction fluctuations in living cells (Okamoto, Hibino, Ota, Sato, Sako)

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

Phosphorylation of EGFR upon EGF binding induces recognition by an intracellular signaling protein, Grb2. In the reactions between EGFR and Grb2, we found negative concentration dependency in the association rate and reaction memory (non-Markovian process). This complex reaction is thought to be caused by structural hysteresis of EGFR after dissociation of Grb2. In order to verify this hypothesis, we started construction of an experimental system to measure structural dynamics of EGFR. This year, we constructed recombinant expression and purification system of the cytoplasmic domain of EGFR and a microscope to measure single-pair FRET with subms time resolution.

(2) Propagation of reaction fluctuations in living cells

RTK-Ras-MAPK systems are the intracellular reaction cascade processing signals including 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. Toward quantitative measurements of intracellular propagation of reaction intensity and its fluctuation, we constructed plasmids carrying the fluorescent probes and are establishing stable transformants of these probes.

3. New technologies on optical microscopy (Yamamoto, Okamoto, Sako)

(1) Photo-sensitive cell signaling molecule

We are developing photo-sensitive EGF. For the fixation of the molecule onto glass coverslips for microscopy, cDNA of EGF fused with HA-tag was constructed and being expressed in cell-free

protein expression systems.

(2) Pattern projection microscope

We are developing 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. Prototype of PPM was constructed and a software algorithm was designed to regulate PPM.

(3) High-speed single-molecule measurements and imaging

To achieve single-molecule detection of molecular dynamics in subms $\sim \mu\text{s}$ of time domain, we started developments of high-speed single-molecule measurements and imaging. Time stamp detection and maximum likelihood estimation will allow us to determine molecular states using ~ 100 photons emitted from a fluorophore during 10-100 μs . Also we are developing G-APD camera which enables single-photon imaging with 10 ns sampling time (in collaboration with Computational Astrophysics Laboratory, Nano-Integration Material Research Unit, and BSI Laboratory of Molecular Biophysics).

4. Reconstruction of cell signaling systems (Takahashi, Hibino, Sato, Sako)

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. This reaction system was reconstituted in *E. coli* cells and phosphorylation and dephosphorylation of ERK were observed. Using a reaction simulator to analyze dynamics of ERK activity with number fluctuation, effects of reaction volume for ERK activation was calculated.

Head

佐甲 靖志 Yasushi Sako

Members

日比野 佳代 Kayo Hibino

廣島 通夫 Michio Hiroshima

岡本 憲二 Kenji Okamoto

佐藤 裕美 Hiromi Sato

山本 明弘 Akihiro Yamamoto

Trainees

太田 康友 Kosuke Ota

高橋 正裕 Masahiro Takahashi

Assistant and Part-timer

澤井 年子 Toshiko Sawai