

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を探る
2. 細胞内情報処理蛋白質の構造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

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を明らかにすることを目標としている。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っている。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。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・プログラム細胞死などの細胞運命決定に関わる細胞内反応ネットワークおよび、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、細胞運命を決定する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、佐甲、佐藤、白、日比野、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。複雑な細胞内反応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・数理解析を応用した、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る反応ネットワークである。最近特に、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の3層の反応ネットワークに注目した研究を行っている。第1層に関しては、細胞増殖と分化をそれぞれ誘導するリガンドである EGF と NRG と、各々の膜受容体(ErbB1 と B3/4)との結合および2量体形成を解析している。ErbB 受容体は細胞膜上で見かけ上リガンド親和性の異なる2種の状態で存在することが古くから知られているが、分子の実体は明かでない。我々は低温下での生細胞1分子計測技術を開発し、NRG と ErbB3/4 についてこの問題が解決できつつある(図1)。細胞膜内の第2層に関しては、ErbB の動的会合体形成が細胞応答に重要であると示唆されていることから、超解像光学顕微鏡技術を利用した会合体分布計測と1分子運動計測を行っている。本年度は、隠れマルコフモデルによる1分子運動解析法を開発し、ErbB1 の運動状態遷移図を描くことができた(図2)。第3層の ErbB と細胞質蛋白質の認識反応に関しては、蛍光相関分光法・蛍光相互相関分光法を利用して、アダプター蛋白質 Grb, Shc, PI3K と ErbB の相互作用ダイナミクスを計測した。各々のアダプターは従来と異なり、個別に受容体と相互作用しているらしい。また、本年度から新たに Par システムによる細胞極性情報形成の研究を開始した。線虫初期胚中での1分子可視化計測法、FCS 計測法を確立した。この方法を応用して、まず1細胞期の極性維持機構を解明する。

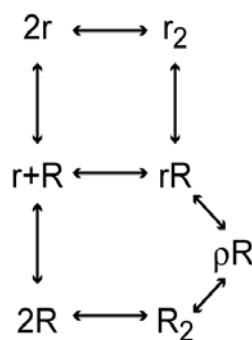
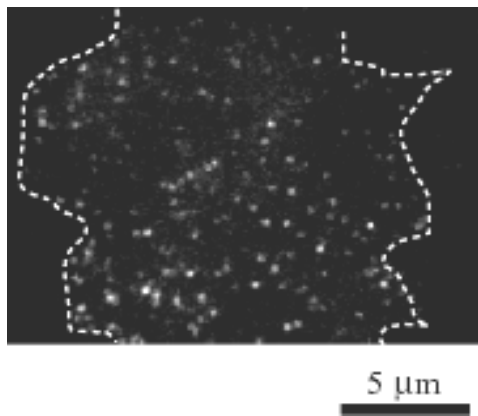


図1 細胞外リガンドと ErbB の結合と 2 量体形成
 左：蛍光標識した EGF, NRG と細胞膜受容体 (ErbB1 および B3/4) の結合を 1 分子可視化する。
 右：分子ダイナミクスにより、親和性の異なる分子間相互作用が創発する反応システム。r, R はそれぞれリガンド結合していない、あるいは結合した受容体を表す。ρ は 1 分子計測で見つかった反応中間体。r₂, rR, ρR, R₂ は 2 量体。

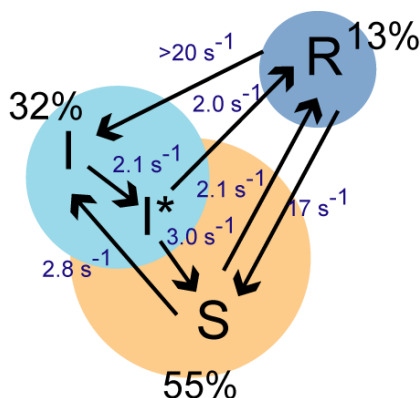
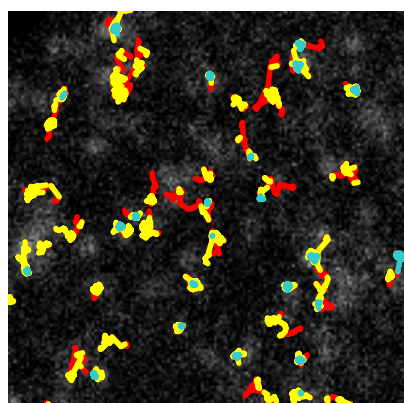


