

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・反応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。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、広島)

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。

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が作る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。

今年度は第2層における ErbB の動態、特に細胞膜内の側方運動と分子会合、さらに第3層の細胞質蛋白質 Grb2 への情報伝達反応の関係を、細胞内1分子計測法によって解析した。隠れマルコフモデルを適用した新たな1分子動態解析法を開発し、以下の結果を得た。すなわち、

ErbB1(EGFR)は、速い拡散・遅い拡散・静止の3状態間を秒～サブ秒の時間スケールで遷移している。点在する差し渡し60 nmの静止領域の周辺に150 nmの遅い拡散領域が存在し、それらの間(~300 nm)が速い拡散で繋がれている。どの運動モードにおいても分子はサブ秒で会合・離散を繰り返しており、多くは単量体から4量体を形成している。EGFの結合は静止状態と多量体の増加をもたらすが、Grb2との相互作用は、特に静止状態の3,4量体で頻繁に起こる。ErbB1の活性化は2量体で起こることが従来から言われてきたが、そ

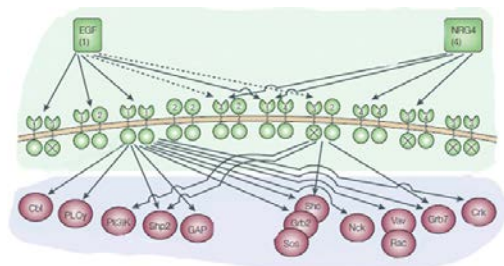


図1. ErbB システムの反応ネットワーク

の後の情報処理・伝達には 3, 4 量体が関与するという新しい結果である。(図 2)

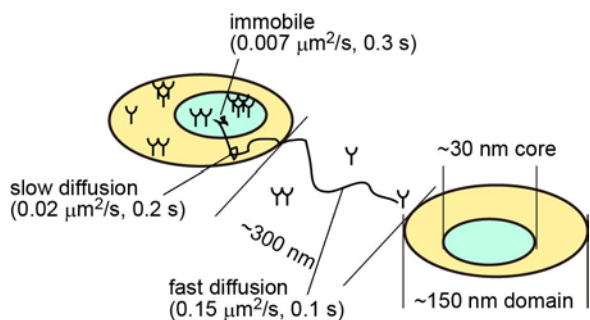


図 2。EGFR の運動モデル

遅い拡散領域は、細胞膜のコレステロールに依存する膜ドメインである。EGFR と Ras の活性化因子 Sos を仲介する細胞質蛋白質 Grb2 との反応は、静止領域にある 3, 4 量体でよく起こる。相互作用頻度だけでなく、個々の相互作用の持続時間が長くなっている。

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(FCS)・蛍光相互相関分光法(FCCS)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。本年度は PI3K の動態を詳細に解析し、p85 と p110 の 2 つのサブユニットが常に安定した複合体を形成していること、それぞれの α , β のサブタイプ間で複合体形成に差がないことが分かった。また、新たに Sos 蛋白質の細胞内動態解析を開始した。

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。Par2 の膜からの解離反応がリン酸化と会合状態の両方で制御されていること、結合反応にも前後軸による違いがあることなどが明らかになり、これらの情報を取り込んだ極性形成モデルを構築している。

2. 細胞内情報処理蛋白質の構造ダイナミクス計測 (梅木、岡本、佐甲、佐藤)

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方法を開発し発表した。この方法は time bin を区切った計測や最尤法推定などの従来法よりも優れていることをシミュレーションで検証し、Holliday junction の 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。

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 (図 3)。リン酸化を模した変異体で構造変化が起こること、このリン酸化部位を認識する Grb2 蛋白質を反応液に混合すると、さらに異なった構造に転移することなどが観察されている。

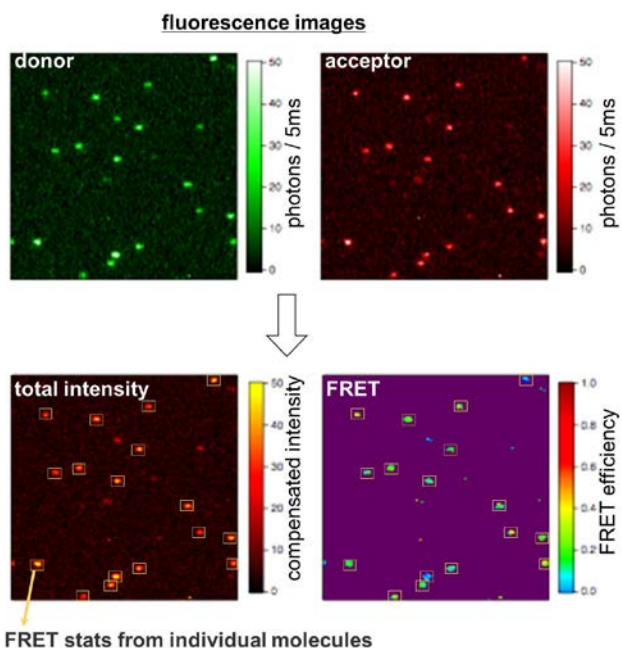


図 3。EGFR 分子認識ドメインの 1 分子構造計測 Donor (Alexa488, 右上)と acceptor (Alexa555 左上)で標識した 1 分子画像から再構成した FRET 画像(右下)

