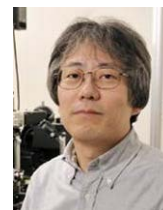


佐甲細胞情報研究室  
Cellular Informatics Laboratory

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
5. 脂質の細胞生物学

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、細胞膜、膜脂質

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 (阿部、荒田、梅木、佐甲、佐藤、鈴木、廣島、宮城、吉澤)

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、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り、細胞運命決定の重要な初期過程である。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。

ErbB1(EGF 受容体)の運動と会合体形成、さらに細胞質蛋白質 Grb2 との相互作用を同時に1分子計測し、EGF 結合後に ErbB1 2量体の運動範囲が一過的に拡張して3量体以上の高次多量体が形成されること、高次多量体が Grb2 との主要な相互作用部位であることを発見した。ErbB の高次多量体の存在は従来から知られていたが、その形成過程や役割が初めて明らかになった。(Hiroshima et al. submitted) さらに、超解像顕微鏡(PALM)を利用した ErbB 会合体および ErbB と膜脂質ドメインの高解像度観察を開始した。

ErbB の下流で RAS を活性化する蛋白質 SOS には、Noonan syndrome (NS) という遺伝病が存在する。NS 変異は SOS の様々な部位にみられ、分子的な発症メカニズムの詳細は明らかでない。SOS の異なるドメインにおける 3 種の NS 変異体の分子動態を生細胞内 1 分子蛍光測定したところ、変異部位に応じて SOS/RAS 反応の異なった段階を促進していることが明らかとなり、細胞内 1 分子計測の反応作用点解析における有用性が示された (Nakamura et al. in revision)。また、RAS のエフェクターのひとつである RalGDS と RAS および RAL の反応キネティクス計測を行い、活性型 RAS の誘起する RalGDS の構造変化が RalGDS の活性化を制御していることを明らかにした (Fig.1; Yoshizawa, Umeki, et al. BPPB 14:75, 2017)。

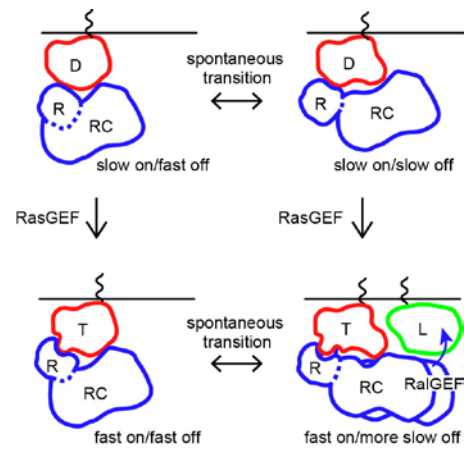


Fig. 1 A schematic model of RalGDS signal transduction: Inactive form of RAS (D) interacts with RalGDS (R+RC), however a conformational change and oligomerization of RalGDS induced by the active form of RAS (T) is indispensable for RAL (L) activation.

## (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計測を行って、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た。前後軸に沿って増加する PAR2 のリン酸化と多量体形成は、いずれも表層からの解離を受精卵後方で前方より遅くする。逆に表層への結合反応速度は後方で速い。計測結果に基づいた数理モデルによって、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。(Fig.2; Arata et al. Cell Rep. 16:2156, 2016)

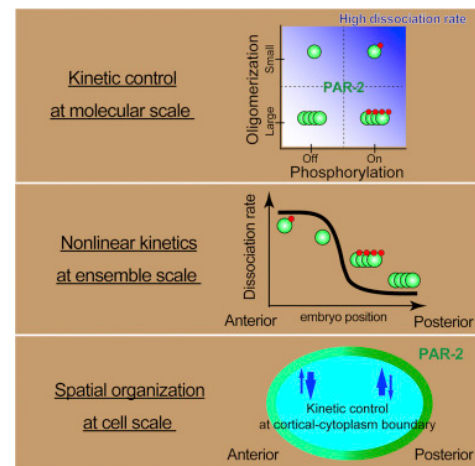


Fig. 2 Cortical control of PAR protein dynamics to maintain cell polarity.

