

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。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、佐甲、佐藤、中村、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。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っている。最近では特に、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の3層の反応ネットワーク (図1) 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, 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 についてこの問題を解決した。2量体を形成する受容体・リガンド間の相互作用に依存して、受容体とリガンドの結合・解離の反応速度定数は動的に変化し、これが図2に示すような反応ネットワークを介して、異なる親和性を生み出している。細胞膜内の第2層に関しては、ErbB

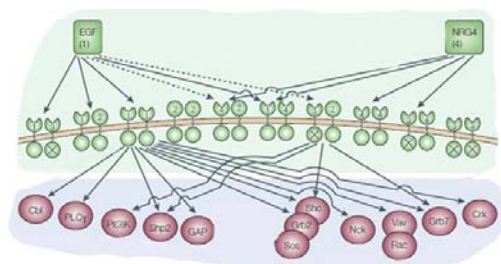


図1. ErbB システムの反応ネットワーク

の動的会合体形成が細胞応答に重要であり、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。会合状態と情報伝達反応の相関関係が明らかになりつつある。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解析している。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。

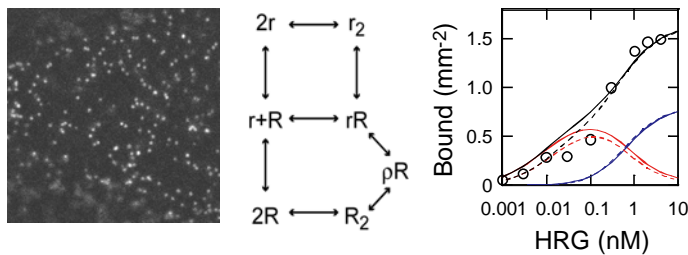


図2. 細胞外リガンドと ErbB の結合と 2 量体形成  
 左：蛍光標識した EGF, NRG と細胞膜受容体(ErbB1) および B3/4)の結合を 1 分子可視化する。中：反応ネットワークモデル。r, R はそれぞれリガンド結合していない、あるいは結合した受容体を表す。ρ は 1 分子計測で見つかった反応中間体。r<sub>2</sub>, rR, ρR, R<sub>2</sub> は 2 量体。右：分子ダイナミクスにより、親和性の異なる分子間相互作用が創発する

Par システムによる細胞極性情報形成の研究に関しては、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) の後半分に Par2 蛋白質が集積する分子機構を解析している。GFP 融合 Par2 を発現した線虫卵で、細胞膜、細胞質での Par2 の拡散運動、Par2 の細胞質への結合および解離速度、細胞膜での Par2 の会合体形成と Par2 リン酸化反応による会合制御等を、細胞内空間の関数として定量的に計測した。計測結果に基づく反応拡散モデルを構築中である。

## 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、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 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単一光子の実時間計測によって光子単位で状態変化時刻を推定するため、高い計測精度が期待される。タイムスタンプデータを、隠れマルコフモデルと変分ベイズ法(TS-HMM-VB 法)によって解析し、状態変化ダイナミクスを推定する。この方法の実証例として、2 本鎖 DNA の作る Holliday junction の構造変化計測を行い、DNA 1 塩基対に当たる構造変化を検出することに成功した (図 3)。

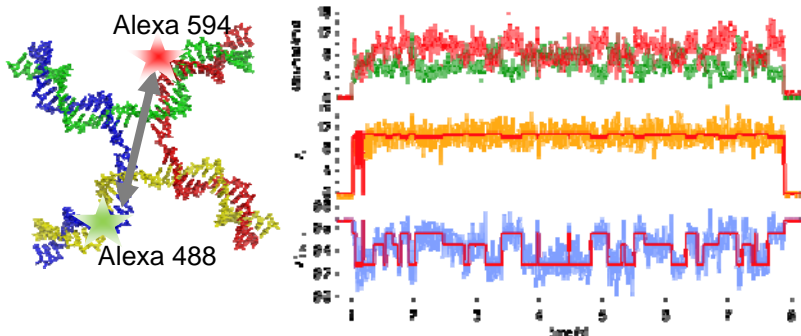


図3. Holliday junction (HJ)の構造変化  
 HJ は DNA 鎖 4 本が作る左図の構造で、遺伝子の相同組み替え等に関与している。相同塩基対の対合位置が変わることで構造変化がおこる(Branch migration)。3 状態を遷移するように設計した DNA 鎖で HJ を構成し、適当な位置に 2 種の蛍光色素(Alexa 488, 594)を導入して、1 分子 FRET 計測を行った。Branch migration による色素間の距離の変化を FRET 効率変化として検出する。左図上の緑、赤線は、それぞれ Alexa488 と 594 の蛍光強度変化を示す。青線は計算された FRET 効率変化であり、HMM-VB 法で再構成した 3 状態構造変化を赤線で重ねる。(赤線は 4 状態あるが、最も上の状態は光が当たっていないときのバックグラウンドである。)

