

## 佐甲細胞情報研究室

主任研究員 佐甲 靖志 (D.Sci.)



### (0) 研究分野

分科。: 生物

キーワード: 生体膜、受容体、細胞内情報伝達、蛋白質ダイナミクス

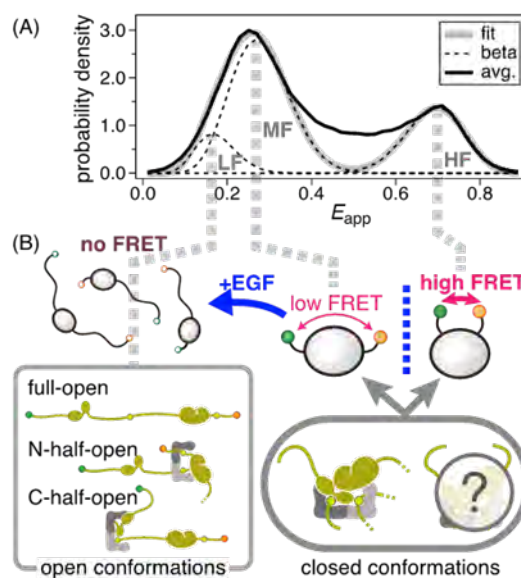
### (1) 研究背景と研究目標

蛋白質分子・分子システム・細胞の各階層において、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。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。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・応用し、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実測し解析する。現在の主要な対象は、細胞膜受容体RTK、GPCRを起点とする細胞内情報処理システムである。これらのシステムで働く個々の蛋白質の分子反応と分子動態の詳細を知り、さらに細胞内における反応ネットワーク動態と細胞応答の関係を明らかにして、細胞運命を決定する情報処理を理解したい。

### (2) 2022年度成果と今後の研究計画

細胞内情報伝達反応蛋白質の構造分布

細胞質内のリン酸化酵素RAFはRASからの情報伝達経路で主要な役割を果たし、発ガンに関わる。RAFは不活性化型の閉状態、活性化型の開状態を持ち、開閉は14-3-3蛋白質との相互作用で制御されると言われているが、詳細は明らかでない。我々は細胞質での1分子FRET計測により、RAFの構造分布を計測した。変異体解析からRAFは少なくとも3状態(low-FRET:LF, medium-FRET:MF, high-FRET:HF)を持つことが明らかになったが、野生型をEGF刺激した後に起こる変化はMFの一部がLFへ移行するのみであり、情報伝達に関わるRAF分子はわずかな割合であった。14-3-3結合部位であるS259, S621, CRDの変異体の構造分布から、MF, HFはいずれも3者が同時に14-3-3に結合した閉状態、LFは14-3-3から解離した完全な開状態の他に二つの結合部位が14-3-3と結合した半開状態が含まれている可能性がある。(Okamoto and Sako, 2022)

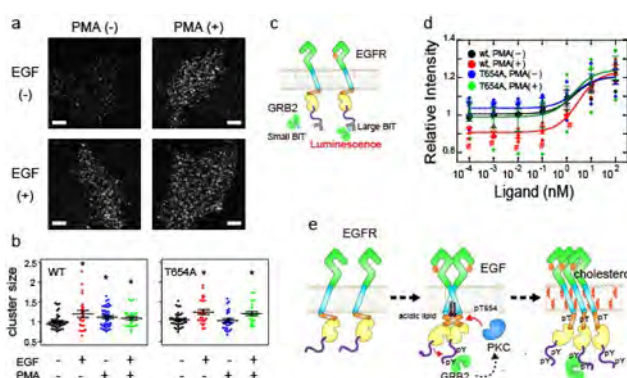


A. RAFのFRET効率分布.. B. 予想される3状態の構造とEGFによる構造分布の変化

細胞膜環境とリン酸化反応の共役による細胞膜受容体の機能・構造制御

上皮成長因子受容体(EGF receptor; EGFR)は、増殖や分化など細胞運命決定に関与するチロシンリン酸化酵素型膜受容体蛋白質の一つである。EGFRの膜貫通領域 (transmembrane; TM) から膜近傍領域 (juxtamembrane; JM) に至るペプチドを人工合成し、TMもしくはJM端に蛍光色素を導入して、様々な脂質組成を持つナノディスク膜 (直径約10 nm) に再構成して、1分子FRET計測による構造解析を行ったところ、酸性脂質を含む膜内ではJM間相互作用による2両体形成が促進されるが、JM領域のT654がリン酸化されると酸性脂質膜中で2量体は不安定化すること、一方コレステロールを含む膜中ではTM領域の相互作用による多量体形成が促進し、JM領域の解離条件は多量体形成をさらに昂進することが明らかになった。生細胞中の1分子観察で全長EGFRの会合状態を計測すると、EGF添加後にT654リン酸化が促進するとと

