

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770161

研究課題名(和文)細胞質中のRAF分子の構造分布解析による細胞状態の定義と細胞応答の操作

研究課題名(英文)Prediction and control of cellular response by measuring the conformation of RAF

研究代表者

日比野 佳代 (HIBINO, Kayo)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：40435673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞応答の予測や制御および応答の確率的な性質を規定する原理の解明に向け、RAFの構造分布を指標に細胞状態を定義し、RAFの局在変化の有無を細胞応答と捉えて、細胞状態と細胞応答の相関を作成した。これにもとづき、細胞外刺激後の細胞応答を予測し、検証した。細胞状態を検出しながら、細胞に事前刺激を与えたり、RAFのリン酸化に影響を与える因子を導入して細胞状態を操作し、細胞応答を操作することに成功した。細胞応答の予測および制御は、細胞のガン化機構の解明やES細胞やiPS細胞を用いた再生医療の発展の基礎となる。本研究はこれらの分野へ大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Uncontrollability of cell behaviors is a major obstacle to the therapeutic application of regenerative biology. To regulate cell behaviors, it is important to understand how cellular system works and to find the key factors to monitor and manipulate the cell-states. Here, I focus on the signaling molecule RAS and RAF as a candidate factor to monitor and predict cell-states. RAS-RAF signaling involves proliferation, differentiation. By using RAF-FRET probes, I found that the cellular response correlated with the ensemble RAF-conformation in individual cells before growth factor (GF)-stimulation and that the RAF-conformation depends on the phosphorylations. The results suggest that the phosphorylation state, therefore the ensemble RAF-conformation differs in individual cells and the difference induces varied responsibility to GF. The phosphorylation states of RAF could work as cellular memory which reflects the past extracellular environment and intracellular reactions.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：細胞内情報処理機構 RAF 細胞状態 細胞操作 細胞内1分子計測 1細胞計測 FRET

1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達タンパク質RAFは、上皮成長因子(EGF)の刺激に対して、細胞質から細胞膜へと局在変化をする。この応答は、細胞の増殖、分化、生存、ガン化などの細胞の運命決定に重要な応答であるが、飽和濃度の刺激に対して、全ての細胞に画一的に起こるわけではなく、確率的な性質を示す。細胞が一見確率的な応答を示す原因として、細胞外部環境からの信号入力の不均一性や細胞内部状態の不均一性などが考えられるが、その根底にある原理は明らかではない。

RAFは、低分子量G蛋白質Rasからの信号をMAPキナーゼ経路へと伝える(Wellbrock, 2004)。細胞の増殖、分化、発ガンの誘導因子などの下流でRasが活性化すると、細胞質のRAFは、細胞膜の活性化型Rasと相互作用して膜へと局在変化し、自己抑制型の閉状態から開状態へと構造変化する(Hibino, 2009, Wellbrock, 2004)。その後、RAFは膜上でキナーゼによりリン酸化されて活性化し、下流へ信号を伝達する(Avruch, 2001, Wellbrock, 2004)。RAFの活性を制御するリン酸化部位は複数存在し、多種類のキナーゼにより制御されている(Wellbrock, 2004)。RAFは情報伝達反応が収斂する場所に位置しており、刺激に応じてさまざまな組み合わせでリン酸化を受け、細胞内で多状態をとる可能性が高い。

近年、我々は、RAFの構造を検出するため、Förster resonance energy transfer (FRET) の原理を用いた蛍光プローブを開発し(Hibino, 2009)、刺激前、基底状態にある細胞内でRAFの構造を多分子平均計測することで、RAFの構造が細胞ごとに大きく異なっていることを発見した(Hibino, 2011)。このRAFの平均構造はEGF刺激応答と相関関係にあり、RAFの構造が開状態にちかい細胞ほどEGFに対する応答性が高く、閉状態にちかい細胞はEGFに全く応答しなかった。さらに、細胞内1分子FRETの計測を用いた予備実験によ

り、一つの細胞に含まれるRAF分子の構造は広く分布しており、いろいろな構造のRAFが存在していること、RAFの構造分布は擬似リン酸化変異の導入により開状態方向へとずれることを確認している(Hibino, 2011)。この結果は、RAFのリン酸化状態とRAFの構造には因果関係があることを示唆している。

