

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01839

研究課題名(和文)細胞内1分子スクリーニングの基盤となる分子の活性化と動態を結ぶメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms linking between molecular behavior and activation as a basis for in-cell single-molecule screening

研究代表者

廣島 通夫(Hiroshima, Michio)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20392087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外の生理活性物質と結合し、主に細胞増殖を促す信号を細胞内に伝える上皮成長因子受容体(EGFR)は、癌をはじめ重篤な疾病と関わっている。しかし、EGFRがどのようなふるまいを通じて細胞応答を調節しているのか、未知の点が多い。本研究では、細胞内での分子のふるまいを可視化する蛍光1分子イメージング法によりEGFRの野生型および癌変異体を計測し、分子の構造や動態の変化を検出することに成功した。この動態には抗癌剤の効果に加え、変異体の薬剤耐性も定量的に反映されていた。さらに、下流のシグナル伝達経路の活性化も多量体形成から読み取れた。これらの知見は1分子計測を用いた新規薬剤スクリーニングの基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の注目する分子を一つ一つイメージングする技術により計測した分子のふるまいから、抗癌剤などの薬剤が分子の活性化に与える影響を定量的に解析できる。本研究では、分子の動態がどのように活性化レベルを反映するか、そのメカニズムの解明に取り組んだ。新しく得られた知見から、1分子解析データには分子の構造や反応だけでなく、細胞膜環境や細胞応答の程度など想定を超える情報が含まれていることが分かった。この計測・解析手法をロボティクスやAIにより自動化し大規模解析を可能とすれば、新規の薬剤スクリーニング法として応用できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR), which transmits primarily cell proliferation signals into cells after binding with an extracellular cytokine, concerns with critical diseases such as cancers. However, how EGFR regulates the cell responses through its molecular behavior remains unrevealed. In this study, we measured EGFR behaviors of both wild type and cancerous mutants by single-molecule imaging in cells and succeeded to detect changes in the molecular structures from the mobilities. Not only effects of anti-cancer drugs on EGFR but also the resistance of mutants against drugs were reflected in the behaviors. Furthermore, the activity of downstream signaling could be read out from the oligomerization of EGFR. The findings in the study will be a basis for a novel drug screening.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子イメージング 細胞内シグナル伝達 薬剤スクリーニング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内での分子の振る舞いを 1 分子レベルで可視化できる 1 分子イメージングを用いた研究から、リガンド刺激によって生ずる細胞膜上の受容体分子の活性化(リン酸化)が、その分子動態(側方拡散)に顕著な変化を及ぼすことが分かってきた。この性質を応用し、計測される分子動態の変化をもとに受容体分子の活性化を感度良く検出できることが、本研究の代表者らにより示されている。従来の活性化計測手法として、生化学的手法によるリン酸化計測や、表面プラズモン共鳴(SPR)などを用いたリガンド結合計測があるが、これらの手法と異なり、細胞を壊したり分子を精製する必要がなく、in vitro ではなく生きた細胞で個々の分子動態の時間/空間情報を含む多様なデータが得られる。さらに、リガンドやアゴニストに依存しない自発的な受容体の活性化や基礎活性も検出可能である。この手法を応用し、分子動態パラメータの変化を活性化の指標とすることで、生体環境に近い状況下での薬剤や細胞の革新的なスクリーニング技術を創出できる。癌をはじめ多くの疾患に対する創薬の代表的な標的分子である EGFR (上皮成長因子受容体)や GPCR (G タンパク質共役型受容体)はいずれも細胞膜受容体であり、この新しく優れた手法が社会的に貢献できる余地も大きいと考えられた。