## 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

ErbB1 の膜貫通および膜近傍ドメインをナノディスク膜へ再構成し、2 量体化反応のダイナミクスを 1 分子 FRET 計測している。膜近傍ドメイン間の 2 量体構造が数秒のオーダーで変化していることが観測され、現在詳細なキネティクス計測を行っている。また、ErbB1 の細胞質末端部位は、リン酸化・分子間相互作用ドメインであるが、リン酸化に伴う末端ドメインの構造変化計測も 1 分子 FRET で行っている。

### (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おり、そのダイナミクスは、分子の両端に蛍光標識を施した RAF プローブの分子内 FRET 計測で検出できる。我々は、標識法を改良して高感度計測を可能にし、種々の変異体 RAF 間で細胞質内の分子構造の平均が異なっていることを明らかにしつつある。

### (3) GPCR の運動・会合・構造変化

生細胞表面の 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)の側方拡散運動が計測できる。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。mGluR3は拡散係数の異なる4つの運動状態を遷移していることがわかった。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、インバースアゴニストの結合は逆方向の運動状態変化をもたらす。このような運動変化はmGluR3のみならず、これまでに計測した種々のサブグループに所属する9種のGPCRに共通の性質であることから、拡散運動を指標にした簡便な分子活性化検出の可能性がある。(特願 2017-84803; Yanagawa et al. submitted)

### 3. 細胞運命情報処理の分子機構 (稲葉、佐甲、山本)

細胞分化・増殖・死などの運命決定過程において、個々の細胞の状態がどのように変動しているかを明らかにするために、種々の単一細胞分光・可視化計測に取り組んでいる。

#### (1) NF- $\kappa$ Bの細胞内ダイナミクス計測

免疫系B細胞の成熟過程において、転写因子NF- $\kappa$ Bは抗体刺激強度に対してスイッチ的に応答して核内へ移行し、その後細胞質と核内で振動的な濃度変動ダイナミクスを示す。このようなダイナミクスの生理学的意義を明らかにするため、単一細胞でのNF- $\kappa$ Bの核移行ダイナミクスと遺伝子発現の相関計測を行っている。イメージングにより核移行ダイナミクスの細胞間ゆらぎは、ランダムゆらぎよりもずっと大きいことがわかり、現在はゲノム解析へ向けた光学顕微鏡下での1細胞回収技術の開発に取り組んでいる。

#### (2) RAFの細胞内ダイナミクス計測

RAFの構造変化検出プローブを利用して、単一細胞内のRAF分子構造の時間変動を計測する。RAF分子の平均構造は細胞毎に異なっているが、それがどのようなダイナミクスで変動し、制御されているかは明らかでない。本年度は、長期変動を自動計測するための画像処理アルゴリズム開発を行った。

### 4. 光学顕微鏡を用いた計測技術の開発および応用研究 (小笠、佐甲、新土、廣島、吉澤)

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、種々の単一細胞内での複数反応ダイナミクスの同時計測技術が確立してきたことに鑑み、1細胞内の複数反応時系列を利用して、反応間の制御ネットワーク構造を推定する計算手法の開発を行った。統計的なネットワークと反応パラメータの推定により、シミュレーション実験では2,3要素間の非線形ネットワークによる振動現象などを正しく推定することに成功した。(Shindo et al. submitted)

### 5. 脂質の細胞生物学 (小林、角、富重、牧野、村手)

(1) コレステロール生合成中間体を引き起こすリサイクリングエンドソームの細胞内分布変化  
コレステロール生合成酵素の一つをコードするSC4MOLの変異は、乾癬様皮膚炎や小頭症、発育遅延などの症候群を引き起こす。我々はHeLa細胞において、SC4MOLノックアウトが、その基質中間体の蓄積とコレステロールの微減のほか、リサイクリングエンドソーム(RE)分布変化を引き起こすことを見出している。本年度は、中間体添加とコレステロール低下により、野生型細胞においてREの分布変化を再現することに成功した。また、本アッセイ系により他のステロールについてもRE分布を変化させる活性を評価することが可能になった。

#### (2)細胞膜の脂質分布

細胞膜の基本構造である脂質二重層では様々な脂質分子種が内外層で非対称に分布している。この非対称分布の維持に関わる複数種の脂質転移酵素が知られているが、それぞれの酵素がどの脂質分子種を制御しているかは十分に明らかでない。ホスファチジルエタノールアミン(PE)の分布に関与すると考えられるフリッパーゼとスクランブラーゼをそれぞれ欠損した変異体細胞の細胞膜におけるPEの局在を、SDS処理凍結切断レプリカ標識法を用いて電子顕微鏡レベルで解析し、いずれの変異体細胞においても、PEの内外層比は野生型細胞と大差のないことを明らかにした。非対称分布の維持には他の機構が大きく関与していることが考えられる。