ErbB の下流に位置する RAS およびその効果器分子 RAF は細胞運命決定を司る情報処理分子であるが、RAS においては動的な構造多形の存在、RAF においては分子内結合による開閉など興味深い構造ダイナミクスが予想されている。細胞内の条件と同様な状態の分子を精製し、分子ダイナミクスを再構成系で計測するため、SF9 細胞を利用した蛋白質発現系を立ち上げた。今後人工膜系での詳細な 1 分子反応・構造ダイナミクス計測を行う予定である。

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た。我々の実験条件の範囲（生理的な条件を含むと思われる）では、双安定性は観察されなかったが、分子濃度の変化につれて見かけの Hill 係数が変化することが観察され、理論的説明も与えることができた。

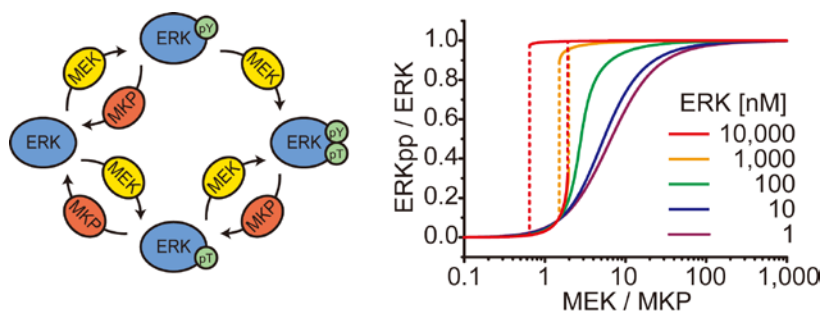


図4 ERKリン酸化の再構成 (左) 再構成した反応回路。MEK, MKPはそれぞれ ERK のリン酸化および脱リン酸化酵素 (右) ERK のリン酸化反応の共同性は、ERK 濃度によって変化する。これは2重リン酸化と0次反応性の両者でもたらされている。

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。増殖・分化・細胞死の確率的運命選択モデルを作製し、単一細胞の自発的および因子応答的な運命選択速度を解析した。細胞は一定環境条件でも常に自発的な運命選択を行っているが、培地中の血清濃度と運命選択の乱雑さに関係があり、血清濃度が低下するほど乱雑さが上昇する。EGF, NGF に対する応答性も血清濃度により変動し、増殖因子(EGF)が分化を促進したり、分化因子(NGF)が増殖を促進したりする条件がある。それぞれの因子に対する応答性（選択速度の上昇）は、適度に乱雑な自発性をもたらす条件で最大値を取ることが分かった。

4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発および応用研究 (岡本、佐甲、高根沢、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と応用研究を行っている。

- (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) 基本性能を検証し学会発表を行った。
- (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、細胞内部状態の多次元・無染色・連続計測を可能にする方法の開発。無刺激、分化または増殖因子を与えた直後、および24時間後の単一細胞スペクトル変動を計測した。それぞれの状態に特異的なダイナミクスが計測され、現在解析中である。
- (3) 細胞膜蛋白質における糖鎖機能を解明するため、同一種蛋白質を糖鎖の違いによって区別して可視化する方法を開発した。糖鎖の違いによって細胞内取り込み速度に違いがあることを見いだした。(糖鎖代謝学研究チームとの共同研究)
- (4) 細胞核内に取り込ませた蛍光蛋白質の運動をFCS測定し、染色質がダイナミックに運動していることを示した。(国立遺伝研、今本研との共同研究)

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 biosignal 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 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, 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 the ErbB-Ras-MAPK system.

In this year, we concentrated on the lateral movements and clustering of ErbB proteins, which are the receptors of extracellular signaling proteins, in the plasma membrane. ErbB1 (EGFR) fused with GFP was observed in single molecules. ErbB1 was moving laterally in transitions among three motional modes; rapid diffusion, slow diffusion, and immobile periods, within seconds to sub-seconds. The immobile areas were often surrounded by the slow-diffusion areas which were connected by the rapid diffusion (Fig. 2). Assembly and disassembly of ErbB1 molecules were observed in all motional modes, as the result, the molecules usually formed clusters from monomers to tetramers. Association of EGF to ErbB1 increased immobile periods and stimulated clustering. Interactions of ErbB1 with Grb2, an adaptor protein that intermediates ErbB1 and mSos, were mainly found for 3 and 4-mers of ErbB1 during the immobile periods. Dimerization of ErbB molecules are thought to be important for activation. Our results newly suggest that clustering larger than dimers takes important roles in signal transduction after activation of ErbB molecules.