これらの研究を踏まえ、仮説：「RAFのリン酸化状態には、細胞が過去に経験した外部環境の変化や内部の生化学反応の履歴が埋め込まれており、RAFのリン酸化状態が外部刺激に対する細胞応答を規定している。また、RAFのリン酸化状態をRAFの構造を指標に取り出すことができる。」をたて、本研究では、細胞内のRAFの構造分布を指標に細胞状態を定義し、細胞応答の予測、細胞状態の操作および細胞応答の制御を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内情報伝達反応が収斂する因子の一つ“RAF”分子の構造分布を指標に、細胞の増殖、分化、生存、ガン化の応答を左右する細胞状態を定義する。この定義を指標に、細胞状態を操作しながら細胞培養し、外部刺激に対する細胞の応答を予測および制御する。これにより、細胞の増殖、分化、生存、ガン化の運命決定の機構を明らかにすることが目的である。これらを実現するため、本研究では、以下の3つにとりくむ。

1. 「細胞状態 (RAFの構造分布)」と「細胞応答 (RAFの局在変化)」の相図の作成

基底状態の細胞内に含まれるRAF分子の構造を1分子毎に可視化し、RAFの構造分布を測定する。この分布と細胞外刺激後のRAFの局在変化応答との相関関係をしらべる。

2. 「細胞状態」の操作

基底状態の細胞内に含まれるRAF分子の構造分布が以下の操作により、どのように変化するかをしらべる。a) RAFのキナーゼ候補の導入、b) RAFのリン酸化部位への変異導入などの操作。

3. 「細胞状態」の操作による「細胞応答」の制御

基底状態のRAFの構造分布とそれに依存した細胞外刺激応答は、どれくらいの時間維持され、次の細胞応答を規定するか?また、**上述2**の処理によりRAFの構造を変調して細胞状態を操作することで、増殖、生存、分化、ガン化の細胞応答を恣意的に制御できるかをしらべる。

以上のことから、RAFの構造分布を指標に細胞状態を定義し、RAFの局在変化の有無を細胞応答と捉えて、細胞状態と細胞応答の相図を作成する。この相図にもとづき、細胞外刺激後の細胞応答を予測し、検証する。また、細胞状態を検出しながら、細胞に事前刺激を与えたり、RAFのリン酸化に影響を与える因子を導入して細胞状態を操作し、細胞応答を制御することを目指す。これらを通して、増殖、分化、生存、ガン化などの細胞の運命決定に、情報伝達タンパク質RAFの構造分布がどのように関わっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

RAFの構造変化プローブを用いて、**細胞質中におけるRAF分子の構造を1分子計測**する。RAFの構造分布を指標に細胞の**状態を定義**する。状態を検出した細胞に、増殖、分化、ガン化を促す細胞外刺激の一つを与え、**RAFの局在変化応答を1分子計測**する。**細胞状態と応答の関係の相図を作成**する。細胞への**事前刺激やRAFのキナーゼ候補の導入、RAFへの擬似リン酸化変異の導入**などにより**細胞状態を操作**し、相図にもとづき**細胞応答を予測**および制御することを目指す。これらを実現するため、以下にとりくむ。

I) 細胞質中のRAF分子の構造分布解析と細胞状態の定義

I-1) RAF構造変化プローブを恒常的に発現する細胞株の作成

RAFの構造を細胞質中で1分子可視化解析

するため、RAF-FRETプローブを用いる。RAFの閉状態と開状態は、それぞれ高FRET信号と低FRET信号として検出される。扁平上皮細胞HeLaに、RAF-FRETプローブの遺伝子を導入し、遺伝子選択マーカーと限界希釈法を用いて、プローブを恒常的に発現する細胞株を作成する。

I-2) 細胞質中のRAF分子の構造の1分子可視化解析法の確立

刺激前、細胞質に存在するRAF分子の構造を1分子毎に検出するため、バースト解析を行う。バースト解析とは、細胞に共焦点照明系を導入し、この励起体積を蛍光プローブが横切る際に発生する光子のバーストを単一光子計測する方法である (Okamoto, 2008)。1バースト中のアクセプターとドナー蛍光分子の光子数の比からFRET信号を見積もることができる。この解析により、刺激前の細胞質中で、RAFの構造分布を計測する。その後、同一細胞に細胞外刺激を与えて、RAF局在変化応答の有無を検出する。この検出には、細胞膜上で1分子可視化に成功している全反射蛍光顕微鏡を用いる。

I-3) RAF分子の構造分布の計測と細胞状態の定義

RAF-FRETプローブ由来の1分子FRET信号のヒストグラムは、RAF分子の構造分布をあらわしている。RAFの多分子平均構造 (ヒストグラムの平均値) は、EGF刺激後のRAFの局在変化応答と相関関係をもつことを確認しているため、細胞状態の指標に用いる。この値以外にも、細胞毎にばらつく値に注目し、細胞状態を定義する指標とする。これらの値の組み合わせで細胞状態を定義する。

