

平成23年 5月 30日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009~2010

課題番号： 21710122

研究課題名(和文)

高速1分子FRET計測によるEGFR構造変化ダイナミクス計測

研究課題名(英文) Conformational dynamics measurement of EGFR by high-speed single-molecule FRET measurement

研究代表者

岡本 憲二 (OKAMOTO KENJI)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員

研究者番号： 40402763

研究成果の概要(和文)：細胞膜上で情報伝達に関わるEGFR分子の構造変化ダイナミクスを1分子FRET計測を用いて調べる実験系を構築した。EGFR分子の発現精製および蛍光ラベル条件を最適化した。EGFR発現条件が難しく予想以上の時間を費やしたためダイナミクス計測にまでは至らなかったものの、FRET信号を得ることに成功した。また実験データの解析法として、変分ベイズ法に基づいた手法を新たに開発し、精度と時間分解能の向上に成功した。

研究成果の概要(英文)：Single molecule FRET measurement on conformational dynamics of the EGFR molecule, which is related to signal transduction on the cell membrane, has been developed. Conditions for preparation and fluorescence labeling of EGFR were optimized and FRET signals were successfully observed while the dynamics measurements could have not been completed since it had been taken longer time to optimize EGFR expression conditions than initial expectation. A new method of experimental data analysis based on the variational Bayes was also developed, which improved the accuracy and the time resolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：EGFR、単一分子計測、FRET、統計的データ解析

1. 研究開始当初の背景

生体分子は、特定の物質のみと特異的に相互作用したり、1つの生体分子が多様な機能性を

持って環境要因や刺激に応じて挙動を変化させたり等、極めて複雑な振る舞いを見せる場合がある。そういった複雑性の起源は、構造解析や生化学的実験

だけから解明することが困難な場合も多い。そのような場合には、構造変化を伴ったダイナミクスが重要な役割を果たしている可能性がある。したがって、分子構造変化のダイナミクスを正しく理解することが、生体分子の機能性を理解することにつながる。

たとえば、複雑な機能性を示す生体分子の1つに、上皮成長因子 (EGF) 受容体 (EGFR) がある。EGFR は細胞膜上に存在し、EGF 等による外部刺激に反応して最終的には細胞の成長や分化を制御するタンパク分子である。EGF 刺激により活性化された EGFR が細胞内ドメインで結合するターゲット分子の1つに Grb2 がある。特定の条件下で、EGFR は Grb2 との結合と解離を繰り返すが、そのプロセスにおいて、結合速度の Grb2 濃度へのネガティブな依存性やメモリ効果など、興味深い現象が報告された。これらの現象は、単純な化学結合のモデルだけでは説明することはできず、したがって、分子構造変化が何らかの形で寄与している可能性がある。

このような構造変化ダイナミクスを計測するためには、たとえば、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用した単一分子 FRET 計測を用いることができる。単一分子 FRET 計測を用いて分子構造変化を捉える実験は、過去にもおこなわれた例が報告されている。しかし、基本的に単一分子計測においては信号が微弱で S/N 比が比較的 low、計測の精度の向上には大きく余地が残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、高時間分解能の単一分子 FRET 計測法を用い、EGFR の細胞内ドメインにおける構造変化を実時間計測することを目指す。

本研究の目的の1つは、単一分子 FRET 計測実験の方法論を確立することにある。試料に依存せず、EGFR 以外にもさまざまな生体分子の dynamics/kinetics 計測への応用が可能な、汎用的な手法の確立を目指す。また時間分解能を含めた、その計測精度の向上に関するも同時に目指す。

同時に本研究では、EGFR の C-末端ドメインの構造に関して知見を得ることを目的とする。EGFR C-末端ドメインは特定の高次構造をとらず自由鎖様に振る舞うと考えられており、構造変化ダイナミクスはおろか、いかなる構造も決定することは出来ていない。特に、情報伝達プロセス中のダイナミクスに関して新たな知見を得ることが出来れば画期的な成果である。

