



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

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、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、佐藤、鈴木、中村、廣島、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

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、

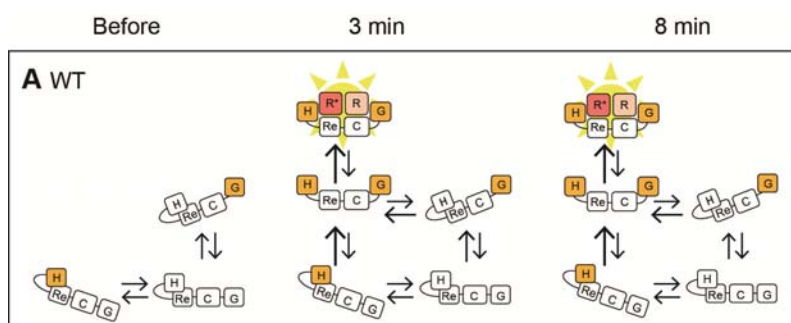


Figure 1. SOS/RAS フィードバックループの制御モデル。SOSのH, G両ドメインが同時に膜結合して初めてフィードバック反応が起こる (Nakamura et al. 2015)。

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、細胞膜で起こる重要な細胞運命決定の初期仮定である。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。

ErbB の活性化は GRB2/SOS 複合体との相互作用を通じて RAS へ伝えられる。SOS と RAS の間には正のフィードバックループの存在が予想されていた。我々は SOS の細胞内 1 分子反応計測により SOS 分子中に複数存在する膜結合ドメインが協調的に機能してフィードバックを制御していることを明らかにした。SOS に含まれるふたつの膜結合ドメイン(H, G)が同時に膜結合して始めて SOS は活性化型 RAS (R*)と相互作用して活性昂進を受ける。(Fig.1; Nakamura et al. BPPB 2016)

また、RAS の下流で起こる ERK 蛋白質の核内移行が自己制御機構を持ち、細胞入力に対して線形に起こる活性化反応を非線形化して on/off 的な核移行を実現することによって、鮮明な遺伝子発現制御を行っていることを明らかにした。(Shindo et al. NatComm 2016; 理研 QBiC 高橋グループとの共同研究)

(2) PAR システムによる細胞極性情報形成

線虫初期胚中で 1 分子可視化計測と蛍光相関分光(FCS)計測を行って、1 細胞期 (受精卵) 細胞表層の後半分に PAR-2 蛋白質が集積する分子機構を解析してきた。計測結果に基づいた数理モデルを構築して、野生型および極性形成異常変異体のモデルの解析し、PAR2 の極性は細胞質と表層の間の PAR2 分子の交換反応が局所的に制御されることによって維持されていることが明らかになった。

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、長峰、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 受容体の構造ダイナミクス計測

ErbB 受容体は 2 量体を形成し、リガンド結合によって構造変化して活性化する。この構造ダイナミクスの詳細を解析するため、ErbB の細胞膜貫通部位とそれに続く膜近傍部位を人工ペプチドとして合成し、ナノメートルオーダーの微小人工膜 (ナノディスク) へ再構成した。膜近傍ドメインの末端には蛍光色素を導入し、ペプチド間の配向・距離変化を 1 分子 FRET 計測する。膜系の作製に成功し、分子間の FRET 信号を得ることができた。少なくとも 3 つの構造が存在するという結果を得ている。

(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いる。分子の両端に蛍光標識を施し、分子内 FRET 計測で構造変化を検出できる。我々

