

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19207012

研究課題名(和文) 細胞システムにおける反応ゆらぎの計測とその特性・役割の理解

研究課題名(英文) Measurements and analysis of fluctuations in cellular systems

研究代表者

佐甲 靖志 (Sako Yasushi)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・主任研究員

研究者番号：20215700

研究代表者の専門分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測、顕微計測、ノイズ、細胞内情報処理、細胞分化、細胞増殖

1. 研究計画の概要

細胞増殖・分化・細胞死などの細胞運命決定に関与する細胞内情報伝達回路である EGF-Ras-MAPK システムの反応を題材として、蛋白質分子反応、細胞内分子システム、細胞応答の各階層において反応ゆらぎとその伝搬・加工を実測して、その性質と役割を明らかにする。細胞が外来性および内在性の反応ゆらぎ(ノイズ)を克服する仕組み、さらには、反応ゆらぎが細胞応答の柔軟性の発現などに積極的に利用されている可能性を探る。

(1) 分子反応においては EGF 受容体と Ras/Raf(MAPKKK)の反応に注目し、これらの情報蛋白質と相互作用相手分子の反応時系列解析を行って、分子レベルでの情報処理機構を探る。(2) 分子システムレベルでは、EGF 受容体-Rasの反応回路と、Rasの下流に位置する MAPKカスケードにおいて、入出力応答および反応ゆらぎの伝搬を計測する。(3) 細胞レベルでは、EGFに対する細胞変形・運動、増殖応答のゆらぎ・分布を細胞内反応と関連づけて解釈することを目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) 分子レベルの情報処理

EGFR とアダプター蛋白質 Grb2 の結合反応において、負の濃度依存性と反応記憶を発見した。Grb2 認識部位である EGFR の Y1068 のリン酸化阻害変異体 Y1068F が、低反応頻度で濃度依存性や反応記憶を失うことから、ヒステリシスを持つ EGFR の構造ゆらぎが反応記憶をもたらすことが示唆された。これを実証するため、Y1068 を含む EGFR の細胞質

部位の構造ゆらぎ計測系を構築した。1分子蛍光を単一光子・実時間計測し、最尤推定法で、10~100光子の精度で分子状態変化を検出する。Q-dot 標準試料で、サブミリ秒の状態変化検出に成功した。EGFR の構造ゆらぎを1分子 FRET 計測するため、標識導入用分子を設計し、発現・精製法を確立した。

Ras の代表的なエフェクターRaf はリン酸化部位を多数持ち、複雑な構造ゆらぎが予想される。細胞内1分子 FRET 計測で、Ras に制御された Raf の構造変化がリン酸化をもたらすことを明らかにした。上記の1光子計測装置を用いて、Raf の野生型と活性化制御に関わる変異体の構造分布が異なることを示す結果を得た。

(2) 分子システムレベルの情報処理

EGFR と Shc, Ras と Raf の認識反応を利用して、EGFR-Ras システムの反応伝達時間とそのゆらぎを細胞内計測した。中間的な EGF 濃度でゆらぎが最大値を示すことが明らかになった。

MAPK カスケードによる ERK(MAPK)の活性化には双安定性が予想されている。分子数ゆらぎと双安定性の関係を計算機実験で解析した。解析結果を実証するため、大腸菌内に反応を再構成した。再構成系では、反応に関わる分子濃度を人工的に制御できる。

両者を繋ぐものとして、Ras, Raf およびリン酸化酵素3者の複合体による Raf 活性化キネティクスを1分子解析し、反応モデルを構築した。

(3) 細胞レベルの情報処理

PC12 細胞において培養条件と、自発的および外部信号依存的な細胞運命（増殖・分化・細胞死）選択確率を計測した。培養条件により、選択確率が変動するだけでなく、増殖因子(EGF)による分化確率、分化因子(NGF)による増殖確率の上昇が観察された。EGF, NGF による増殖、分化は共に ERK の活性化をもたらすが、そのダイナミクスは異なる。細胞応答と ERK の活性化を同時計測する長期培養顕微鏡装置を組み立てた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

分子レベルの情報処理反応においては、当初予定していた反応キネティクス解析は EGFR/Grb2, Ras/Raf とほぼ終了し、分子構造ゆらぎによる合目的な反応記憶や、ゆらぎを抑制・制御するメカニズムによる正確な情報伝達機構の存在を示唆する結果を得た。今後は、それらの実体である構造ゆらぎの直接計測を行うが、当初計画になかった単一光子計測法を実現し、マイクロ秒領域での計測を実現する目処が立った。細胞内での構造分布計測も予備的な結果が既に得られている。

分子システムレベルの情報処理では、反応とそのゆらぎの伝搬を計測するシステムの構築に思いの外時間を要したが、再構成系構築により当初計画では不可能であった構成要素の濃度制御が可能になるなど、時間を掛けた利点もあった。実験系は完成したので、今後は計測と解析を行う。

細胞レベルの情報処理では、運命決定の確率性（ゆらぎ）が明らかになり、数理モデルのプロトタイプ構築が終了した。増殖と分化は逆方向の細胞応答であるとされるにもかかわらず、増殖因子(EGF)と分化因子(NGF)が同じ情報処理回路(Ras-MAPK システム)を利用することは長らく謎であったが、状況依存的に EGF と NGF が逆方向の反応を誘導することを発見しており、今後、単細胞レベルの反応と応答ゆらぎの計測・解析から、ゆらぎの重要性が示せると期待している。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 分子レベルの情報処理

EGFR, Raf の 1 分子構造変化計測を行う。EGFR では *in vitro* システムで、構造記憶の検出と分子反応との相関解析を行う。Raf では、細胞内の分子構造分布と、EGF 応答性の

関係を調べ、細胞状態・履歴が Raf 分子の構造に埋め込まれて、細胞レベルの分子応答ゆらぎを支配している可能性を追求する。

(2) 分子システムレベルの情報処理

EGFR-Ras システムの反応ゆらぎを単一細胞計測し、入力と反応、ゆらぎの関係を理論予測(Shibata, Fujimoto et al., 2005)と比較検討する。ERK 活性の双安定性と分子数ゆらぎの関係を計測し、モデル化を行う。

(3) 細胞レベルの情報処理

単一細胞レベルの計測から、細胞状態遷移モデルにゆらぎを導入し、細胞運命の確率性と外力(EGF, NGF)応答性を説明する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

M.Morimatsu, H.Takagi, K. Ota, K. Nishida, T. Yanagida, Y. Sako: Multiple-state reactions between the epidermal growth factor receptor and Grb2 as observed using single-molecule analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:18013-18 (2007) 査読有

T.Miyauchi, T. Yanagida, Y. Sako: Rho small GTPase regulates the stability of individual focal adhesions: a FRET-based visualization of GDP/GTP exchange on small GTPases. Biophyscs. 3: 63-73 (2007) 査読有

K. Hibino, T. Shibata, T. Yanagida, Y. Sako: A RasGTP-induced conformational change in C-RAF is essential for accurate molecular recognition. Biophys. J. 97, 1277-87 (2009) 査読有

[学会発表] (計 48 件)

Y. Sako: Single-molecule kinetic analysis of cell signaling reactions. "Conference on Systems Biology of Mammalian Cells (SBMC2008)" Dresden. (2008.5)

[図書] (計 2 件)

M. Ueda, T. Shibata, Y. Sako: Signal transduction across the plasma membrane. "Single Molecule Dynamics in Life Science", Yanagida, T. and Ishii, Y. ed. WILEY-VCH. (2009) 99-116 (18 ページ)

[その他]

ホームページ

<http://www.riken.go.jp/cell-info>