3. 研究の方法

計測装置には、2基の APD フォンカウンティング検出器および高精度ピエゾステージを備えた光学顕微鏡装置を用い、コンフォーカル・イメージング光学系により、試料走査によるイメージ

ングと特定の分子をターゲットとした時系列計測の両方において単一分子検出感度を実現した。APD 検出器はダイクロイック・フィルタにより波長分離された蛍光をタイムスタンプ方式で同時計測し、FRET 計測を実現した。検出される光子すべての検出時刻を記録するタイムスタンプ方式を用いることで、従来のフォトンカウンティング方式 (CCD カメラも原理的には同じ) と比べて、より情報量の多い信号を得た。

タイムスタンプ検出を駆使した高時間分解 FRET 計測は、本研究以前にはほとんど例がなく、本研究ではまずその手法としての確立を目指した。標準試料を用いた実験により、実験および解析パラメータの最適化等をおこなった。タイムスタンプ信号が持つ情報を最大限有効に活用するためには、情報理論を駆使したデータ解析手法を用いた。単一分子で観察されるダイナミクスは、有限個の状態の間で遷移を繰り返すモデルで表すことが出来る場合が多い点に着目し、実験データから状態遷移の軌跡を復元することを可能にするデータ解析法を用いた。

試料となる EGFR 分子は、同研究室に所属する日比野佳代博士らの協力を得て、発現・精製をおこなった。本研究で着目しているのは、EGFR 分子の細胞内ドメインであり、特にその C-末端にある C-tail 部位である。ここに複数存在する Tyr リン酸化サイトがキナーゼドメインと相互作用するために構造変化が起きると考えられている。そこで EGFR 分子のうち、キナーゼを含む C-末端までの断片、C-tail 部位のみの断片、などを精製した。FRET 計測を可能とするため、構築する分子には2重の蛍光ラベルを施す必要があり、標識する部位やラベル剤に関しては試行錯誤の必要があったが、まずは両端への色素修飾を試みた。また、コンフォーカル光学系による時系列計測をおこなうためには、分子を基板に固定する必要があった。そのため、biotin-avidin 結合や抗原-抗体反応を実現するタグの標識も検討し、試みた。タンパク分子の活性、FRET 効率等を確認しながら、ラベリングの組み合わせの最適化をおこなった。

単一分子構造変化ダイナミクスの FRET 計測は、上記の装置と2重ラベルした分子を用いて、*in vitro* 系でおこなった。分子は溶液中でガラス基板上に固定した。コンフォーカル・イメージングで分子の分布を確認した後、個別の分子に焦点を固定してタイムスタンプ信号を得た。一定の条件下で時間変化する FRET 信号から、分子構造変化の大きさや時間スケールの解析をおこなった。

4. 研究成果

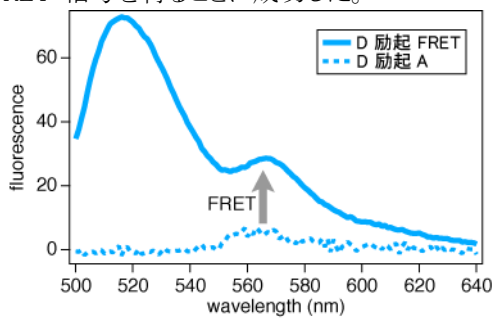
(1) タイムスタンプ計測蛍光顕微鏡装置の検証: ドナー-アクセプタ間距離の異なる複数の二重ラベル二重鎖 DNA 分子を用意し、装置が十分な FRET 検出能を有することを確認した。また、量子ドット試料の発光を、タイムスタンプ計測法およびデータ解析法の組み合わせにより解析し、当面の目標であった、ミリ秒以下の時間分解能が達成されたことを確認した。

