

機関番号： 82401  
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

## 研究成果の概要（和文）：

EGF-Ras-MAPK 回路の細胞内情報伝達反応を題材として、蛋白質分子、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の実測と、その性質と役割の解明を目的とした研究を行った。分子反応においては EGF 受容体と RAF、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、細胞レベルでは EGF, NGF に対する細胞増殖・分化応答のゆらぎを解析した。

## 研究成果の概要（英文）：

Fluctuations of biological reactions were measured and analyzed for dynamics of proteins, reactions of molecular systems, and cell behaviors in the EGF-Ras-MAPK system, which is a cell signaling network. Intramolecular dynamics and translational movements of EGF receptor and RAF; reaction dynamics between EGF receptor and Grb2, Ras and RAF, and MAPKK and MAPK; and fluctuations of cell fate decision that occurred spontaneously and in response to EGF and NGF have been studied.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
総計	39,500,000	11,850,000	51,350,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

ポストゲノムの重要な研究課題のひとつは、細胞内分子システムダイナミクスの解明

であり、本研究開始時点においても、様々な研究プロジェクトが進行中であった。しかし、それらの研究のほとんどは、反応の平均値を対象とする

もので、ゆらぎ・分布・ノイズと言った観点は無視されているか、消極的にしか取り込まれていなかった。その後、幾つかのプロジェクトがゆらぎや分布、1細胞、1分子などをキーワードとして開始されているが、研究成果としては未だ今後に期待する段階であると言える。近年盛んな1細胞レベルの可視化計測では、細胞毎の反応分布が必然的に問題となる筈であるが、実際にはここに踏み込んだ研究例は非常に少ない。所謂システム生物学のほぼすべての研究は、細胞内分子ネットワークを、平均値として記述されたmass actionとMichaelis-Menten反応の組み合わせとして取り扱っている。

我々は細胞内1分子計測法を開発し、細胞内反応に関与する情報伝達分子数の実測と、反応キネティクス・ダイナミクスパラメータの細胞内計測を可能にし(Sako et al, 2000; Sako & Yanagida, 2003; Sako, 2006)、その結果、細胞の情報処理反応がきわめて少数の分子反応で起こされていることが分かっていた。細胞性粘菌の走化性運動は細胞当たり400分子のcAMPで(Ueda et al, 2001)、上皮細胞のカルシウム応答は300分子の成長因子で(Uyemura et al, 2005)、神経成長円錐の伸展は40分子の成長因子で(Tani et al, 2005)開始される。走化性運動の濃度勾配検出において細胞前半部と後半部の入力差は10分子程度であり得る。従って、細胞内反応の分子数のゆらぎはかなり大きい。一方で蛋白質反応の1分子計測は、蛋白質反応の根本が熱ゆらぎに依存することを実証していた。すなわち、数のゆらぎと熱ゆらぎという物理システムに共通する本質的ゆらぎは、細胞応答においても無視することができない。

細胞システムは、ある場合にはこの大きな反応ゆらぎ(ノイズ)を、システムの非線形応答性や、フィードバック回路を利用して克服し、また他の場合には、元々中性(白色)の数のゆらぎ、熱ゆらぎをエネルギーと不均一構造を利用して増幅・加工し、外部情報とつき混ぜて合目的な応答を状況に応じて柔軟に発現する。実際、我々の計測結果は、同一の細胞内反応のパラメータが細胞内の時間・空間に応じて異なっていることや(Ueda et al, 2001; Hibino et al, 2003)、反応カスケードの進行にともなこのような問題意識は、これまでも存在したであろうが、反応ゆらぎを実測する良い方法がなかった。1分子計測によって分子レベルの反応ゆらぎが計測可能になり、我々は生細胞内においても1分子計測で反応パラメータを定量できることを示した(Ueda et al, 2001; Hibino et al, 2003; Teramura et al, 2006)。1細胞の反応ゆらぎや細胞毎の反応分布も計測可能になった(Uyemura et al, 2005)。これらの状況に鑑みて、本申請では、細胞内反応のゆらぎを実測し、その特性を明らかにすることを計画した。

## 2. 研究の目的

種々の細胞に増殖促進をもたらす細胞内情報処理システムである上皮成長因子(Epidermal growth factor: EGF)-Ras-MAPKシステムにおいて、(1)分子、(2)分子システム、(3)細胞、各々のレベルで反応ゆらぎを実測・解析することを目的とした。