**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. Novel technologies on optical microscopy and their applications
5. Cell biological functions of membrane lipids

**Key Word :**

Biomembrane, Receptors, Single-molecule bioinformatics, Cell signaling, Complex systems, Cell proliferation and differentiation, Protein dynamics, Computational biology, Membrane lipids

**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 biomolecules 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 target of us is an intracellular protein reaction network that called ErbB-RAS-MAPK system. This system is 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 (Abe, Arata, Hiroshima, Miyagi, Sako, Sato, Suzuki, Umeki, Yoshizawa)**

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.

**(1) ErbB-RAS-MAPK system**

Movements of ErbB1 receptors fused with GFP were observed in living cells as well as their molecular clustering and interaction with GRB2 by using single-molecule imaging. The results indicate that EGF, an extracellular ligand of ErbB1, transiently stimulates ErbB1 movements to induce higher-order clustering of ErbB1, and the clusters are the primary sites of signal transduction to GRB2. This work first demonstrates biological importance of the higher-order clusters of ErbB in signal transduction (Hiroshima et al. submitted).

Activation of ErbB induces GDP/GTP exchange on RAS by SOS on the plasma membrane. SOS has various genetic mutations that cause the Noonan syndrome (NS) disease, of which pathological mechanisms are still unclear. We examined behaviors of three different NS mutants of SOS on the cell surface, and specified defects in each mutant at the different points in the process of RAS activation by SOS (Nakamura, Umeki, et al. in revision).

RalGDS is one of the RAS effectors and functions as a guanine nucleotide exchange factor for RAL. We performed a single-molecule fluorescence analysis of RalGDS and its functional domains (RBD and REMCDC) on the plasma membranes of living cells. We infer that RAS activation not merely increases the cell-surface density of RalGDS, but actively stimulates the RalGDS-RAL interaction causing a structural change in RalGDS and/or the accumulation of RAL, as well as the GTP-Ras/RalGDS clusters, to induce the full activation of RAL. (Fig1; Yoshizawa, Umeki, et al. BPPB 14:75, 2017)

## (2) PAR system

The asymmetric localization of PAR polarity proteins is thought to be maintained by excluding cortical PAR proteins that traverse the anterior-posterior polarity boundary via diffusion. However, single-molecule detection technologies in *C. elegans* embryos revealed that most PAR-2 molecules associate and dissociate from the same cortical side. The dissociation rate was asymmetric along the polarity axis and varied with oligomer size and phosphorylation of PAR-2. Unexpectedly, the association rate was asymmetric in a PKC-3-dependent mechanism. The measured in vivo kinetic rates were sufficient to recapitulate polarity maintenance in a mathematical model. These results indicate that the cortical PAR-2 asymmetry is maintained by the local exchange reactions at the cortical-cytoplasm boundary rather than at the cortical polarity boundary. (Fig2; Arata et al. Cell Rep. 16:2156, 2016)

## 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 structural dynamics of ErbB

ErbB requires formation of a specific dimer structure for signal transduction after ligand binding. We constructed a ten nanometer-scale proteolipid membrane (nanodisc) including the membrane spanning and juxtamembrane (TM-JM) fragments of ErbB1. Monomer-dimer transitions at the JM region have been observed and precise kinetic analysis is being carried. We are also measuring single-molecule structural dynamics in the cytoplasmic tail of ErbB, which is the multiple phosphorylation and molecular recognition sites.

### (2) Intracellular structural distribution of RAF

RAF is a cytoplasmic kinase regulated by RAS. RAF has two different conformations (open and closed). The open form is the active state of RAF, and the open/close dynamics 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. The average structure of RAF molecules are varied in each single cell in the resting condition.

### (3) Movements and oligomerization of GPCRs

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. Based on single-molecule tracking of mGluR3 tagged with a fluorescent protein, we detected four motional modes different in the lateral diffusion coefficient. Cluster size of mGluR3 increased in average as the diffusion coefficient decreased. Association of the agonists and antagonist changed the diffusion dynamics to the opposite directions. We found that this phenomenon is common to other 8 species of GPCRs as well as mGluR3, suggesting that effects of chemicals to GPCR activity can be detected by only observing lateral movements of GPCRs. (Jpn. Patent Appl. 2017-84803; Yanagawa et al. submitted).