I-4) 細胞状態と細胞応答の相図の作成

刺激前の細胞内のRAFの構造分布を細胞毎に計測し、**I-3**の定義に従い、細胞状態を検出する。その後、細胞に、増殖因子EGFなど、RAFの局在変化応答を引き起こす細胞外刺激を与え、RAFの局在変化の有無を判定す

る。多くの細胞で、細胞状態と局在変化応答を対応づけ、目的1「細胞状態と細胞応答の相図の作成」をおこなう。

II) 細胞状態の操作と細胞応答の予測および制御

II-1) RAFの構造分布を指標にした細胞状態の操作

RAF分子の構造分布を変調する細胞操作を探索するため、以下のa~cの処理を試す。**a)** 事前刺激として、EGF, NGF, PMAなど、本刺激と受容体を共有しない因子を細胞に与える。**b)** RAFのキナーゼ候補 (BRAF, Src, FAK, PKC, Akt, PAK) の恒常的活性化型変異体や、特定のキナーゼの阻害剤を細胞に導入して、RAFの特定残基のリン酸化を操作する。**c)** RAFのリン酸化部位に、擬似リン酸化変異やリン酸化を阻害する変異を導入する。a~cの操作後の細胞状態をI-3の定義にもとづき検出する。これにより、目的2「細胞状態の操作」の方法を確立する。

II-2) 細胞状態の操作による細胞応答の予測と制御

細胞状態が細胞毎に固定された性質か、可変かを明らかにするため、細胞状態の持続時間を計測する。これにより、細胞の状態の継続時間（細胞状態の記憶時間）や遷移後の細胞状態をしらべる。また、細胞状態を検出しながら、II-1で確立した細胞の操作を行い、I-4の相図にもとづき刺激後の細胞応答を予測する。その後、細胞に刺激を与え、RAFの局在変化応答を観察して予測の検証をする。細胞応答が予測と異なる場合は、細胞状態の定義や状態と応答の相図を見直し、より予測の信頼度が向上するよう定義や相図を更新する。これにより目的3「細胞状態の操作による細胞応答の予測および制御」を目指す。

以上の研究を通して、細胞中の情報伝達分子の構造分布が、細胞の増殖、分化、ガン化の運命決定にどのように影響して、細胞応答の不確定性に寄与しているかを提案する。

4. 研究成果

1, 細胞質中のRAF分子の構造の1分子可視化解析法の確立. 細胞質に存在するRAF分子の構造を1分子ごとに検出するため、バースト解析と全反射顕微鏡観察を同一細胞に対して実現する顕微鏡システムを構築した。

2, RAF分子の構造分布の計測と細胞状態の定義. 刺激前の細胞中のRAF分子の構造分布の平均値とEGF刺激後のRAFの局在変化応答との相関関係を多数の細胞で解析することで、RAFの構造を指標とする細胞状態を定義した。

3, 細胞状態と細胞応答の相図の作成. EGF刺激後のRAFの局在変化の有無を細胞応答と捉えて、細胞状態と細胞応答の相図を作成した。以上により、目的1を達成した。

4, RAFの構造分布を指標にした細胞状態の操作. RAF分子の構造分布を変調する細胞操作を探索するため、以下の3処理を試みた。**a)** 細胞の事前刺激 **b)** RAFのキナーゼの活性調節によるRAFのリン酸化状態の操作 **c)** RAFのリン酸化部位への変異導入。これらのうち、b, cにおいてRAF分子の構造分布を変調するための有効な方法を発見した。これにより、目的2を達成した。

5, 細胞状態の操作. 細胞状態を検出しながら、上述4に加え、細胞外液などの細胞培養条件を変調することで、状態操作を実現した。本研究で確立した細胞状態と細胞応答の関係を示す相図にもとづき、操作後の細胞の刺激応答を予測した。その後、細胞に外部刺激を与え、応答予測の検証を行った。以上により目的3の一部を実現した。

6, 細胞内1分子可視化解析法を他の情報処理タンパク質に応用. 本研究で確立した細胞内1分子可視化解析法をRas-MAPK経路の他の情報処理タンパク質の解析に応用した。

以上の研究成果を学会、研究会、シンポジウムで発表し、多くの反響を得ている。本研究で確立した細胞内1分子可視化解析法を総説として発表し、さらに、最新の研究成果を加えて、現在論文発表準備中である。

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 3 件)