しかしながら、これら受容体分子の活性化がその動態を変化させるメカニズムについては、全く分かっていなかった。1 分子イメージングを用いた受容体分子の活性化検出法を新たなスタンダードとして確立するには、分子動態と分子の活性化がどのようなメカニズムで結びついているのか、定量的に明らかにしてこの手法の実効性を裏付けすることが求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞膜受容体の活性化が 1 分子動態に反映されるメカニズムを解明することである。1 分子イメージングで計測される分子動態の変化を、活性化のセンシングや定量手法として利用するアイデアは本研究独自のものであるが、さらに薬剤/細胞の選別に応用できるまでに発展させれば、「細胞内 1 分子スクリーニング」という新しい技術領域の創造につながる。それゆえ、この手法の背後にあるメカニズムを明らかにすることは、得られた結果の正確な理解に加え、手法としての信頼性の確保のためにも重要である。

### 3. 研究の方法

シグナル伝達に関わる EGFR 分子のふるまいについて明確な描像を提示するため、蛍光 1 分子イメージングによる大規模計測と分子状態の詳細な解析手法を組み合わせる。今まで不可能であった、分子そのものとその周囲に生じるイベントの時空間ダイナミクスを理解するための計測・解析を行う。また、これら分子の構造/動態/活性化を関連付けた情報を原理的基盤として、EGFR が関与する疾病の治療薬スクリーニングへの応用に役立てる。

蛍光プローブをつけた個々の EGFR 分子を細胞膜上で蛍光観察することで(図 1)、その位置と蛍光輝度の情報がビデオレートで得られる。位置情報からは分子の運動の速さや拡散範囲が計算され、これらには分子構造や細胞膜環境が反映される。一方、輝度情報からは EGFR 分子の会合の程度を知ることができる。近年、隠れマルコフモデル(HMM)と機械学習を組み合わせた解析法により、速さに応じた運動状態の同定や、会合体に含まれる分子数の定量を行い、時々刻々変化する分子のふるまいをより詳細に解析できるようになった<sup>5</sup>。ただし、従来の手作業での 1 分子イメージングで取得可能なデータ量では拡散運動や蛍光輝度の計測誤差のため、イベントに伴う変化を有意に見出せない場合が多かった。そこで我々は、顕微鏡観察時のフォーカス合わせから観察細胞の探索、薬剤添加などの操作に加え、観察後の解析すべてを AI とロボティクスにより自動化したシステム(図 2)を開発して計測の効率化を図り、1 分子イメージングによる大規模計測を初めて実現した(図 3)。その結果、1 日に従来の 100 倍以上となる 8,000 細胞(5,000,000 分子)の計測が可能となっている、人の手を用いた場合より再現性・精度が上がったうえ、データが大量に得られるため、計測誤差の影響を抑えて現象の特徴や変化を正確に捉えられる。本研究では、我々独自の技術である自動化細胞内 1 分子イメージングシステム(Automated in-cell Single-molecule Imaging System: AiSIS)による大規模計測と分子状態の詳細な解析手法、それぞれの長所を最大限に活かし、(1) 分子構造 - 分子動態の相関、(2) 細胞膜環境 - 分子動態の相関、(3) 下流シグナルへの応用、の 3 つの視点から従来の 1 分子イメージングの想定を超えた情報を読み取ることに挑戦した。

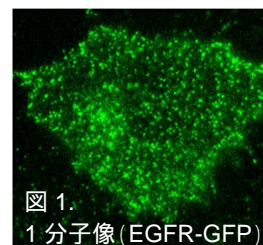


図 1. 1 分子像(EGFR-GFP)