分子反応においては、特に多くの情報経路の分岐点として働いているEGF受容体(EGFR)と、その下流で働くリン酸化酵素Rafに注目し、これらの蛋白質の運動・構造ダイナミクス、構造ゆらぎを実測し、情報処理反応との相関関係を解析することを目指した。予備的な実験結果から、これらの分子の反応に多状態性や分子記憶、また、未知の反応中間体の存在などが示唆されており、構造ゆらぎとの関係に興味を持たれたからである。

分子システムレベルでは、EGFRと細胞質に存在するアダプター分子Grb2の反応、Grb2のさらに下流で働く低分子量GTPaseであるRasとそのエフェクターRafの反応、Rafから始まる3段階の蛋白質リン酸化反応であるMAPKカスケードの中間段階に位置するERK(MAPK)のリン酸化・脱リン酸化反応の解析を目指した。

細胞レベルでは、EGF-Ras-MAPKシステム、および類似する情報処理システムNGF-Ras-MAPKシステムの関与する細胞増殖・分化・細胞死の運命決定システムのゆらぎを計測・解析し、分子システムのゆらぎと細胞運命のゆらぎの相関関係を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

情報伝達分子の運動・構造ゆらぎ計測

生細胞内および、生成した蛋白質分子の1分子蛍光計測法を用いて、分子運動・構造の時系列計測を行った。

細胞膜におけるEGFRの運動計測では、細胞質側末端にGFP融合したEGFR遺伝子を内在的なEGFRを持たない培養細胞CHO-K1に発現させ、全反射型蛍光顕微鏡により、細胞膜のEGFR-GFPを1分子観察した。細胞質末端へのGFP融合がEGFRとしての生理機能を阻害しないことは従来の複数の研究から明らかになっている。細胞膜蛋白質の運動は、基本的に2次元ランダム運動ではあるが、細胞膜ドメイン、膜内外のマトリクス構造、また、膜蛋白質間の相互作用などによって、複雑にゆらいでいる。その詳細を明らかにするため、新たな1分子運動解析法を構築した。

EGFR, Rafの構造ゆらぎを計測するには、1分子内の単一色素対FRET計測を用いた。EGFRの細胞質末端約200残基は、多数のチロシンリン酸化部位を含む分子認識ドメインである。このドメインを培養細胞にリコンビナント発現させ、精製後2種の蛍光色素で標識してFRET計測することを計画した。Rafにおいては、N-端、C-端にそれぞれYFP, GFPを融合してHeLa細胞に発現させ、1分子内で起こるGFPからYFPへのFRETを、生細胞内で1分子可視化計測した。1分子FRET

計測においても、構造ゆらぎの詳細な解析のため、単一光子計測に基づく新たな計測法を導入し、計測データ解析法を作った。

#### 情報伝達分子システムの反応計測

活性化（チロシンリン酸化）したEGFRとGrb2の認識反応のゆらぎを解析するため、*in vitro*計測系を構築した。EGF処理したA431細胞から活性化EGFRを含む細胞膜断片（サブミクロンサイズ）を調整し、ガラス基盤に貼り付けて、別途、大腸菌でリコンビナント精製し、N-端を蛍光色素Cy3で標識したGrb2を加えて、同一反応部位における多数回のEGFRとGrb2の認識反応を1分子計測した。

RasとRafの認識反応は、生細胞内においては細胞膜の細胞質側に存在するRasとRafの結合により、細胞質から細胞膜へRaf分子が局在変化することで現される。EGF応答性を持つHeLa細胞にGFP-Rafを適量発現させると、細胞膜への局在変化を1分子観察することができる。RasとRafの分子認識は1分子レベルではRasの活性化(EGF処理)の有無にかかわらず起こっている。いずれの場合も、膜結合したRaf分子はサブ秒～秒で細胞質へ解離する。解離時間の解析からRas/Rafの認識反応キネティクスが分かる。

MAPKカスケード第3段目のリン酸化酵素ERK(MAPK)は、2段目のリン酸化酵素MEK(MAPKK)によって2重にリン酸化を受けて活性化し、脱リン酸化酵素MKPによって不活性化される。MEK1はRaf(MAPKKK)による2重リン酸化で活性化される酵素であるが、制御領域の欠失変異体は恒常的な活性を示す。MKPは元々反応制御を受けていないとされている。それぞれCFP, GFP, mCherryを融合したERK, 恒常活性化型MEK, MKPを同時に大腸菌内に発現させ、ERKのリン酸化を項2重リン酸化型ERK抗体で検出した。