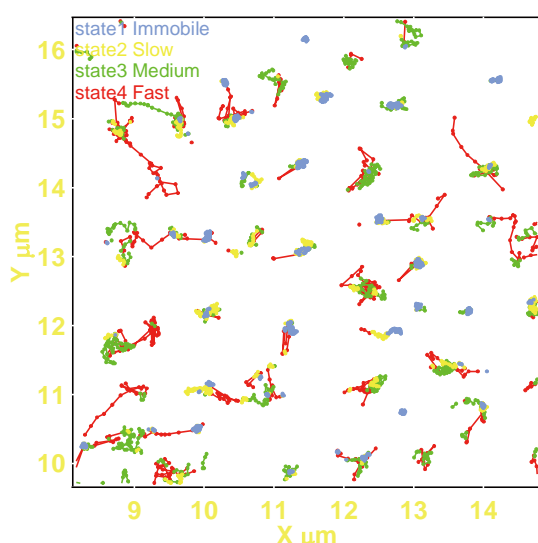


Figure 2. 細胞膜上の mGluR3 の運動拡散係数の違いによって色分けしている。

は、蛍光標識法を改良して高感度計測を可能にし、photon counting histogram 法を使って、細胞質内に浮遊する RAF 分子の構造を一つずつ測定して、構造分布を得ることに成功した。野生型や変異体の RAF の間では構造分布が異なっている。

(3) GPCR の運動・会合・構造変化

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を計測した。GPCR は主要な細胞膜情報処理蛋白質群のひとつである。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。

GPCR に所属する 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。分子間の共有結合により安定な 2 量体を

形成している。我々は mGluR3 の細胞質側を蛍光蛋白質標識し、細胞内の運動・会合を 1 分子計測した。mGluR3 は 2 量体の他にも高次の多量体を形成し、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(Fig. 2)。遅い運動状態ではより大きな会合体を形成している。グルタミン酸などアゴニストの結合により運動状態が変化し、インバーサアゴニストの結合は逆方向の運動状態変化をもたらす。最も遅い運動状態では、クラスリンコーテッドピットとの相互作用確率が上昇する。

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。

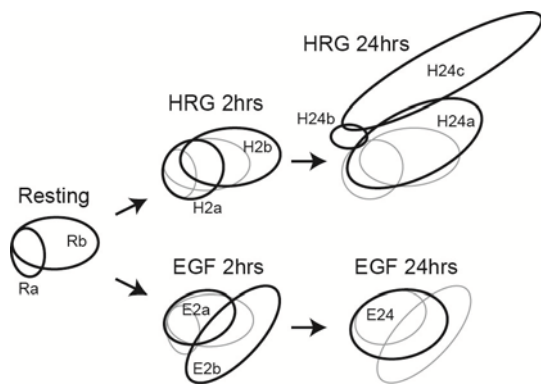


Figure 3. 細胞運命に伴う単一細胞内組成の遷移 Raman スペクトルの細胞間分布を 2 次元表示している。heregulin (HRG), EGF それぞれに対して特徴的な化学組成変化が観察された。

ヒト上皮癌由来の MCF-7 細胞は 4 種の ErbB を発現しており、ErbB3/B4-RAS-MAPK 回路を活性化する heregulin の培地添加によって、乳腺細胞様に分化し、ErbB1-RAS-MAPK 回路を活性化する EGF により細胞増殖促進を起こす。類似の反応回路により異なった細胞運命がもたらされる仕組みは未解明の部分が多い。我々は heregulin, EGF 各々の培地添加直後から 2 時間、および 24 時間後から 2 時間の間の単一細胞 Raman スペクトル変化を計測した。その結果、添加前の細胞が化学組成の異なる 2 つの集団に分化していること、heregulin の添加は化学組成変動を加速し、24 時間後には脂肪成分に富む新たな状態が現れること、それに対して EGF 添加では組成変動は加速されないが、24 時間後には 2 状態が融合した単一状態へ向かうことなど、細胞外信号の違いに応答して

細胞が異なる化学組成ダイナミクスを示すことを明らかにした。(Fig.3; Takanezawa et al. BiophysJ 2015)

4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発および応用研究 (梅木、岡本、佐甲)

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) 新しい 1 分子 FRET 計測法を応用した Holliday 構造のダイナミクス計測

単一蛍光分子対からの光子到達を実時間計測し、隠れマルコフモデル-変分ベイズ法による統計解析から分子の実時間構造変化を再構成する方法を開発し、4 本の DNA が作る Holliday 構造の組み換え運動を計測した。単一 DNA 対の組み換え(0.34 nm)をサブ秒の実時間で計測することに成功し、状態遷移キネティクスを解析して複数の塩基対にわたるジャンプが高頻度で起こることを明らかにした。(Okamoto et al. BiophysChem 2015)