ErbB1 の細胞質末端ドメインは、リン酸化されて様々な細胞内分子との認識反応をおこなう。我々は、ErbB1 と Grb2 蛋白質の認識反応を 1 分子反応計測し、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。分子反応と共役した構造変化ダイナミクスを解析するため、TS-HMM-VB 法による計測を開始した。細胞質末端ドメインを 2 色の蛍光色素で標識し、FRET 信号を検出することに成功している。

## 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高い。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。それぞれ異なった色の蛍光蛋白質を融合した MAPK, MEK, MKP を、別々のプロモータ制御下に発現させ、誘導物質によって 3 種の蛋白質の発現量制御を可能

にした。MEK, MKP 依存的に MAPK の活性化（2重リン酸化）が変動し、再構成系を構築できた。今後反応解析を行う。

PC12 細胞においては EGF, NGF どちらによっても Ras-MAPK システムが活性化されるが、EGF は増殖因子、NGF は分化因子であるとされる。実際には、増殖・分化および細胞死は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 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、運命選択速度定数を推定した。培養条件の変動により、自発的な運命決定確率も EGF, NGF に対する応答性も共に変化するが、条件悪化によって自発性が上昇すること、最大応答を与える適切な自発性が存在することなどが明らかになってきた。

#### 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-APD Camera)の開発。(戎崎研、超分子科学研究室、BSI 武藤チームとの共同開発) 受光素子の冷却装置、素子間の感度むらを補正する電子回路等を装着し、応用実験にこぎ着けようとしている。(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の開発。細胞質、細胞核など細胞内の1点から30秒でラマンスペクトルを計測し、多変量解析によって単一細胞の特徴付けを行った。細胞分化の時系列のラマンスペクトル変化を物質的に同定し、蛋白質および脂質成分量のサイクリックな変動が見えてきた(図4)。倒立顕微鏡をベースにした新たなラマン顕微鏡も制作中である。(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の開発。シリカベースの新たな蛍光ナノ粒子(直径数十 nm)を標識とする蛍光相関分光(FCS)計測で、細胞種に依存した細胞質粘性の違いを明らかにできた。

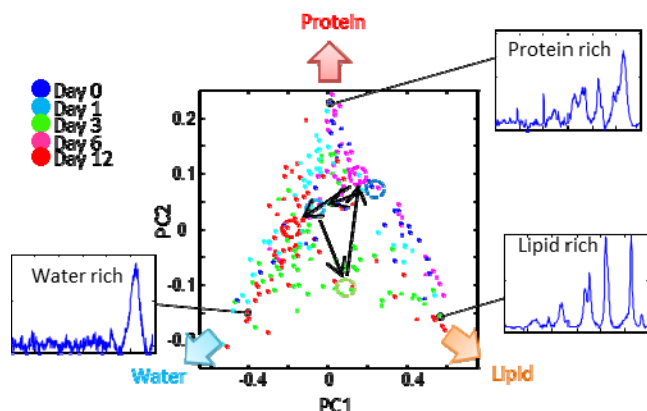


図4. 細胞分化過程のラマンスペクトルダイナミクス計測  
MCF-7 細胞は NRG によって乳腺細胞様に分化する。NRG 添加後、日を追って多数の MCF-7 細胞の細胞質で計測したラマンスペクトルを主成分分析し、第1, 第2主成分でプロットすると、3角形の内部に各測定値(点)が配置される。3角形の頂点を見ると、それぞれ蛋白質、脂質、水に富むスペクトルであることがわかった。分化過程の各日付におけるスペクトルの平均(点線で表示した○)を見ると、3角形の辺をサイクリックに移動している。これは、細胞分化過程で蛋白質、脂質、細胞体積が異なった位相で変化していくことを示している。