図 2. AiSIS 全景

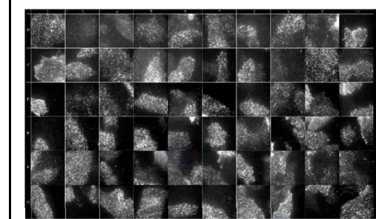


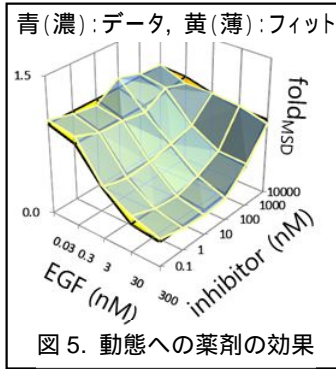
図 3. ウェルプレートでの大規模計測

#### 4. 研究成果

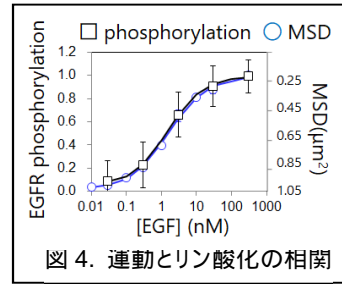
本研究により、下記の新しい知見が得られた。

##### (1) EGFR 分子構造 - 分子動態の相関

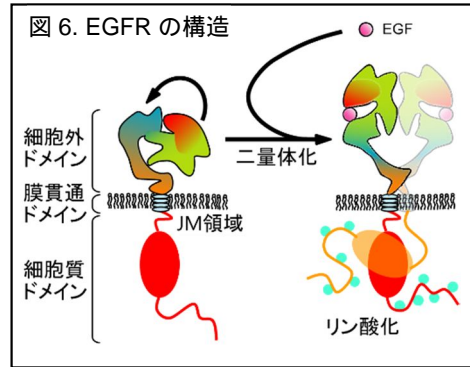
近年の 1 分子研究と我々の結果から、細胞膜上 EGFR の拡散運動の速さはリガンド添加によって低下し、同時に平均二乗変位 (MSD) で表される運動範囲も縮小することが示されている。



いずれもリン酸化阻害剤によって解消するほか、MSD と EGFR リン酸化のリガンド濃度依存性が良く一致する (図 4)。また、MSD のリガンドと阻害剤双方の濃度依存性を示す surface plot をミカエリスメンテン式に基づくモデルでフィットすると (図 5)、リガンド (EGF) と阻害剤 (AG1478) それぞれの 50% 効果 / 阻害濃度 ( $EC_{50}$  /  $IC_{50}$ ) は、2.0nM、8.4 $\mu$ M と求められた。これらは表面プラズモン共鳴 (SPR) や放射性同位体 (RI) 実験によって得られた EGF の親和性、また生化学的手法で求めたリン酸化に対する EGF の  $EC_{50}$  や AG1478 の  $IC_{50}$  と良く一致し、1 分子動態には活性化 (リン酸化) が定量的に反映されることが示された。

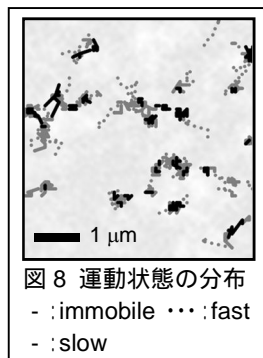
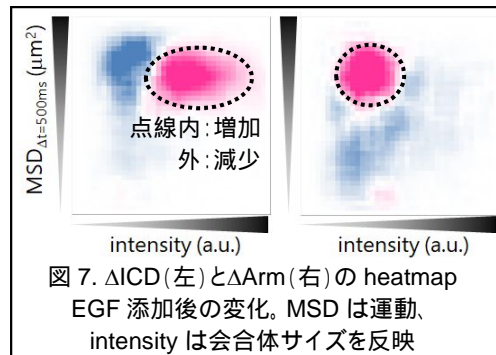