(2) 幹細胞の維持と細胞膜分子の運動性

化学固定された細胞でも幹細胞を維持するためのフィーダー細胞として機能し得ることを明らかにし、その際、膜分子の運動性が保持されていることが重要であることを示した。理研伊藤ナノ医工学研究室との共同研究であり、我々は 1 分子計測による膜分子の運動性評価を行った。(Zhou et al. SciRep 2015)

(3) 蛍光性 GTP アナログの開発

創価大・丸田研究室において新たに合成された蛍光性 GTP アナログである NBD-GTP の機能評価を行った。RAS の様々な変異体の GTP 加水分解反応やエフェクターとの結合反応計測に有用であることを示した。(Iwata et al. JBiochem 2015)

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 ErbB-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. 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 (Arata, Hiroshima, Miyagi, Nakamura, Sako, Sato, Suzuki, 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 ErbB-Ras-MAPK systems which are responsible for cell fate decision into proliferation, differentiation, apoptosis, and even carcinogenesis. Another major target of us is PAR system, which is responsible for cell polarization in various kinds of cells. PAR system regulates morphogenesis in the developmental program.

(1) ErbB-Ras-MAPK system

SOS is a guanine nucleotide exchange factor that regulates cell behavior by activating the small GTPase RAS. Recent *in vitro* studies have suggested that an interaction between SOS and the active form of RAS generates a positive feedback loop that propagates RAS activation. However, it remains unclear how the multiple domains of SOS contribute to the regulation of the feedback loop in living cells. We observed single molecules of SOS in living cells to analyze the kinetics and dynamics of SOS behavior. The results indicate that the histone fold and Grb2-binding domains of SOS concertedly produce an intermediate state of SOS on the cell surface, and that the feedback loop functions during the intermediate state. The concerted functions of multiple membrane-associating domains of SOS governed the positive feedback loop, which is crucial for cell fate decision regulated by RAS. (Nakamura et al. BPPB, 2016)

The phosphorylation cascade in the ERK pathway, which is a downstream of RAS, is a versatile reaction network motif that can potentially act as a switch, oscillator or memory. Nevertheless, there is accumulating evidence that the phosphorylation response is mostly linear to extracellular signals in mammalian cells. We found that subsequent nuclear translocation gave rise to a switch-like increase in nuclear ERK concentration in response to signal input. *In vitro* reconstruction of ERK nuclear transport indicated that ERK-mediated phosphorylation of nucleoporins regulates ERK translocation. A

mathematical model based on these results successfully confirmed the experimental observations. Nuclear translocation accompanied with autoregulatory mechanisms act as a switch in ERK signaling. (Shindo et al. NatComm 2016)

(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. Based on the experimentally obtained reaction parameters, we constructed a mathematical model to explain the asymmetric PAR localization. The model suggests that rapid turnover of PAR molecules between the cytoplasm and cortex realizes bistable formation of cell polarity in nematode zygotes.

Figure 1. Regulation of SOS/RAS positive feedback suggested from single-molecule kinetic analysis. Simultaneous association of H and G domains of SOS is an essential step in the formation of a positive feedback loop between SOS and active form of RAS.

2. Single-molecule dynamics of cell signaling proteins (Hiroshima, Maeda, Nagamine, Okamoto, Sako, Sato, 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) Single molecule measurement of the structural dynamics of ErbB

ErbB requires formation of a specific dimer structure for signal transduction after ligand binding. To investigate the mechanism of ErbB activation in dimers, we constructed a ten nanometer-scale proteo-lipid membrane (nanodisc) including the membrane spanning and juxtamembrane fragments of ErbB1. The cytoplasmic terminus of the ErbB fragment was fluorescently labelled to detect FRET signals between two fragments embedded in a single nanodisc. We succeeded in this reconstruction and detected FRET signals from single FRET pairs. In a preliminary measurement, we have detected the presence of at least three different structures and transitions between them.

(2) Intracellular structural distribution of RAF

RAF is a cytoplasmic kinase regulated by RAS. RAF has two different conformations (open and closed) in relation to its activity. The open form is the active state of RAF and the open/close 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 using the photon counting histogram technique. The structural distributions in the cytoplasm were different between the wild type and mutants of RAF.