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). We analyzed dynamics of PI3K molecules which is a heterodimer between p85 and p110 subunits. Both p85 and p110 have several subtypes including α and β . FCCS measurements revealed that p85 and p110 form firm heterodimers independent of cell signaling, and the subtypes α and β were not distinguished in the heterodimerization.

Using single-molecule imaging and FCS, we measured lateral diffusion coefficients, oligomerization, and association/dissociation kinetics of Par2 molecule fused with GFP and

expressed in a nematode zygote. We found that the dissociation rate constant of Par2 from the cortex is regulated both by phosphorylations and molecular clustering. We also found that the association rate constant of Par2 is different along the a-p axis of the zygote. These phenomena will be incorporated into the reaction model now under construction.

Figure 1. Reaction network of ErbB system.

Figure 2. Lateral movements of ErbB1 along the plasma membrane

The slow diffusion areas depend on cholesterol concentration. Interactions between ErbB1 and Grb2 mainly observed for the 3, 4-mers during immobile periods. Not only the interaction frequency but individual interaction periods were increased.

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

We are examining structural dynamics of cell signaling proteins in single-molecules to understand structural basis of the complex protein reactions. To use single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) measurement of single molecules, we developed a time-stamp (TS) detection apparatus and a new method of data analysis depending on a hidden Markov model (HMM) and variational Bayes (VB) inference (TS-HMM-VB). In simulation, TS-HMM-VB realized more accurate reconstruction of molecular dynamics compared to previous methods such as change point detection and maximum likelihood estimation. Using this method, we succeeded to detect single base-pair movements of a Holliday junction.

The cytoplasmic tail of ErbB1 is a molecular recognition domain between ErbB1 and various cytoplasmic proteins. We are studying structural dynamic of this domain in single-molecules combined with TS-HMM-VB (Fig. 3). A structural change after mimicking a phosphorylation by substitution with acidic amino acid has been observed. Even more, interaction with Grb2 further changed the structure of this phospho-mimic mutant.

RAS and its effector RAF are cell signaling molecules downstream of ErbB to regulate cell fate determination. Dynamic polymorphism has been suggested for RAS molecule, and open/close dynamics was observed in RAF molecule. Planning to detect these structural dynamics of RAS and RAF using reconstitution systems, we are trying to purify these molecules in intact forms using SF9 expression system.

Figure 3. Single-molecule imaging of the cytoplasmic tail domain of ErbB1

Single-molecules were conjugated with Alexa 488 (donor fluorophore; upper left) and Alexa 555 (acceptor fluorophore; upper right) to detect single-pair FRET signal (bottom right).

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 analyzed 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 not find bistability in our experimental conditions (which are thought to include physiological concentrations of proteins), but found changes of the ultrasensitivity depending on ERK concentration. This phenomenon was explained theoretically.

Cell fate decision of PC12 into proliferation, differentiation (into nerve like cells), and cell death is thought to be regulated by the dynamics of ERK activation after growth factor stimulations. In the absence of any growth factors, however, cells spontaneously select the three different cell fates. The selection probabilities of these three fates depended on the condition of cell culture. We constructed a mathematical model for stochastic selection of

cell fates, and estimated the kinetic parameters for cell fate decision. Randomness of the fate decision increased as the decrease of serum concentration in the culture medium. Serum concentration also changed the cellular response to the growth factors. In some conditions, increase of the growth rate by differentiation factor (NGF) and differentiation rate by the growth factor (EGF) were observed. Interestingly, there was an optimum randomness of the spontaneous cell fate decision which gave the maximum response to the growth factors.

Figure 4. Reconstruction of ERK phosphorylation and dephosphorylation (left) Reaction network which we have reconstructed in *E. coli*. (right) The ultrasensitivity of ERK phosphorylation is a function of the ERK concentration. This change is due to dual phosphorylation process and zero-th order ultrasensitivity.

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

In addition to newly developed technologies used in the above projects, we are developing technologies on optical microscopy and finding applications of them as follows: (1) G-APD camera: this camera enables single-photon imaging with 10 ns sampling time. We have reported the fundamental performance of the camera in an international congress (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 succeeded to detect characteristic dynamics of MCF-7 cells under proliferation and differentiation processes. (3) Selective imaging of a specific membrane protein glycoform: Difference in the internalization rate depending on the glycoforms has been detected (in collaboration with Glycometabolome Team). (4) Local nucleosome dynamics: Movements of GFP probe in the nuclear of living cells was measured using FCS to reveal local nucleosome dynamics (in collaboration with National Institute of Genetics and Cellular Dynamics Laboratory).

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
高橋 正裕 Masahiro Takahashi
白 燦基 Chan-Gi Back
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
中村 由樹 Yuki Nakamura

Visiting Scientist

渡部 直樹 Naoki Watabe

Assistant and Part-timer

澤井 年子 Toshiko Sawai