#### 細胞応答のゆらぎ計測と解析

PC12細胞はEGFによって増殖促進、NGFによって神経細胞様に分化する。増殖・分化は全く方向性の異なる細胞応答であるが、EGF, NGFは共にRas-MAPKシステムによる情報処理を通じて細胞運命を変化させている。培地中の血清濃度を変化させて、EGF, NGFの存在・非存在下で、対数増殖期のPC12細胞を5日間継時観察し、細胞密度、未分化・分化および細胞死した細胞数を計数した。3状態（増殖・分化・死）の確率的運命決定モデルに基づいて、マルコフ遷移-モンテカルロ法で運命遷移確率（速度定数）を推定した。

#### 4. 研究成果

##### 情報伝達分子の運動・構造ゆらぎ

EGFR-GFPの1分子運動軌跡解析から、EGFRは拡散係数と運動領域制御の異なる3種の運動モード間を確率的に遷移している

ことが明らかになった。それぞれの拡散係数、寿命、運動領域は、最も速い運動で $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 70 msの自由拡散、中間は $0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 200 ms, 100 nm, 最も遅い成分は $0.004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 400 ms, 60 nmであった。多くの運動軌跡で、中間的な運動状態は、遅い運動状態を取り囲むように存在した。状態間の運動遷移を解析すると速い運動→中間→遅い運動→速い運動という方向に1秒あたり粒子数の約15%の速度で運動モード変換が起こっていることが示唆された。以上の計測はEGFを添加していない定常状態のものであり、サイクルの存在は、運動モード変換が単純なランダム過程ではなく、化学反応と共役していること、所謂情報入力(EGF)が存在しなくても、情報処理反応系は自発・恒常的に起動していることを示唆している(Hiroshima et al. *in prep.*)。

そのようなEGFRの情報処理反応の実体は、細胞質のリン酸化酵素ドメインによるC-末端ドメインのリン酸化である。リン酸化部位を複数含むC-末端ドメイン(約200アミノ酸残基)は、天然変性構造をとると言われ、後述するように複雑な反応ゆらぎを示す。このドメインの構造ゆらぎを1分子FRET計測することを試みた。N-末端をエネルギー供与体となるAlexa488で、ドメイン内部に存在する3カ所のCysを受容体となるCy3で標識することにより、分子内FRETが観察できた。構造ゆらぎを高時間分解能で計測するため、1分子単一光子計数計測を行う顕微鏡装置を組み立て、新たな運動ゆらぎ解析法を考案した(Okamoto and Sako, *submitted*)。新たな方法では、20%程度のFRET効率変化を示す構造遷移を数百光子で検出できると期待され、実時間に換算するとサブミリ秒からミリ秒の時間分解能(従来の10倍程度)が得られる。計測・解析は現在進行中である。

Rafは複数のドメインを持つ比較的大きな(分子量7.3万)蛋白質であり、活性化と共役してヘアピン状の開構造から閉構造へ転移すると言われていたが、いつ、どこで転移が起こるのか、転移は活性化の原因か結果か、それぞれの構造の安定性(ゆらぎ)は分かっていたいなかった。我々の細胞内1分子および多分子FRETによる計測結果から、静止状態の細胞では、細胞質、細胞膜で共に閉構造、EGF刺激数分後の細胞では、細胞質で閉構造、細胞膜へ局在変化したRafは0.1秒以内に開構造に転移することが明らかになった。しかし、開構造のRaf分子間には広いFRET効率分布(構造分布)が存在する(Hibino et al. 2009a, b)。前述の単一光子計数計測で、野生型と開構造変異体のRaf分子の構造分布を計測したところ、開構造変異体は平均FRET効率が低下しているだけでなく、構造分布が広がっていること、すなわち大きな構造ゆらぎを持つことが示唆された(Hibino, Okamoto et al. *in prep.*)。この現象の意味については時節で考察する。