(2) EGFR 分子の構築: 本研究では特に EGFR 分子の細胞内ドメインに着目するため、細胞内キナーゼドメインから C-末端まで、および、C-末端近傍の

C-tail ドメインを切り出した分子を用意した。設計通りの EGFR 分子を発現・精製条件の最適化は予想していたより難しく、当初の予定以上の時間を要した。具体的には、まず、大腸菌を用いた発現系で精製を試みたが、発現された EGFR 分子の断片化が起き、設計した全長のタンパク分子を得られる収率を上げるのが困難であった。また、哺乳類細胞を用いた発現系では、断片化の影響は抑えることができたものの、収率を上げるのが困難であった。最終的に、小麦胚芽を用いた発現系を用いることで、断片化を抑えつつ収率を上げることに成功し、発現・精製条件の最適化をおこなうことができた。

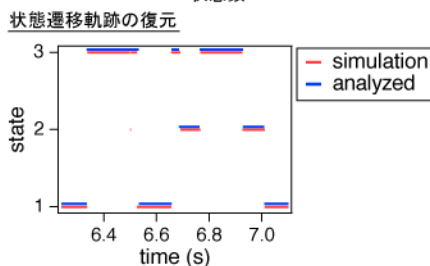
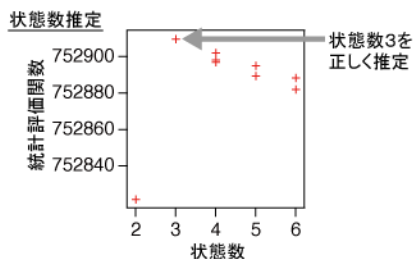
(3) EGFR 分子の蛍光ラベル:FRET 計測実験を実現するためには、分子上の特定の2カ所に異なる色素分子を標識する必要がある、かつ、1分子レベルの構造変化ダイナミクスを阻害しないためには標識分子 (の少なくとも一方) の分子量は小さく抑える必要がある。それらの条件を検討した結果、ドナーとしては、アミノ反応基付きの有機色素分子を用いることとし、EGFR 分子の N-末端に修飾することとした。また、ドナーとして量子ドットを用いる構成にも対応できる設計とした。

アクセプタとしては、ReAsH 色素分子およびチオール反応基付き有機色素分子等を検討した。ReAsH 分子は、tetracysteine タグに特異的に結合する性質を持つ。そこで、EGFR 分子の C-末端に tetracysteine タグを付加することで、ReAsH ラベル可能とした。しかし、実際に試してみたところ、結合の特異性や効率に問題があることが分かった。次に、C-tail ドメインに内在する Cys 残基にチオール反応基付き有機色素分子を修飾することとした。その結果、FRET 信号を得ることに成功した。



2重蛍光ラベルした EGFR 分子の FRET 信号

(4) データ解析法の開発: 単一分子 FRET 実験データを対象とした、隠れマルコフモデルと変分ベイズ法に基づいた新たな解析法を開発した。単一分子信号は有限個の状態の間の連続的な遷移で表すことができるとの仮定に基づき、時系列データの各点をいずれかの状態に割り当てる解析をおこなう。隠れマルコフモデルを用いることで、そのような解析を実現する。隠れマルコフモデルの最適化して解くために、変分ベイズ法を用いる。変分ベイズ法は、モデル選択に優れている特徴があり、実験データから状態数を正確に推定する。

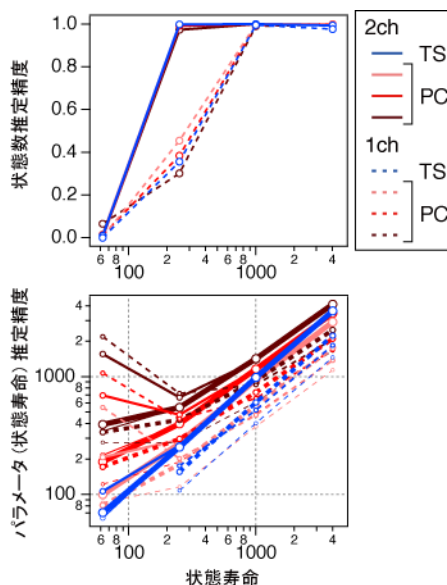


隠れマルコフモデル+変分ベイズ法による状態数推定と状態遷移軌跡の復元

計算機上のシミュレーションによって生成したデータを用いることで、開発した解析手法の性能評価をおこなった。

- ① タイムスタンプ信号を扱う従来法 (change point detection 法) との比較
- ② タイムスタンプ信号とフォトンカウンティング信号との比較
- ③ ドナー光のみ検出する場合と、2色の蛍光強度比を比較する場合での比較