図2 ErbB1 の運動計測
 新たな 1 分子運動解析法により、ErbB1 の運動が静止状態 (I:水色) 遅い拡散運動 (S:黄) 速い拡散運動 (R:青) の 3 つの運動モード間の遷移であることがわかった。この解析法で 1 分子運動の各瞬間を各々の運動モードに分類し (左) モード遷移の状態図 (右) を作ることができた。受容体分子の会合数と運動モードには相関がある。

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、日比野)

1 分子計測は、様々な蛋白質の複雑な反応・構造ダイナミクスを明らかにしてきたが、細胞内情報処理反応の素過程で活躍する蛋白質の反応においても、我々は 1 分子反応計測によって、反応キネティクスの多状態性や複雑な濃度依存性、反応記憶の存在などを発見している。このように複雑な蛋白質反応の構造的基盤を明らかにするため、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 分子 FRET 計測を高感度・高時間分解能化するため、タイムスタンプ検出装置と、データ解析法を開発した。タイムスタンプ法は 1 分子の蛍光発光を単一光子検出し、すべての光子検出時間を実時間で記録する方法である。光子単位で状態変化時刻を推定するため、一定時間幅で発光強度を計測する定法に較べて同一条件下でも高い時間分解能が得られる。タイムスタンプ法を 2 チャンネルの 1 分子 FRET 計測に拡張し、隠れマルコフモデルと変分ベイズ法による状態変化検出法を新たに考案した。シミュレーションによる比較では、従来法はもとより、タイムスタンプ計測がよく使われている change point detection 法よりも優れた状態数と反応パラメータ推定ができることが分かった。この方法を実証するため、2 本鎖 DNA の作る Holliday junction の構造変化計測を行っている。

3. 細胞運命情報処理の分子機構 (佐甲、高橋、毛利)

RTK-Ras-MAPK システムは、細胞増殖・分化・細胞死など複数の細胞運命決定に関与しているが、同一の分子システムが異なった細胞運命を導く機構は、完全には解明されていない。MAPK の活性化の時間パターンが一過性になるか、持続性になるかが増殖と分化の差異を生むという提案が一応受け入れられているが、MAPK の活性化・不活性化反応のメカニズムや、個々の細胞内での MAPK ダイナミクスと細胞運命の関係は、詳細には調べられていない。MAPK の活性化反応には双安定性の存在が予想されており、持続的活性化の安定な維持に関与している可能性が強い。我々は MAPK および、MAPK の活性化・不活性化酵素である MEK, MKP を大腸菌に発現させた再構成システムを構築し、活性化反応の応答関数の実測と計算機実験から、MAPK の反応機構や双安定性の解析を行っている。

また、哺乳類細胞(PC12)の長期培養システムで単一細胞の MAPK ダイナミクスと、細胞運命の対応付けを行っている。PC12 は EGF で増殖、NGF で分化するとされているが、増殖・分化・細胞死はそもそも自発的な細胞動態であり、培養条件によって各々の運命の選択確率は変動する。EGF, NGF などの成長・分化因子は、運命選択の確率を変動させることにより、細胞の挙動を調節している。増殖・分化・細胞死の確率的運命選択モデルを作製し、実験データと比較して、マルコフ連鎖モンテ・カルロ法を用い、疑似焼き鈍し法で運命選択速度定数を推定した。このモデルは、同一条件下に置ける細胞密度ゆらぎをうまく説明できた。

4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発 (岡本、佐甲、高根沢、日比野、廣島、盛田、山本)

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を行っている。(1) 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-APDcamera)の開発を昨年引き続き行っている。(戎崎研、超分子科学研究室、BSI 武藤チームとの共同開発)カメラのプロトタイプが完成し、性能評価中である。(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、細胞内要素の多次元・無染色・連続計測を可能にする方法を開発している。細胞質、細胞核など細胞内の 1 点から数分でラマンスペクトルを検出し、主成分分析や SIMCA(soft independent modeling of class analogy)によって、単一細胞の特徴付けを行った。細胞分化の時系列に沿ってラマンスペクトル計測を行い、細胞分化経路が直線的ではないこと、分化の初期段階で細胞間ゆらぎが増大することなどが見えてきた(図 3)。(3) 蛍光ビーズ、Q-dot など各種蛍光ナノ粒子を利用した細胞内分子ダイナミクス計測法を開発している。シリカベースの新たな蛍光ナノ粒子(直径数十 nm)を作製し、種々の機能評価を行った結果、明るく、不活性、無毒かつ細胞内で単一粒子として自由拡散するなど、標準粒子として従来にない優れた性質を持つことが分かった。

