

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440088

研究課題名(和文)EGFR天然変性ドメインの構造変化ダイナミクスの1分子FRET計測

研究課題名(英文)Single-molecule FRET measurement of structural dynamics of intrinsically disordered domain in EGFR

研究代表者

岡本 憲二 (Okamoto, Kenji)

国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・専任研究員

研究者番号：40402763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子受容体の天然変性C-末端ドメインのみ断片化した分子(EGFR-CT)を用いて試験管中1分子FRET計測実験をおこない、構造変化ダイナミクスの測定を試みた。イメージング実験では天然変性の構造揺らぎを直接捉えることができなかったが、FRET分布が溶液条件(イオン強度)に依存して変化することが分かった。そこで拡散分子のバースト計測により溶液条件への依存性を調べたところ、イオン強度より変性剤濃度に強く依存してFRETが変化する結果を得た。天然変性蛋白質では一般的に電荷相互作用が構造に影響すると考えられるが、EGFR-CTではむしろ局所的な2次構造形成が重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Structural dynamics of the intrinsically disordered C-tail domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR-CT) was investigated by in vitro single-molecule Foerster resonance energy transfer (FRET) measurements using fragment molecules of EGFR-CT. Although imaging experiments could not directly capture very fast structural fluctuation of the intrinsically disordered protein, it detected changes of the FRET distribution dependent on solution condition (ionic strength). Then FRET distributions of diffusing molecules were acquired by burst measurements to investigate dependence on solution conditions. It was found that FRET was dependent rather on denaturant concentration than on ionic strength. The results suggest that the structure of EGFR-CT is principally determined by locally formed secondary structures while structures of intrinsically disordered proteins are generally thought to be affected by charge interactions.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測 FRET 天然変性蛋白質 分子構造変化ダイナミクス 上皮成長因子受容体分子

## 1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子 (EGF) 受容体 (EGFR) 分子は、EGF をはじめとするリガンドに特異的に反応して細胞内に信号を伝達する代表的な MAP キナーゼ分子である。EGFR は細胞膜上で 2 量体 (あるいはその複合体である多量体) を形成し、細胞外ドメインに EGF が結合すると、細胞内ドメインで自己リン酸化を起こす。チロシン等いくつかのアミノ酸は、リン酸化により Grb2 をはじめとするアダプター分子への結合活性を得て、下流への信号伝達を担う。

2007 年には森松らが、細胞膜断片を用いて EGFR と Grb2 との結合-解離キネティクス of 1 分子観察実験をおこない、結合反応において Grb2 濃度への非線形的な依存性やメモリ効果が現れることを見出した [Morimatsu *et al.*, *PNAS*, 2007]。これらの現象を説明するためには、EGFR 細胞内 C-末端ドメインの構造変化ダイナミクスを考慮する必要があり、構造ヒステリシス (たとえば、Grb2 の結合によって誘起された構造変化が Grb2 解離後もしばらく持続するなど) のような非線形現象の存在を示唆する結果であった。

しかし、EGFR の細胞内 C-末端ドメインは高次構造をとらない天然変性状態と考えられており、そのダイナミクスに至っては、まったく知見が得られていなかった。

そこで、EGFR の C-末端ドメインのみの断片分子を用いた 1 分子 FRET 計測実験をおこなってきた。FRET 分布の計測により、リン酸化により顕著な FRET 分布の変化 (構造変化) が検出され、溶液中に Grb2 を添加することでさらに構造が変化する結果が得られた。また、Grb2 結合-解離の繰り返しがサブ秒-数秒程度の時定数で起きると考えられるのに対して、それよりはるかに長い ~30 分にも及ぶ時間スケールで構造転移が生じていることを示す結果も得られた。

これらの構造変化について、その詳細 (構造変化の部位や構造、EGFR の信号伝達・処理機能に果たす役割) はまったく分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、EGFR 分子の細胞内天然変性 C-末端ドメインの、Grb2 による構造転移の実態を明らかにすることを目的とし、(1) 構造転移する条件や時定数、(2) 構造部位や、変化を起こす前後の構造の詳細、(3) 構造緩和過程、(4) 他のアダプター分子との反応、等の点について明らかにし、最終的には、EGFR 分子の信号制御機構おける役割 (の一端) を解明することを目指した。