(3) Movements and oligomerization of mGluR

We are studying the 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.

The type III metabotropic glutamate receptor (mGluR3) is a GPCR involved in outbreak of schizophrenia. mGluR3 forms stable homodimers through a covalent association at the extracellular domain. Based on single-molecule tracking of mGluR3 tagged with a fluorescent protein, we found that mGluR3 on the plasma membrane forms clusters including dimers and larger oligomers. These clusters were diffusing around on the cell surface in transition among four motional states different in the lateral diffusion coefficient (Fig. 2). Association of the agonists and antagonist, including glutamate, affected the motional states in each specific manner. In the slowest diffusion state, mGluR3 clusters interacted with clathrin coated pits.

Figure 2. Movements of single mGluR3 clusters on the cell surface. Positions of single

clusters with 30-ms intervals were connected and colored according to the transitions of lateral diffusion coefficient.

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. Raman microspectroscopy, allows multi-dimensional, non-invasive, and label-free measurements of the chemical compositions in single living cells.

MCF-7 cells are a human cancer-derived cell line that can be induced to proliferate with addition of an ErbB1 ligand, EGF, while induced to differentiate into mammary-gland-like cells with the addition of an ErbB3/B4 ligand, heregulin (HRG) to the culture medium. We used the Raman spectra of single cells to trace their internal dynamics during the early stages of these growth factor stimulations. Applying a Gaussian mixture model to the major principal components of the single-cell Raman spectra, we detected the dynamics of the chemical states in the absence and presence of EGF and HRG. The dynamics displayed characteristic variations according to the functions of the growth factors. In the differentiation pathway (HRG), the chemical composition changed directionally between multiple states, including both reversible and irreversible state transitions. In contrast, in the proliferation pathway (EGF), the chemical composition was homogenized into a single state. The differentiation factor also stimulated the fluctuations in the chemical composition, whereas the proliferation factor did not. (Takanezawa et al., BiophysJ 2015)

Figure 3. Time evolution and fluctuations in the cellular chemical states

Two dimensional plots of the distributions of the chemical composition of cells under different conditions are compared to show their time evolutions during growth factor stimulations. Black ellipses show the state at the indicated stage. Gray ellipses show the state before the indicated stage.

4. New technologies on optical microscopy and their applications (Okamoto, Sako, Umeki)

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 Holliday junctions

Branch migration of Holliday junction (HJ) DNA in solution is a spontaneous conformational change between multiple discrete states. Single-molecule FRET measurement was applied to three-state branch migration. The photon-based variational Bayes-hidden Markov model (VB-HMM) method, which we have developed previously, was applied to fluorescence signals to reproduce the state transition trajectories and evaluate the transition parameters, such as the transition rates. The upper limit of time resolution suggested in simulation was nearly achieved for the state dynamics with relatively small FRET changes and the distinctions in the populations of different states were successfully retrieved. (Okamoto et al. BiophysChem 2015)

(2) Membrane fluidity of feeder cells for maintenance of iPS cell

We found that suitable chemical fixation did not reduce the cell membrane fluidity and maintain the pluripotency of mouse induced pluripotent stem cells. Membrane fluidity was monitored using single-molecule tracking of GFP-labeled EGFR. (Zhou et al. SciRep 2015)

(3) Novel fluorescent GTP analogue

A novel fluorescent GTP analogue, 2'(3')-O-{6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3- diazol-4-yl)amino)hexanoic}-GTP (NBD-GTP), was synthesized and utilized to monitor the effect of mutations in the functional region of mouse K-Ras. NBD-GTP is applicable to the kinetic studies for small G proteins. (Iwata et al. JBiochem 2015)

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
高根沢 聡太 Sota Takanezawa
永峰 俊弘 Toshihiro Nagamine
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

中村 由樹 Yuki Nakamura

Assistant and Part-timer

澤井 年子 Toshiko Sawai
鈴木 真耶 Maya Suzuki
谷亀 寛子 Hiroko Yagame