##### 情報伝達分子システムの反応

活性化したEGFRとGrb2の分子認識反応のキネティクスは非常に複雑であった。結合状態は定

常的に少なくとも3成分存在し、解離速度定数が異なっている。解離速度定数と成分比は  $10 \text{ s}^{-1}$  (~90%),  $2-3 \text{ s}^{-1}$  (~10%),  $0.3-0.5 \text{ s}^{-1}$  (~0.05%)である。Grb2によって認識されるリン酸化チロシンはEGFRのY1068とY1086とされるが、より優勢と言われる前者をフェニルアラニン置換した点変異体(Y1068F)は、反応頻度こそ1/10程度に低下するものの、解離キネティクスは全く変化しない。従って結合状態の多状態性は、EGFRとGrb2の大局的な相互作用面の違いによると推測される。一方、結合反応解析から、解離状態は非常に多数存在し、各々が異なった結合速度定数を持つこと、状態間遷移も反応の律速段階になっていることが示唆された。Y1068Fでは低頻度反応条件(低Grb2濃度)で、この複雑性は完全に消失し、単純な1成分反応になるが、10 nM以上のGrb2濃度では野生型同様の結合反応キネティクスを示す。この結果は、分子間相互作用と(構造ゆらぎによってもたらされているはずの)反応速度定数のゆらぎの相関関係を意味する。さらにEGFRとGrb2の結合反応速度定数にはGrb2濃度依存性が存在し、0.1-100 nMのGrb2濃度範囲でGrb2濃度が10倍上昇する毎に(見かけの)反応速度定数は1/3ずつ減少する。また、サブ秒~秒の時間スケールで反応記憶(非マルコフ性)が発見された。Y1068Fは低Grb2濃度で反応記憶を失う。以上の結果は、EGFRのC末端ドメインがGrb2との相互作用における構造ヒステリシスをもつゆらぎの存在を示唆している(Morimatsu et al. 2007, Takagi, Morimatsu and Sako in press)。

同様の方法で、細胞内に発現したGFP-Raf1分子の細胞膜滞在時間の解析から、生細胞内でRafとRasの相互作用キネティクスを解析した。Rafは開閉の構造遷移に加えてRas結合部位を2つ持ち、細胞膜ではRasの他にRafをリン酸化する酵素とも相互作用する。野生型および様々な欠失・点変異体Rafを解析し、Ras, Raf, リン酸化酵素3種の相互作用によるRafの活性化経路とキネティクスパラメータを推定した(Hibino et al. submitted)。その結果、Rafの構造転移が活性化反応と緊密に共役して、正確な情報伝達(活性化型と不活性化型のRasの見分け)を実現しているという結果を得た。このような分子機構が成立するには、静止状態の細胞でRafの構造ゆらぎが厳密に抑制されていなければならない。前節で述べた細胞質内Rafの構造分布は、この予想を支持するものである。

我々はさらに、EGF-Ras-MAPKシステムの最終段階であるERKのリン酸化(活性化)/脱リン酸化(不活性化)反応を解析するため、大腸菌内に反応システムを再構成した。この計測系の利点は、MEK(活性化酵素)、MKP(不活性化酵素)それぞれの濃度を、人工的な発現プロモータで制御できること、他の情

報伝達系からのクロストークをなくして素過程を解析できることである。MAPKの2重リン酸化は、反応構造とパラメータ値によっては、2重安定性を示し得ることが理論解析から分かっており、細胞内反応ゆらぎを制御する有力なメカニズムになり得る。ERKの活性化(2重リン酸化)量は、MEKとMKPの発現量比に従って変化するが、我々の計測結果では、過剰応答性(Hill係数2.9)は観察されたものの、2重安定性は見えてこなかった(Takahashi et al. in prep)。

#### 細胞応答のゆらぎ

PC12細胞は増殖・分化・細胞死の運命を確率的に選択する。計測結果から推定した各々の状態間の遷移速度(確率)は培養条件によって変動するが、細胞集団で見た場合の細胞数のゆらぎはどの培養条件でも一定であり、平均値と計測場所毎のゆらぎには指数1.7の冪乗則が成り立つ。理論解析と確率的粒子シミュレーションから、冪関係は遷移確率の変動ではなく、一定確率でランダム選択が行われていることによってもたらされていることが明らかになった。すなわち、各々の条件下での細胞運命は、極単純な過程で決定されている。一方、培養条件による確率値の変化により、運命決定は低血清濃度になるほど、すなわち環境が悪化するほど、より無作為化されている(運命決定のゆらぎが大きくなる)。EGF, NGFはそれぞれ増殖、分化因子とされるが、どの培養条件においても、一方的に増殖または分化を促進するのではなく、EGFは、高血清時には細胞死誘導、低血清時には分化誘導を行い、NGFは増殖誘導を行う場合がある。全体的には、高血清時には増殖と共に細胞死も起こり、集団内の細胞は高頻度に更新されているが、低血清時には自発的に分化を促進して、短時間での細胞死を抑制している。このような自発的な細胞の挙動変化に対応して、細胞はEGF, NGF信号の意味を動的に変化させるようである(Mouri and Sako, in prep)。