これら EGFR 1 分子の動態変化は、直接的には分子構造に起因すると考えられる。EGFR は細胞外領域でリガンドと結合すると、二量体の細胞内領域では一方の酵素部位が相手側のチロシン残基をリン酸化し、下流分子へシグナルを伝達する (図 6)。そこで、細胞内領域、または二量体を安定化させるアーム構造をそれぞれ欠損させた構造変異体 ( $\Delta$ ICD,  $\Delta$ Arm) を作成し MSD を計測したところ、いずれもリガンド、阻害剤の添加に対し変化を示さなかった。 $\Delta$ ICD には被リン酸化部位がないため当然の結果であるが、 $\Delta$ Arm でも同様であった。一方、MSD と輝度を軸に取り、全輝点から heatmap を作成したところ、 $\Delta$ ICD では、EGF 添加後に分布が輝度の高い側に移動し (図 7) より大きな会合体の形成が示唆された。 $\Delta$ Arm ではほぼ移動しなかったことから、リガンド結合後、アームが関与する細胞外領域の構造変化が、会合体形成を促進するとともに細胞内領域に伝えられ、リン酸化に至るとい過程が明らかになった。



##### (2) 細胞膜環境 - 分子動態の相関

1 分子イメージングで得られるデータに対し、HMM を応用した機械学習を用いて運動の状態や、会合体に含まれる分子数の定量など、より詳細な解析が可能である。我々の研究から、EGFR 分子の運動は fast, slow, immobile の 3 状態に分けられ (図 8)、野生型では fast 状態以外で拡散範囲が制限されており、細胞膜

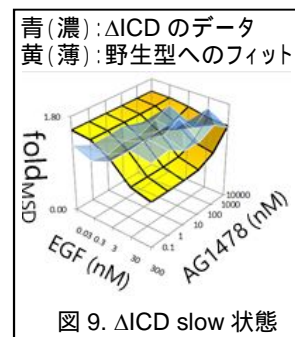


ドメインなどによる囲い込みが示唆された。構造変異体で同様の解析を行うと、全体の解析では EGF 濃度依存性が見られなかった  $\Delta$ ICD において、slow 状態でのみ、野生型とは逆に EGF の濃度上昇に伴って MSD が増加した (図 9)。分子動力学計算 (MD シミュレーション) により、EGF が結合すると細胞外領域が細胞膜から立ち上がることが示唆されており、EGFR と細胞膜との相互作用が変化していると思われる。我々の結果により、生体内で機能している分子における EGFR の細胞外領域の構造変化が、1 分子動態を通じて初めて捉えられた。

slow 状態はリガンド結合に伴い、上述の構造変化を反映して一時的に単純拡散を示すが、その後再び制限拡散に戻り、速さと拡散範囲とも更に小さくなる。この変化は構造変異体では見られないことから、細胞内領域でのリン酸化を反映していると考えられる。EGF の結合によって、会合体中の細胞内領域は互いの位置を変化させることが知られており、拡散運動の抑制に効いていると考えられる。1 分子動態から、細胞内領域における構造変化も捉えられることが示された。

##### (3) 下流シグナルへの応用

EGF 刺激後に形成される immobile 状態の会合体が、直下のシグナル分子と高い親和性を示すほか<sup>1</sup>、この状態への遷移を薬剤処理により阻害すると、細胞応答に関与する下流シグナル分子のリン酸化も著しく低下する。従って EGFR の immobile 会合体は、シグナル伝達におけるハブ的な役割を果たし



ていることが示唆された。またこの結果は、下流のシグナル伝達経路の活性化、ひいては細胞応答の有無まで、細胞膜上の受容体分子の運動性と会合体形成から推し量れることを示唆している。従来、他の計測手法に依存していた情報が1分子動態の解析から得られることから、薬剤スクリーニングに応用した際に得られる評価指標が増え、予測精度の向上を図ることができる。