- 1, Hibino, K., Hiroshima, M., Nakamura Y., and Sako Y. (2013) Single-Molecule Imaging Measurements of Protein-Protein Interactions in Living Cells. *InTech* Chapter 17, DOI: 10.5772/52386. (査読有)
- 2, Sako, Y., Hiroshima, M., Park, C.-G., Okamoto, K., Hibino, K., and Yamamoto, A. (2012) Live Cell Single-molecule Detection in Systems Biology. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 183–192. (査読有)
- 3, Haga, Y., Ishii, K., Hibino, K., Sako, Y., Ito, Y., Taniguchi, N., and Suzuki, T. (2012) Visualizing specific protein glycoforms by transmembrane fluorescence resonance energy transfer. *Nature Communications* 19, 907. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- 1, Hibino, K., Ueda, M., and Sako, Y. Single-cell imaging analysis of conformation and function of disease-associated RAF mutants. (2015. 6. 30-7. 2) 第 76 回日本細胞生物学会 タワーホール船堀 (東京・江戸川区)
- 2, Hibino, K. RAF & Cell-Fate determination ~Towards Prediction & Control of Cellular Response~ (2014. 12. 2) Biological Symposium 国立遺伝学研究所 (静岡県・三島市)
- 3, 日比野佳代. RAF のコンフォメーションと細胞の運命決定～細胞動態の予測と制御に向けて～. (2014. 10. 9-10) 研究会「理論と実験」2014 広島大学 (広島県・西条市)
- 4, 日比野佳代, 上田昌宏, 佐甲靖志 Conformation and function of disease-associated RAF mutants. (2014. 10.

9-10) 研究会「理論と実験」2014 広島大学 (広島県・西条市)

- 5, Hibino, K., Ueda, M., and Sako, Y. Conformation and function of disease-associated RAF mutants (2014. 9. 25-27) 第 52 回日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- 6, Hibino, K., Okamoto, K., Ueda, M., and Sako, Y. Polymorphism of a signaling protein RAF regulates cellular responses. (2013. 10. 28-30) 第 51 回日本生物物理学会年会 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- 7, Hibino, K., Okamoto, K., Ueda, M., and Sako, Y. Single-molecule analysis of signaling protein RAF-conformation in living cells. (2013. 5. 20-22) 日本顕微鏡学会 第 69 回学術講演会 ホテル阪急エキスポパーク (大阪府・吹田市)
- 8, 日比野佳代. 情報伝達タンパク質 RAF の構造と細胞応答. (2013. 3. 21-22) 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 V」独立行政法人理化学研究所 (埼玉県・和光市)
- 9, 日比野佳代. Signaling Molecule RAF: its conformation and cellular response. (2012. 11. 24-25) 定量生物学の会 第 5 回年会 東京大学 駒場 II キャンパス (東京都・目黒区)
- 10, Hibino, K., Ueda, M., and Sako, Y. The conformation of signaling molecule RAF and the cellular response. (2012 11. .6-7) RIKEN Quantitative Biology Center Inaugural Symposium "Towards Whole-Cell Modeling" Kobe International Conference Center (Kobe, Hyogo)
- 11, 日比野佳代. 細胞内スペクトル計測を用いた情報伝達タンパク質 RAF の構造と EGF 応答の相関解析. (2012. 10. 5-6) 理論と実験研究会 広島大学 (広島県・西条市)
- 12, 日比野佳代, 上田昌宏, 佐甲靖志. Correlation between the molecular

conformation and EGF response of RAF by FRET imaging in individual cells. (2012. 9. 22-24) 第 50 回日本生物物理学会年会 名古屋大学・東山キャンパス (愛知県・名古屋市)

- 13, 日比野佳代, 上田昌宏, 佐甲靖志.
Correlation analysis of the molecular conformation and signal-responsiveness of RAF by FRET imaging in individual cells. (2012. 5 .28-31) Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology Kobe International Conference Center (Kobe, Hyogo)
- 14, 日比野佳代. 情報伝達タンパク質 RAF の構造調節による細胞応答制御. (2012. 4 .12-13) 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 IV」 独立行政法人理化学研究所 (埼玉県・和光市)

[図書] (計 2 件)

- 1, 日比野佳代. (2014) 1 分子 FRET 計測 「**1 分子生物学**」原田慶恵・石渡信一編, 205–213. DOJIN BIOSCIENCE SERIES, 化学同人 (査読有)
- 2, 佐甲靖志, 廣島通夫, 日比野佳代. (2014) 細胞内情報処理反応の 1 分子計測: タンパク質ダイナミクスと分子認識 「**1 分子ナノバイオ計測**」野地博行編, 180–189. 化学同人 (査読有)

[その他]

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/csd/ja/publication/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

日比野 佳代 (HIBINO, Kayo)

独立行政法人理化学研究所 生命システム研究センター・研究員

研究者番号: 40435673