もにEGFRは会合体を形成し、細胞質蛋白質GRB2への信号伝達反応を起こすことが明らかになった。これらの結果から、EGFによって活性化されたEGFRが、自己組織的なチロシン、スレオニンリン酸化と近傍脂質組成の再構成による分子複合体の組み換えによって、リン酸化酵素活性を示す2量体から、蛋白質間相互作用の足場機能を持つ他量体へと機能転換するというモデルを提唱した。(Maeda et al. 2022)



その他、1個体行動ダイナミクスの高時間分解能・長時間計測記録から、インシュリンシグナル経路が線虫の運動に見られる多重フラクタル性を制御していることを明らかにした(Arata et al. 2022)。また、大阪大学との共同研究により、NF- $\kappa$ Bシグナルにより構成される転写制御のスーパーエンハンサーが転写の不均一性をもたらすこと(Wibisana et al. 2022)や、ストラズブール大学との共同研究により、細胞内ステロールの不均一分布を明らかにする(Yamaji-Hasegawa et al. 2022)などの研究成果を上げた。

**a.** 細胞表面のEGFR-GFP 1分子計測 **b.** 平均分子会合度の細胞間比較 **c.** Nano-bit assayによるEGFRとGRB2の結合計測 **d.** GRB2結合のEGF濃度依存性 **e.** EGFRの活性化・情報伝達モデル。

今後もこれらの研究を継続・発展させる。

### (3) 研究室メンバー

(2022年度)

(主任研究員)

佐甲靖志

(専任技師)

山本明弘

(専任研究員)

荒田幸信、阿部充宏、岡本憲二、永峰俊弘

(研究員)

梅木伸久、柳川正隆、吉澤亮、廣島通夫

(兼務)

(テクニカルスタッフ)

佐藤裕美、中西睦、菅美良、湊原麻衣子、Dong Kesu

(研修生)

桑島佑太朗

(研究パートタイマー)

太田伊津美、豊田宏明

### (4) 発表論文等

1. “Two closed conformations of CRAF require the 14-3-3 binding motifs and cysteine-rich domain to be intact in live cells”, Okamoto, K. and Sako, Y. **J. Mol. Biol.** 435, 167989 (2022).
2. “Threonine phosphorylation regulates the molecular assembly and signaling of EGFR in cooperation with membrane lipids”, Maeda, R., Tamakgaki-Asahina, H., Sato, T., Yanagawa, M., and Sako, Y. **J. Cell Sci.** 135, jcs260355 (1-12) (2022).
3. “Enhanced transcriptional heterogeneity mediated by NF- $\kappa$ B super-enhancers”, Wibisana, J N., Inaba, T., Shinohara, H., Yumoto, N., Hayashi, T., Umeda, M., Ebisawa, M., Nikaido, I., Sako, Y., and Okada, M. **PLoS Genetics**, 18, e1010235 (1-25) (2022).
4. “Insulin signaling shapes fractal scaling of *C. elegans* behavior”, Arata, Y., Shiga, I., Ikeda, Y., Jurica, P., Kimura, H., Kiyono, K., and Sako, Y. **Sci. Rep.** 12, 10481 (1-10) (2022).
5. “A novel sterol binding protein reveals heterogeneous cholesterol distribution in neurite outgrowth and in late endosome/lysosomes”, Yamaji-Hasegawa, A., Murate, M., Inaba, T., Dohmae, N., Sato, M., Fujimori, F., Sako, Y., Grimmel, P., and Kobayashi, T. **Cell. Mol. Life Sci.** 79, 324 (1-19) (2022).

Laboratory Homepage

[https://www.riken.jp/research/labs/chief/cell\\_inf/index.html](https://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_inf/index.html)

<http://www2.riken.jp/cell-info/>