をおこない、新たな解析手法の有用性を確認した。



シミュレーションで生成したデータを用いた解析手法の性能評価

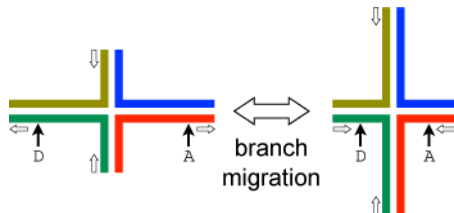
これにより、分子構造の状態遷移をより高速かつ精密に追跡することが可能となった。

(5) Holliday junction を用いた検証実験: 単一分子 FRET 時系列計測では、データ解析を含めて、その性能を評価することが難しい。その理由の1つは、標準試料が存在しないことにある。単一分子レベルで

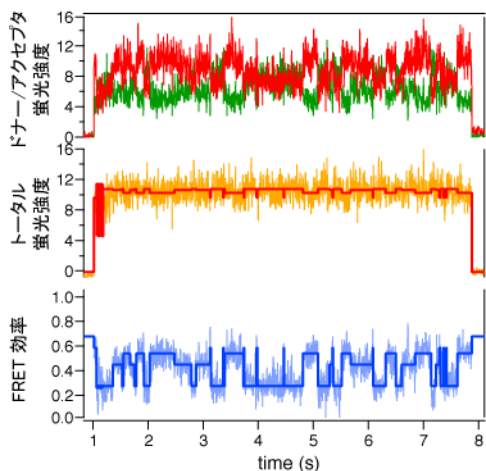
離散的な構造変化を示し、状態数が既知であり、構造およびダイナミクスが安定していて FRET 効率や時定数の再現性が高いことが求められるが、それらの条件を満たし、かつ取り扱いが簡便な試料はこれまで知られていなかった。

本研究では、標準試料として Holliday junction (HJ) を導入した。HJ は4つの DNA 分子で形成される十字構造で、生体内では相同組み換えなどの過程で形成される。HJ の交差点は branch migration と呼ばれる過程で移動することができ、これにより遺伝情報の組み替えが実現される。この時の構造変化は塩基単位で起きるため、離散的な構造変化が起きる。branch migration は *in vitro* でも起きるが、その範囲は塩基配列が相同的な領域に限られる。すなわち、塩基配列を工夫することで、状態数を設計することができる。また、HJ 構造は Mg^{2+} イオンで安定化される性質があり、 Mg^{2+} 濃度によってダイナミクスの時定数を制御することもできる。これらの特徴を総合すると、HJ は 単一分子 FRET ダイナミクス計測の標準試料として極めて適当な性質を備えていることが分かる。

そこで、本研究の一端として、HJ 構造変化ダイナミクスの単一分子 FRET 計測をおこなった。その結果、離散的に変化する構造変化ダイナミクスを検出することに成功した。また、上記の隠れマルコフモデル+変分ベイズ解析法を適用し、状態遷移軌跡を復元することで、解析法の検証をおこなうことができた。



Holliday junction の branch migration



Holliday junction の branch migration の単一分子 FRET 計測データに解析手法を適用した結果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 岡本憲二、佐甲靖志、Holliday Junction の自発的 Branch Migration のタイムスタンプ 1 分子 FRET 計測、日本生物物理学会 第 48 回年会、2010年9月21日、仙台
- ② 岡本憲二、佐甲靖志、単一分子ダイナミクスの実時間観察を可能にする 2 チャンネル同時タイムスタンプ計測、日本生物物理学会 第 47 回年会、2009年11月1日、徳島

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 憲二 (OKAMOTO KENJI)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員

40402763

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

日比野 佳代 (HIBINO KAYO)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員

40435673