## 3. Molecular mechanism of cell fate decision (Inaba, Sako, Yamamoto)

To investigate how internal state of cells changes along the pathways of cell fate selection into differentiation, proliferation, and death, we are measuring single cell dynamics using multiple technologies.

#### (1) Single-cell dynamics of NF- $\kappa$ B

Responding to the B-cell receptor stimulation, a translation factor NF- $\kappa$ B shows switch-like and oscillatory dynamics to regulate gene expression for B cell maturation. To reveal the physiological meaning of NF- $\kappa$ B dynamics, we are constructing single cell measurement system of NF- $\kappa$ B dynamics and genome-wide gene expression. Single cell imaging revealed cell-to-cell fluctuation of the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B is far larger than that expected from random distribution.

#### (2) Single-cell dynamics of RAF

As mentioned above, we found a large cell-to-cell deviation of the average conformation of RAF molecules. We are investigating long term dynamics of the RAF conformation in single cells. This year, we constructed an image processing algorithm for automatic measurements of single-cell FRET signal of the RAF probe in single cells.

### 4. Novel technologies on optical microscopy and their applications (Hiroshima, Sako, Shindo, Yoshizawa)

In addition to the newly developed technologies used in the above projects, we are developing various technologies of bioimaging and data processing. This year, we developed a novel computational technology to infer structure and reaction parameter values of intracellular reaction networks based on the simultaneously measured time courses of multiple molecular reactions in the same single cells. We succeeded to analyze non-linear reaction networks composed of 3 reaction nodes. (Shindo et al. submitted)

### 5. Cell biological functions of membrane lipids (Kobayashi, Makino, Murate, Sumi, Tomishige)

#### (1) Redistribution of recycling endosome by a cholesterol intermediate

SC4MOL, one of the enzymes in cholesterol biosynthetic pathway, is responsible for a syndrome that includes psoriasiform dermatitis, microcephaly, and developmental delay. We established and analyzed SC4MOL-knockout HeLa (KO) cells, and found an accumulation of the substrate, a slight decrease of cholesterol, and redistribution of recycling endosomes (RE) in the KO cells. In this year, we showed that a combination of intermediate addition and cholesterol reduction successfully reproduced the RE redistribution in the wild-type cells. This assay system allowed us to evaluate the ability of sterols to redistribute RE in cells.

#### (2) Asymmetric distribution of membrane lipids

While asymmetric transmembrane distribution of constituent lipids in the plasma membrane is maintained by several species of lipid transfer proteins, including flippase, floppase and scramblase, the role of each type of transfer proteins is not fully understood. To clarify the function of these proteins, we employed an immunoelectron microscopy to demonstrate the transbilayer distributions of phosphatidylethanolamine (PE) in the plasma membrane of flippase- and scramblase-deficient *Drosophila* cells and found that the PE distributions are comparable in the mutants and wild-type cells. Our results suggest that these proteins have only a little role in the maintenance of asymmetric distribution of PE in the plasma membrane.

### ***Principal Investigator***

佐甲 靖志      Yasushi Sako

### ***Research Staff***

阿部 充宏      Mitsuhiro Abe  
荒田 幸信      Yukinobu Arata  
稲葉 岳彦      Takehiko Inaba  
梅木 伸久      Nobuhisa Umeki  
岡本 憲二      Kenji Okamoto  
佐藤 裕美      Hiromi Sato  
新土 優樹      Yuki Shindo  
富重 斉生      Nario Tomishige  
永峰 俊弘      Toshihiro Nagamine  
廣島 通夫      Michio Hiroshima  
前田 亮      Ryo Maeda  
牧野 麻美      Asami Makino  
宮城 拓      Hiraku Miyagi  
村手 源英      Motohide Murate  
柳川 正隆      Masataka Yanagawa  
山本 明弘      Akihiro Yamamoto

### ***Students***

吉澤 亮      Ryo Yoshizawa  
角 真里子      Mariko Sumi

### ***Visiting Scientist***

小林 俊秀      Toshihide Kobayashi  
白 燦基      Chan-gi Back

### ***Company-Sponsored Resaercher***

小笠 広起      Hiroki Ogasa

### ***Assistant***

澤井 年子      Toshiko Sawai  
鈴木 摩耶      Maya Suzuki  
豊田 良子      Yoshiko Toyoda