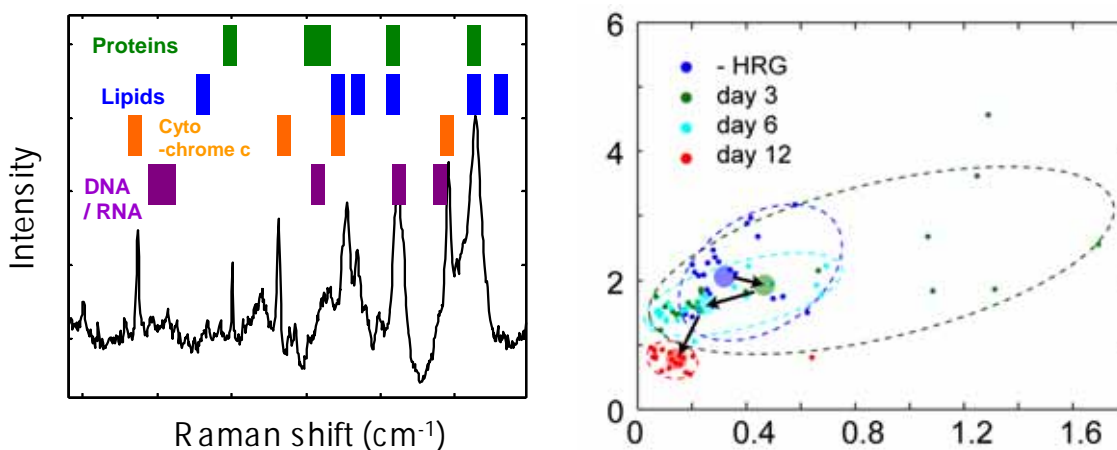


図 3 細胞分化過程のラマンスペクトルダイナミクス計測

MCF-7 細胞は HRG(=NRG)によって乳腺細胞様に分化する。HRG 添加後、日を追って MCF-7 細胞の細胞質で計測したラマンスペクトル(右)を SIMCA 解析した(左)。左図の横軸は細胞内成分の量の変動、縦軸は新たな構成成分の出現あるいは成分の消失を現す。細胞分化に伴う細胞構成成分の変化は直線的ではなく、初期過程(3日目)で構成成分量の平均値変動と、細胞間のばらつきが大きくなるのが分かる。

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. New technologies on optical microscopy

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 biosignal systems, as well as mathematical analysis and computer simulations of reaction networks. The recent main targets of us are an 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 Par system which is responsible for the formation of cell polarity. We are studying functions and dynamics of proteins involved in these systems. We also are analyzing how various dynamics of reaction systems emerge from the accumulations of elemental protein reactions.

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

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. Quantitative single-molecule measurement in living cells in combination with mathematical analysis is our main technology. We are studying about ErbB-Ras-MAPK system, a member of RTK-Ras-MAPK systems. By stimulating this system, EGF induces cell proliferation, but using the same system, HRG induces cell differentiation. The membrane receptor ErbB family consists of four members of which EGF and HRG associate to ErbB1 and B3/4, respectively. We have measured association between EGF and HRG to their receptors that induces dimerization of receptors which is indispensable for receptor activation. It has long been known that ErbBs on the living cell membrane form high and low affinity association sites for their ligands, the molecular mechanism of which, however, has not been elucidated. This year, we carried out single-molecule measurements in cells under low temperature for observation of association equilibrium between ErbB3/4 and HRG to solve how different association rates emerges through molecule dynamics of ErbB (Fig. 1). We have suggested that after the ligand association, dynamic clustering of ErbB's important for signal amplification and propagation. Applying quantitative PALM (photoactivation localization microscopy) and single-molecule tracking, we analyzed dynamic clustering of ErbB1 molecules on the cell surface. We applied new analysis method of single-molecule trajectory that uses a hidden Markov model (HMM) and the variational Bayesian (VB) method to the movements of single ErbB-GFP molecules in living CHO cells. The movements consisted of three motional modes differ in the lateral diffusion coefficient and we described a diagram of the transition of motional modes (Fig. 2). We also measured dynamics of various cytoplasmic proteins that recognize activation of ErbB receptors using FCS (fluorescence correlation spectroscopy) and FCCS (fluorescence cross correlation spectroscopy). Different from the conventional theory, each adaptor protein molecule (Grb, Shc, or PI3K) seems to interact with ErbB molecules independently. From this year, we started single-molecule studies of Par system which is responsible for polarization in various types of cells. As the start point, we established condition of single-molecule measurements (single-molecule imaging and FCS) in a fertilized egg of *C. elegans*. Based on the results of single-molecule measurements, first, we will construct mathematical model for the maintenance of cell polarity in the single-cell stage.

Figure 1. Associations of extracellular ligands and formation of ErbB dimers.