特に、以下の 3 点について注目した。

### (1) EGFR の信号制御機構の解明

EGFR は細胞膜上であって、外部からの刺激

に対する細胞反応の入り口として、分子レベルで複雑な信号制御をおこなっていることが知られている。信号の上流であるリガンド分子、および、下流に結合するアダプター分子、それぞれに複数種の分子と作用し、信号の整流をおこなっている。また外部刺激への感度、あるいは下流へ流す信号量を調整するはたらきも担っていると考えられている。しかし、その分子レベルでの信号制御機構については不明であり、本研究での一端を明らかにすることを旨とした。

### (2) タンパク質ダイナミクス

森松らが示した結果は、EGFR が分子単体で (あるいはダイマーで) メモリ効果のような非線形現象を駆使して、複雑な信号制御を担っていることを示唆するものであった。

森松らの実験では細胞膜断片が用いられたため、Grb2 と反応した EGFR はダイマーを形成した全長分子であり、かつリン酸化された状態であったと考えられる。しかし、EGFR-CT 断片分子で同様の現象が確認されれば、1 分子内の 1 ドメインの作用だけで構造ヒステリシスやメモリ効果のような非線形現象を司っており、本質的にダイマー形成や分子全体すら必要でないことが示されることになり、タンパク質科学にとって画期的な成果となる。それを明らかにすることも目的の 1 つとした。

### (3) 天然変性タンパク質分子の機能・ダイナミクスの解明

天然変性タンパク質は、近年注目を集め広く研究されているものの、高次構造をとらない分子であるため、実験手法が限定され、具体的なダイナミクスや他の分子と相互作用するメカニズムについて、ほとんど理解が進んでいなかった。本研究により、天然変性タンパク質分子の具体的なダイナミクスや機能発現メカニズムについて計測手法を確立し、知見を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

EGFR C-末端ドメイン断片分子 (EGFR-CT) を対象とし、構造変化ダイナミクスと結合-解離キネティクスとの相関関係を明らかにするために、主に *in vitro* の 1 分子計測実験をおこなった。

### (1) 計測装置

2 種類の 1 分子 FRET 計測が可能な顕微鏡装置を実験内容に合わせて使用した。

全反射照明 (TIRF) 型顕微鏡: EM-CCD あるいは sCMOS カメラによる 2 色同時イメージングにより、多数の分子のキネティクス/ダイナミクスを高スループットで同時に計測できる。

コンフォーカル顕微鏡: 2 基の APD 検出器を備え、低バックグラウンドのフォトンカウ

ンティング検出により、個別の分子から精密・高時間分解能の時系列計測ができる。試料走査によるイメージングに加え、溶液中の拡散分子を対象とした蛍光バースト計測により分子単位の FRET 分布の計測ができる。さらに、FRET のドナー色素とアクセプタ色素の励起光を高速で切り替えることで FRET 分布から褪色した分布の影響を取り除くことができる交互レーザー励起 (ALEX) 計測法を実現することもできる。

## (2) 試料

EGFR-CT は天然変性であり、Grb2 への結合サイトとなるチロシンもこのドメイン内に存在する。この EGFR-CT を大腸菌を用いた系で発現・精製した。その際、FRET 計測のための 2 重蛍光ラベルを導入するためのシステイン、精製および固定のための His<sub>6</sub> タグを導入しておく。

天然型 (WT) 分子の他、Grb2 結合サイトのリン酸化の影響を調べるため、チロシンをグルタミン酸で置換した疑似リン酸化変異体 (PM) 分子も用意した。

*in vitro* で 1 分子イメージング実験をおこなう際には、EGFR-CT 分子はガラス基板上に固定する。そのために従来は、基板表面のブロック剤とともに、抗体を 2 段階に介して基板表面に吸着させる手法を用いた。

## (3) Grb2 による構造転移の観察

予備実験で、EGFR-CT の WT 分子と PM 分子では FRET 分布 (分子構造分布) が異なること、また、WT 分子では溶液中に Grb2 が存在してもその構造に影響がない一方、PM 分子では Grb2 濃度が高い場合にさらに構造変化が起きる結果が得られていた。

本研究ではまず構造変化ダイナミクスの詳細を明らかにするために、実験条件を変えながら構造転移の様子を観察し、溶液中の Grb2 濃度条件で構造転移ダイナミクスがどのように変化するか、構造変化の時定数を定量的に評価、構造変化に実験条件に応じたどのような特徴や傾向が見られるか、などの点を明らかにする。

## (4) 構造変化部位の特定

FRET 計測では、色素間距離という 1 次元情報から分子構造全体を推定する必要がある。したがって、FRET が変化した場合に、構造が変化したことは言うことができても、具体的に分子のどの部位がどのような構造変化を起こしたか、正確に言い当てるのが難しい場合が多い。そこで、FRET ラベル位置の異なる EGFR-CT 分子を用意して上記と同様の計測をおこない、それらの結果を比較することで、構造変化部位や変化の前後の構造情報について絞り込む。