#### 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. 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 in embryogenesis and morphogenesis. We are studying functions and dynamics of proteins involved in these systems. We also 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, Hibino, Hiroshima, Nakamura, 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. Among various RTK-Ras-MAPK systems, recently, we are focusing on ErbB-Ras-MAPK system. By stimulating this system, EGF induces cell proliferation, but using the same system, NRG induces cell differentiation (Fig. 1). 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 NRG 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. We carried out single-molecule measurements in cells under low temperature for observation of association dynamics and equilibrium between ErbB3/4 and NRG to solve how different association rates emerge through molecule dynamics of ErbB (Fig. 1). Both association and dissociation rate constants between NRG and ErbB were changed upon dimerization of ErbB molecules and association of NRG to the dimers of ErbB. This varying rate constants of unitary reaction steps emerged (apparently) different association sites of NRG on the cell surface though the reaction network described in Fig. 2. 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 are analyzing dynamic clustering of ErbB1 molecules on the cell surface. 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. We are also studying the Par system which is responsible for polarization in various types of cells. Using single-molecule imaging and fluorescence correlation spectroscopy (FCS), we measured lateral diffusion coefficients, oligomerization, and association/dissociation kinetics of Par2 molecule fused with GFP and expressed in a nematode zygote. Now we are constructing mathematical model for the maintenance of cell polarity in a zygote using these reaction parameters.

Figure 1. Reaction network of ErbB system.

Figure 2. Associations of NRG and formation of ErbB dimers.

Left: Single-molecule imaging of fluorescently labeled NRG on the surface of a living MCF-7 cell. Middle: Reaction network of NRG and ErbB that dynamically realize differentiation of the dissociation equilibrium constant.  $r$  and  $R$  represent unliganded and liganded receptor molecule, respectively.  $\rho$  is a novel reaction intermediate found by single-molecule analysis.  $r_2$ ,  $rR$ ,  $\rho R$ , and  $R_2$  are receptor dimers with or without ligand. Right: Association equilibrium of NRG (HRG) to the cell surface as the function of extracellular concentrations. Biphase association of NRG which was experimentally observed (circles) could be reproduced by the reaction model (middle) using experimentally obtained values of reaction rate constants.

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

We are examining structural dynamics of cell signaling proteins in single-molecules to understand structural basis of the complex protein reactions. We use single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) measurement in single molecules, developing a time-stamp (TS) detection apparatus and a new method of data analysis depending on hidden Markov model (HMM) and variational Bayes (VB) methods (TS-HMM-VB). In simulation, TS-HMM-VB realized more accurate reconstruction of molecular dynamics compared to previous methods such as change point detection. To show the application of this method, we measured brunch migration of Holliday junctions which is the intermediate structure of the homologous recombination of DNA double strands. Stochastic movements of single base pairs were successfully detected (Fig. 3). The cytoplasmic tail of ErbB1 is a molecular recognition domain between ErbB1 and various cytoplasmic proteins. We started a study of structural dynamic of this domain and succeeded to detect intramolecular spFRET in this domain.

Figure 3. Brunch migration of a Holliday junction

A Holliday junction which have three-state brunch migration was designed and labeled with two different colors of fluorophores (Alexa 488 and 594). TS measurement showed changes of fluorescent signals from Alexa 488 and 594 with time (red and green lines in right top). Changes of FRET efficiency was calculated (blue line in right bottom) and state transition was reconstructed by HMM-VB (red line in right bottom).

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

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 reconstructed activation and inactivation of MAPK in *E. coli* cells and are analyzing the response function comparing the experiments and computer simulation. MEK or MKP activates or inactivates MAPK, respectively. In our reconstruction system, expressions of MEK, MKP, and MAPK are under regulation of different promoters and expression levels of each protein can be detected by different colors of fluorescent proteins fused to each protein. We could regulate the expression levels using different concentrations of inducers and the activation of MAPK depended on MEK, MKP concentrations. 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, an estimated the kinetic parameters for cell fate decision. Relations between uncertainty (equals spontaneity) and responsiveness (to EGF and NGF) in cell fate decision were being unraveled.

## 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: using novel silica-base fluorescent nano-particles viscosities of the cytoplasm was measured precisely.

Figure.4. Raman spectral dynamics along the differentiation process of MCF-7 cells.

MCF-7 cells differentiates into mammalian grand-like after stimulation with NRG. Rotational changes in the cellular components was detected from the Raman spectra during cell differentiation.

### ***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

中村 由樹      Yuki Nakamura

### ***Visiting Scientist***

渡部 直樹      Naoki Watabe

### ***Assistant and Part-timer***

澤井 年子      Toshiko Sawai