本研究を通じて、1分子イメージングにより得られた細胞膜上でのEGFRの運動データから、受容体自体の活性化に加え、細胞外/細胞内領域それぞれの構造の変化や、細胞膜との相互作用の変化について読み取れることが明らかとなった。また、多量体サイズのデータを通じて、EGFRを起点とする細胞内シグナル伝達経路の活性化についても知ることができる。このように従来の1分子計測では想定していなかった情報が抽出できたことにより、シグナル伝達に関連するEGFR分子の動態変化が生じるメカニズムについて理解が進んだ。さらにEGFRのシグナル伝達時におけるふるまいについても新たな知見が得られており、本研究の目的はほぼ達成されている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyagi Hiraku, Hiroshima Michio, Sako Yasushi	4. 巻 199
2. 論文標題 Cell-to-cell diversification in ERBB-RAS-MAPK signal transduction that produces cell-type specific growth factor responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosystems	6. 最初と最後の頁 104293 ~ 104293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biosystems.2020.104293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 廣島 通夫	4. 巻 38
2. 論文標題 AIにより実現した細胞内1分子動態の大規模網羅的イメージング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本化学会情報化学部会誌	6. 最初と最後の頁 12 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11546/cicsj.38.12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiroshima Michio, Sako Yasushi	4. 巻 1310
2. 論文標題 In-Cell Single-Molecule Analysis of Molecular State and Reaction Kinetics Coupling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 59 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-33-6064-8_3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroshima Michio, Yasui Masato, Ueda Masahiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Large-scale Single-molecule Imaging Aided by Artificial Intelligence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 69 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfz116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshima Michio, Pack Chan-gi, Kaizu Kazunari, Takahashi Koichi, Ueda Masahiro, Sako Yasushi	4. 巻 430
2. 論文標題 Transient Acceleration of Epidermal Growth Factor Receptor Dynamics Produces Higher-Order Signaling Clusters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1386 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2018.02.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasui Masato, Hiroshima Michio, Kozuka Jun, Sako Yasushi, Ueda Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Automated single-molecule imaging in living cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05524-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanagawa Masataka, Hiroshima Michio, Togashi Yuichi, Abe Mitsuhiro, Yamashita Takahiro, Shichida Yoshinori, Murata Masayuki, Ueda Masahiro, Sako Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaao1917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aao1917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Ryo, Hiroshima Michio, Yamashita Takahiro, Wada Akimori, Sako Yasushi, Shichida Yoshinori, Imamoto Yasushi	4. 巻 122
2. 論文標題 Shift in Conformational Equilibrium Induces Constitutive Activity of G-Protein-Coupled Receptor, Rhodopsin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4838 ~ 4843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b02819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣島通夫、渡邊大輔、上田昌宏
2. 発表標題 Pharmacological Application of Automated Single-molecule Analysis for EGFR Cancerous Mutants
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣島通夫
2. 発表標題 細胞内 1 分子イメージングの自動化と 細胞内シグナル伝達への適用
3. 学会等名 CBI学会2020年大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣島通夫、富重斉生、上田昌宏、小林俊秀、佐甲靖志
2. 発表標題 Regulation of Downstream Signaling by Clusters of Epidermal Growth Factor Receptor
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣島通夫
2. 発表標題 全自動イメージングにより実現した網羅的1分子解析
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会 & シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣島通夫
2. 発表標題 全自動化 1 分子イメージングによる大規模計測
3. 学会等名 CBI学会2019年大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣島通夫
2. 発表標題 In Cell Automated Single-molecule Analysis and Its Extensive Applications
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣島通夫、上田昌宏	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 2
3. 書名 イメージングの選び方・使い方100+, 第4章 超解像顕微鏡「PALM/STORM」	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 オートフォーカス装置ならびにそれを備える光学装置および顕微鏡	発明者 安井真人、廣島通夫、上田昌宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-024408	出願年 2018年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 Method for evaluating activity of g protein-coupled receptor (gpcr)	発明者 柳川正隆、佐甲靖志、廣島通夫、安井真人、上田昌宏、富	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US Patent App. 2018-15/957406	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件



〔その他〕

細胞内1分子自動観察システム「AiSIS」  
[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180926\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180926_1/)  
細胞膜の受容体1分子の動きから薬効を評価  
[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180919\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180919_1/)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------