## (5) 構造変化緩和過程の観察

予備実験により、溶液中への Grb2 添加に

よって引き起こされる構造転移は数十分の時間スケールと考えられ、逆に、Grb2 が解離した後の緩和過程も遅い時間スケールであることが予想された。溶液交換により Grb2 を除去することで、緩和過程の構造転移を観察し、結合過程の結果と比較する。

## (6) Grb2 以外のアダプター分子での観察

EGFR-CT ドメインには、Grb2 以外のアダプター分子が結合するサイトも複数存在している。異なる分子への応答を調べ、Grb2 の場合と比べることで、反応ダイナミクスのより詳細な情報が得られる。その他のアダプター分子としては、たとえば Shc 等がある。

## (7) EGFR の信号制御機構の考察

上記のような実験で得られた知見をまとめ、EGFR-CT 分子が Grb2 と結合することによって誘起される構造変化ダイナミクスと、EGFR 分子の情報処理機構との間の関係を考察する。

## (8) 天然変性部位のダイナミクスの考察

EGFR-CT ドメインは天然変性であると考えられており、その高次構造や構造変化に関する知見はこれまで得られていない。上記のような実験で得られた知見をまとめ、EGFR-CT に関して、天然変性であることに由来する機能性について考察する。

## 4. 研究成果

### (1) ガラス基板処理法の確立

研究計画に従って EGFR-CT 分子の構造変化ダイナミクスの計測を進めていく中で、予備実験で採用していた 1 分子計測データの中に、ガラス基板表面との非特異吸着により構造変化ダイナミクスに影響を受けている分子が含まれている可能性があることが明らかになった。そこでまず、ガラス基板の表面処理法を改善することとした。これまでの吸着性のブロッキング剤によるブロッキングに替え、ポリエチレングリコール (PEG) を化学結合させる方法を用いることにした。同時に、分子のガラス基板への固定法を、2 次抗体を基板表面に吸着させる方式から、PEG の一部 (1%程度) にビオチン修飾されたものを混在させ、アビジンとビオチン付きの His-タグ 1 次抗体とを介して固定する方式へと変更した。PEG を用いた基板表面修飾法はすでにさまざまな方式が提案されているが、ブロッキング効率の高い方式を選定するために複数のプロトコルや試薬を試み、コンタミを減らすためのプロトコル最適化などをおこなった。その結果として、十分なブロッキング性能を実現する基板表面処理法を確立することができ、以下の実験で *in vitro* で分子を固定する際に使用することとした。

### (2) 1 分子 FRET データ解析法の確立

フォトンカウンティング検出器を備えたコンフォーカル顕微鏡装置と変分ベイズ-隠れマルコフモデル解析法を用いた1分子FRET実験をおこなってきた。ホリデー・ジャンクション DNA を対象として1分子FRET計測実験をおこない、離散的な分子状態を識別し、状態遷移ネットワークを再構成することに成功した。この成果を *Biophysical Chemistry* 誌に発表した。これらの手法が、研究計画で予定されていた高精度のダイナミクス計測を実現するものであり、EGFRの構造変化ダイナミクス計測においても有効であることが確認できた。

### (3)Grb2 結合-解離キネティクスの1分子イメージング実験

*in vitro*で固定されたEGFR-CT分子とGrb2との結合-解離キネティクスを計測する1分子イメージング実験をおこなった。従来はEGFRとGrb2が自発的に結合-解離の平衡状態に至り、Grb2結合サイトのチロシン残基がリン酸化されることで結合反応が促進されると考えられていたが、この実験では結合反応を有意に検出することができなかった。結合反応には、従来は考えられていなかった条件が必要とされる可能性が明らかになった。

### (4)EGFR-CT 分子の構造変化ダイナミクスの1分子FRETイメージング実験

高感度のsCMOSカメラ、および、カメラの半分ずつの視野に2色の蛍光像を分割して投影するW-viewシステムを装備した顕微鏡システムを用いて、*in vitro*で固定されたEGFR-CT分子の1分子FRETイメージング実験をおこなった。FRETの時間変化を調べたが、構造状態の間での遷移ダイナミクスは確認されなかった。これは、構造状態の遷移が起きていないか、または観察の時間スケールが遷移レートとずれているために検出できていない可能性が考えられる。天然変性蛋白質では非常に速い構造揺らぎが生じていると考えられており、イメージングの時間分解能では平均化された分布としてしか検出できない。EGFR-CT分子ではそのような高速の揺らぎの他にサブ秒程度の時間スケールでの構造転移があることが期待されていたが、本実験ではそれを確認することはできなかった。EGFR-CT分子の構造と機能との相関についても調べるため、溶液中にGrb2分子を加えて同様の実験をおこなったが、FRETダイナミクスに有意な変化を検出することはできなかった。

