

令和元年6月18日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02394

研究課題名(和文) 情報蛋白質のリン酸化による細胞記憶の新たな分子機構

研究課題名(英文) Cellular memory depending on phosphorylation states of a signaling protein

研究代表者

佐甲 靖志 (Sako, Yasushi)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員

研究者番号：20215700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化酵素RAFは、細胞内情報処理ネットワークの要となる反応要素である。RAFの構造は、両端を蛍光標識したFRETプローブ分子を用いて計測できる。我々は、細胞内のRAF分子の平均構造が細胞ごとに異なっており、それが増殖因子に対する細胞ごとのRAFの応答性の違いと相関すること、さらに、RAFの構造分布が、分子内の複数のアミノ酸残基のリン酸化の組み合わせによって制御されていることを明らかにした。さらに細胞内1分子計測で細胞外信号に応答した構造変化過程を推定した。この結果は、各々の細胞が経験してきたリン酸化酵素活性化の履歴がRAF分子に埋込まれ、細胞応答を決定していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAFは細胞増殖・分化などの運命決定を制御する分子であり、その異常は遺伝病の発症や発癌に関係している。RAFの特徴は活性と関連する極めて多数のリン酸化部位と、開閉の構造ダイナミクスを持つことである。我々は多数のRAF分子の平均構造が細胞毎に異なっており、構造がリン酸化の組み合わせと相関することを発見し、詳細な解析を行った。本研究は、細胞内情報処理蛋白質の多重リン酸化を利用した新たな細胞記憶の形成・保持機構を研究し、その分子機構に由来する細胞個性の発現や遺伝的変異による発病の理解に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：A cytoplasmic serine-threonine kinase RAF is a key regulator of cell fate decision in animal cells. RAF has a open/close structural dynamics which can be detected by using intramolecular FRET of a probe molecule of RAF conjugated with two fluorophores at the each end. We found that average conformation of RAF has a wide single-cell variation and the variation correlates with RAF response after cell stimulation. RAF has a multiple phosphorylation sites, of which combination regulates RAF conformation. Single-molecule FRET imaging of RAF revealed the pathway of conformational change upon cell stimulation. These results suggest that activation of various intracellular kinase molecules of RAF changes the RAF conformation which regulate cellular response to the next round of stimulation.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞情報・動態

EGF H1 (Fig. 4B) FRET b6g (Fig. 4C) FRET MEG
 S4MM (Fig. 4C) Ab RAF_caCy1bS4 EGF
 H1 4p6S4bmK2_68S S621A \$41&e
 MGG FRET-2CD 8:02b FRET 34N
 MGP 5D RAF 54K8 DNA 33Q
 ZA8S4 5S46S4b6b4D36g
 g 45 s⁻¹, 6g 100 s⁻¹ NIE M763g
 10 ms, 20 ms bS4s SA (bNZ
 3Cc8 RAF (54cK8GK