Left: Single-molecule imaging of fluorescently labeled EGF or NRG (HRG) on the surface of a living cell. Right: Reaction network of the ligand and ErbB that dynamically realize differentiation of the dissociation equilibrium constant. r and R represent unliganded and liganded receptor molecule, respectively. ρ is a novel reaction intermediate found by single-molecule analysis. r_2 , rR , ρR , and R_2 are receptor dimers with or without ligand.

Figure 2. Single-molecule motion analysis of ErbB1.

A new analysis method based on HMM-VB detected three motional modes of ErbB1 in the cell membrane, i.e., immobile (light blue), slow (orange) and rapid (blue) diffusion. These three motional mode is interchanging transiently and a single-molecule trajectory was subdivided into periods of different motional modes (left). From this analysis, a diagram of the transition of motional modes was described (right).

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

In single-molecule measurements of the interactions between cell signaling proteins, we have found complex protein reaction properties including multiple states, abnormal concentration dependency, and reaction memory. Now we are examining structural dynamics of cell signaling proteins in single-molecules to understand structural basis of these complexities in protein reactions. For this end, sensitivity and temporal resolution of single-molecule structural measurements need to be improved. Thus, we developed a time-stamp detection apparatus and a new method of data analysis of single-molecule FRET measurements. Time-stamp measurement that records all time points of single photon detection from single fluorescent molecule is good for improvements of temporal resolution because it can estimate the change points of molecular structure in the unit of single photons instead of time-bin in conventional techniques. We extended time-stamp analysis into 2-channel detection for FRET measurements applying HMM-VB methods. Results of simulation analyses suggested our methods is superior to other time-stamp analysis methods.

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

Though it is largely unknown how RTK-Ras-MAPK systems can induce different cell fates according to the different inputs and circumstances to cells, MAPK is thought to be a key molecule in cell fate decision, since its activation is temporal or sustained under the conditions that induce cell proliferation or differentiation, respectively. However, precise kinetics of MAPK activation has not been known and single-cell analysis of the MAPK activation has not been done carefully. In the activation of MAPK, presence of a bistability has been suggested in theory. We reconstruct activation and inactivation of MAPK in *E. coli* cells and are analyzing the response function comparing the experiments and computer simulation. We are also analyzing MAPK activation and cell fate determination in the same single cells. PC12 cells spontaneously select three different cell fate, i.e., proliferation, differentiation (into nerve like cells), and cell death. The selection probabilities of these three fates change depending on the condition of cell culture. We constructed a mathematical model for stochastic selection of cell fates, and by comparing the model and experiments, kinetic parameters for cell fate decision were estimated by Markov chain Monte Carlo model using simulated annealing. This model can explain local fluctuations of cell densities observed in the experiments.

4. New technologies on optical microscopy (Hibino, Hiroshima, Morita, Okamoto, Sako, Takanezawa, Yamamoto)

In addition to newly developed technologies used in the above projects, we are developing following technologies on optical microscopy. (1) G-APD camera: this camera enables single-photon imaging with 10 ns sampling time (in collaboration with Computational Astrophysics Laboratory, Supramolecular Science Laboratory, and BSI Laboratory of Molecular Biophysics). (2) Detection of cellular states based on Raman spectral dynamics: this technology is for a non-invasive non-staining, and multidimensional analysis of temporal series of single-cells. We analyzed differentiation process of MCF-7 cells stimulated with HRG (Fig. 3). (3) Synthesis and characterization of new nano-probes: novel silica-base fluorescent nano-particles with several tens nanometers in diameter have been developed and demonstrated to be good for a standard probe for the detection of intracellular dynamics and interactions of proteins.

Figure.3. Raman spectral dynamics along the differentiation process of MCF-7 cells. MCF-7 cells differentiates into mammalian grand-like after stimulation with HRG. Raman spectrum (left) has been obtained with time after HRG stimulation from the cytoplasm of single cells. SIMCA (soft independent modeling of class analogy) analysis revealed differentiation is not a straight pathway and a large cell-to-cell deviation at the initial stage (3 days).

Principal Investigator

佐甲 靖志 Yasushi Sako

Research Staff

荒田 幸信 Arata Yukinobu

岡本 憲二 Kenji Okamoto

佐藤 裕美 Hiromi Sato

谷口 雄一 Yuichi Taniguchi

白 燦基 Chan-Gi Back

日比野 佳代 Kayo Hibino

廣島 通夫 Michio Hiroshima

毛利 一成 Kazunari Mouri

盛田 伸一 Shinichi Morita

山本 明弘 Akihiro Yamamoto

Students

高根沢 聡太 Sota Takanezawa

高橋 正裕 Masahiro Takahashi

Assistant and Part-timer

澤井 年子 Toshiko Sawai