これまでの実験で、当初想定していた、EGFR-CTのイメージング時間分解能範囲内で生じる構造変化ダイナミクス、および、EGFR-CTとGrb2との結合反応などについて検出することができなかった。そのため、その先に予定していた実験計画から計画を変更し、まずはEGFR-CTの基本的な構造情報を得

る方針に変更した。

### (5)EGFR-CT 分子構造の溶液条件への依存性の1分子FRETイメージング実験

天然変性蛋白質は電荷性アミノ酸を多く含み電荷相互作用が構造に影響していると考えられる点に着目し、溶液に塩化カリウムを添加して1分子FRETイメージングをおこなうことで、高速で揺らぐEGFR-CT分子の時間平均された構造分布が溶液条件(イオン強度)に依存してどのように変化するかを計測した。その結果、WT分子とPM分子との間でFRET分布に差が見られ、PM分子の方がより開いた構造をとること、溶液のイオン強度が増すことでPM分子の方が大きなFRET変化を示すことなどが分かった。

### (6)EGFR-CT 分子構造の溶液条件への依存性の1分子蛍光バーストFRET計測実験

実験手法として溶液中拡散分子の1分子バーストFRET計測を用いて、EGFR-CT分子構造の溶液条件への依存性を計測する実験をおこなった。バースト計測では、固定分子のイメージングと比べて、より多くの分子からFRET分布を再構成することができ、より本来の分布に近い構造情報を得ることができる。また交互レーザー励起(ALEX)法を導入し、蛍光色素が褪色した分子からの影響を取り除いてFRET分布を得ることに成功した。

溶液中に塩化カリウム、変性剤(グアニジン塩酸塩、尿素)を添加して計測をおこない、それぞれの濃度変化に対するFRET分布の変化を検出することに成功した。その結果、イオン強度の変化ではFRETに大きな変化が見られない一方で、変性剤濃度が上がるとFRETが大きく下がること分かった。EGFR-CTでは電荷相互作用よりむしろ局所的な2次構造形成が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これは一般的な天然変性蛋白質の性質とは異なっており、これがEGFR-CTの機能発現において重要な役割を担っている可能性がある。

### <引用文献>

Miki Morimatsu, Hiroaki Takagi, Kosuke G. Ota, Ryo Iwamoto, Toshio Yanagida, Yasushi Sako: "Multiple-state reactions between the epidermal growth factor receptor and Grb2 as observed by using single-molecule analysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 104, pp.18013-18018, 2007.

### 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1件)

Kenji Okamoto, Yasushi Sako: "State transition analysis of spontaneous

branch migration of the Holliday junction by photon-based single-molecule fluorescence resonance energy transfer,” Biophysical Chemistry, vol. 209, pp. 21-27, 2016. doi:10.1016/j.bpc.2015.11.004, 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

岡本 憲二、佐甲 靖志、EGF 受容体 C-末端天然変性ドメインの 1 分子 FRET 計測、第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年 9 月 20 日、熊本大学黒髪北地区(熊本県・熊本市)

Kenji Okamoto, Yasushi Sako, “Single-molecule FRET measurement for conformational dynamics and in-cell structural states of biomolecules,” International Nanophotonics Symposium (INP-2017), 2017 年 8 月 26 日、川奈ホテル(静岡県・伊東市)

岡本 憲二、廣島 通夫、日比野 佳代、佐甲 靖志、単一分子計測で明らかにする細胞中の分子動態、レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会、2017 年 1 月 7 日、徳島大学常三島キャンパス(徳島県・徳島市)

岡本 憲二、佐甲 靖志、Holliday junction DNA の自発的 branch migration 過程の FRET による解析、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

岡本 憲二、日比野 佳代、佐甲 靖志、生体分子の 1 分子 FRET 計測：分子構造の分布とダイナミクス、第 8 回分子科学討論会、2014 年 9 月 24 日、広島大学東広島キャンパス(広島県・東広島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 憲二 (OKAMOTO, Kenji)

国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・専任研究員

研究者番号：40402763