11 □

1. *Okamoto, K., Hibino, K., and Sako Y. (2019) In-cell single-molecule FRET measurements reveal three conformational state changes in RAF protein. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* in press. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.04.022 1w
2. *Okamoto, K. and *Sako, Y. (2019) Single-molecule Förster resonance energy transfer measurement reveals dynamic partially ordered structure of the epidermal growth factor receptor C-tail domain. *J. Chem. Phys. B.* 123, 571-581. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b10066. 1w
3. Yanagawa, M., Hiroshima, M., Togashi, Y., Yamashita, T., Shichida, Y., Murata, M., Ueda, M., and *Sako, Y. (2018) Single-molecule diffusion-based estimation of GPCR activity. *Sci. Sig.* 11, eaaa01917 (1-16), doi: 10.1126/scisignal.aao1917 (Online Cover). 1w
4. Yasui, M., Hiroshima, M., Kozuka, J., *Sako, Y., and *Ueda, M. (2018) Automated single-molecule imaging in living cells. *Nat. Comm.* 9, 3061, doi:10.1038/s41467-018-05524-7 (1-11). 1w
5. Hiroshima, M., Pack, C.-g., Kaizu, K., Takahashi, K., Ueda, M., and *Sako, Y. (2018) Transient acceleration of epidermal growth factor receptor dynamics produces higher-order signaling clusters. *J. Mol. Biol.* 430, 1386-1401, doi: 10.1016/j.jmb.2018.02.018. 1w
6. Maeda, R., Sato, T., Okamoto, K., Yanagawa, M., and *Sako, Y. (2018) Lipid-protein interplay in dimerization of the juxtamembrane domains of epidermal growth factor receptor. *Biophys. J.* 114, 893-903. doi: 10.1016/j.bpj.2017.12.029. 1w
7. Okamoto, K., Hiroshima, M., and *Sako, Y. (2018) Single-molecule fluorescence based analysis of protein conformation, interaction, and oligomerization in cellular systems. *Biophys. Rev.* 10, 317-326. doi: 10.1007/s12551-017-0366-3. 1w
8. Nakamura, Y., Umeki, N., Abe M., and *Sako, Y. (2017) Mutation-specific mechanisms of hyperactivation of Noonan syndrome SOS molecules detected with single-molecule imaging in living cells. *Sci. Rep.* 7, 14153. doi:10.1038/s41598-017-14190-6. 1w
9. Yoshizawa, R., *Umeki, N., Yanagawa, M., Murata, M., and *Sako, Y. (2017) Single-molecule fluorescence imaging of RalGDS on cell surfaces during signal transduction to Ras to Ral. *Biophys. Physicobiol.* 14, 75-84. doi: 10.2142/biophysico.14.0_75. 1w

10. *Okamoto, K. and Sako, Y., (2017) Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics. *Curr. Opin. Strct. Biol.* 46, 16-23. DOI: 10.1016/j.sbi.2017.03.010. 1w
11. Nakamura, Y., Hibino, K., Yanagida, T., and *Sako, Y. (2016) Switching of the positive feedback for RAS activation by a concerted function of SOS membrane association domains. *Biophys. Physicobiol.* 13, 1-11, DOI: 10.2142/biophysico.13.0_1 (2018 Award for outstanding BPPB paper). 1w

13 □

1. Sako, Y. Single-molecular pharmacology of GPCRs. (2018.9.18) The 3rd Biosignal Research Center International Symposium “Modulation of GPCR Signaling by Membrane Heterogeneity and Molecular Clustering” Kobe University, Kobe
2. Nakamura, Y., Hibino, K., Yanagida, T., and Sako, Y. Single-molecule analysis of a cell signaling protein, SOS. (2018.9.15) “The 7th Award Seminar for outstanding Biophysics and Physicobiology paper”
3. Hiroshima, M., Yasui, M., Kozuka, J., Sako, Y., and Ueda, M. In cell automated single-molecule analysis and its extensive applications. (2018.9.15) “New trends in bioanalysis based on single molecule biophysics”
4. _____ (2018.4.21) “17 G”
5. _____, (2018.3.10) “42 G”
6. _____, EGF w/bS4 (2018.2.10) “18 G”
7. Maeda, R., Sato, T., Okamoto, K., and Sako, Y. (2017.9.20) Lipid-protein cooperativity in the regulation of juxtamembrane domain dimer formation in epidermal growth factor receptor. “55 G” “New detergents, liposomes, and nanodiscs as membrane-mimetic environments.”
8. Okamoto, K., Maeda, R., and Sako, Y. Single-molecule FRET measurement for EGFR-RAS-MAPK signal transduction pathway. (2017.9.3-8) “Deciphering complex energy landscape and kinetic network from single molecules to cells: a new challenge to make theories meet experiments” Dijon, France
9. _____ (2017.6.28) “26 G”
10. _____ (2017.6.13) “69 G”
11. _____ SFæ _____ M(0)M(0)0 (2017.1.7) “37 G”
12. _____ (2016.12.10) “33 G”