このようなゆらぎによる運命決定システムと、システムそのものの変動がどのような分子機構で起こっているか興味が持たれるが、増殖・分化・細胞死の選択はERKの活性化ダイナミクスと関連することが、示唆されている。我々は、恒常的なGFP-ERK発現PC12細胞と、顕微鏡下の長期培養観察システムを構築した。このシステムで、ERKダイナミクスと細胞運命の単一細胞解析に着手している。

#### 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12件)

- ① Kurahashi, H. Park, C.-G., Shibata, S., Oishi, K., Sako, Y., and Nakamura, Y. (2011) [PSF] aggregate enlargement in *rnq1* non-prion domain mutants, leading to a loss-of-prion yeast. *Genes to Cells*. 16. 査

- 読有
- ② Furukawa, K., Abe, H., Hibino, K., Sako, Y., Tsuneda, S., and Ito, Y. (2009) Reduction-triggered fluorescent amplification probe for detection of endogenous RNAs in living human cells. *Bioconj. Chem.* 20, 1026-1036. 査読有
- ③ Hibino, K., Shibata, T., Yanagida, T., and Sako, Y. (2009a) A RasGTP-induced conformational change in C-RAF is essential for accurate molecular recognition. *Biophys. J.* 97, 1277-1287. 査読有
- ④ Hibino, K., Hiroshima, M., Takahashi, M., and Sako, Y. (2009b) Single-molecule imaging of fluorescent proteins expressed in living cells. *Methods Mol. Biol.* 48, pp451-460. Lee, J. W. ed. Humana Press. 査読有
- ⑤ Yumura, S., Ueda, M., Sako, Y., Kitanishi-Yumura, T., and Yanagida, T. (2008) Multiple mechanisms for accumulation of myosin II filaments at the equator during cytokinesis. *Traffic*, 9, 2089-2099. 査読有
- ⑥ Tanaka, S.-i., Miyata, T., Kato, T., Namba, K., Yanagida, T., Sako, Y., Kawata, S., and Inouye, Y. (2008) Construction of two color semiconductor Quantum dots wire by utilizing the complementarity of DNA. *AIP Conference Proceedings* 1062 "DNA-Based Nanodevices", 116-122. 査読有
- ⑦ Morimatsu, M., Takagi, H., Ota, K. G., Iwamoto, R., Yanagida, T., and Sako, Y. (2007) Multiple-state reactions between the epidermal growth factor receptor and Grb2 as observed using single-molecule analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18013-18018. 査読有
- ⑧ Miyachi, T., Yanagida, T., and Sako, Y. (2007) Rho small GTPase regulates the stability of individual focal adhesions: a FRET-based visualization of GDP/GTP exchange on small GTPases. *Biophysics*, 3, 63-73. 査読有
- その他 4 件

[学会発表] (計 100 件)

- ① Sako, Y., Single-molecule kinetics of protein recognition in cell signaling. (2008.12.8) The IPR seminar on New Approaches to Complexity of Protein Dynamics by Single Molecule Measurements: Experiments and

Theories. Suita

- ③ Sako, Y., Single-molecule imaging of dynamics and kinetics of cell signaling proteins (2007.11.27) Special lecture, 10th workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and related methods. Sapporo
- ② Sako, Y., Single-molecule analysis of EGF-Ras-MAPK pathway. (2008.3.10) OIST Workshop on Systems Biology of MAPK pathways. Onna.
- その他招待講演40件、一般演題57件

[図書] (計 7 件)

- ① Ishido, N., Kobayashi, H., Sako, Y., Arai, T., Fukuda, M., and Nakamura, T. (2011) How to make FRET biosensors for Rab family GTPases. "Biosensors for Health, Environment and Biosecurity / Book1" INTECH
- ② Hiroshima, M. and Sako, Y. (2010) Single-molecule kinetic analysis of receptor protein tyrosine kinases. "Cell Signaling Reactions: Single-molecule Kinetic Analyses", pp.1-32. Sako, Y. and Ueda, M. eds. Springer.
- ③ Hibino, K. and Sako, Y. (2010) Single-molecule analysis of molecular recognition between signaling proteins Ras and RAF. "Cell Signaling Reactions: Single-molecule Kinetic Analyses", pp.59-78. Sako, Y. and Ueda, M. eds. Springer.35)
- ④ Ueda, M., Shibata, T., and Sako, Y. (2009) Signal transduction across the plasma membrane. "Single Molecule Dynamics in Life Science", pp. 99-116. Yanagida, T. and Ishii, Y. eds. WILEY-VCH.

その他 3 件

[その他]

ホームページ

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

<http://www.asi.riken.jp/jp/laboratories/chieflabs/cell-info/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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

20215700

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし