

研究課題別評価

1.研究課題名 細胞内 1分子測定で見る増殖と分化の情報

2.研究者氏名 佐甲 靖志

グループメンバー：一之瀬 純也 (研究期間 H12.10.1. ~ H15.9.30.)

森松 美紀 (研究期間 H13.4.1. ~ H15.9.30.)

3.研究の狙い：

発生・老化の過程で根本的に重要な細胞レベルのタイムプログラムは増殖と分化である。この両者は細胞の運命決定としては正反対の現象であるが、細胞内分子過程には密接な関係があり、たとえば上皮成長因子(EGF)による増殖と神経成長因子(NGF)による分化のプログラムは、ほとんど共通の細胞内情報伝達回路によって担われている。したがってプログラム制御のしくみを解明するには、この回路における増殖と分化それぞれの情報処理反応を定量的に解析しなければならない。本研究はこれを目的としておこなった。

我々の開発した細胞内 1分子測定法を用いて、情報処理の要であるチロシンリン酸化酵素 EGF 受容体および NGF 受容体と、低分子量 GTPase Ras の反応ダイナミクスを 1分子計測する。同時に、細胞のカルシウム応答、軸索伸長および細胞質の Raf1 の細胞膜への局在変化などを出力と捉えて、情報回路の大局的な応答特性を測定することを具体的目標とした。

長期的には、両者の結果を、分子の反応と回路の反応の動的相補性という観点から統合することによって、増殖と分化それぞれの情報処理の特性を明らかにすることを目指していた。

4.研究結果：

(1)細胞内 1分子計測法の開発 改良

複数分子種を同時観察するために、1分子蛍光顕微鏡を多色化した。2色同時観察によって受容体の活性化や、分子間相互作用の検出などを行った。3色同時観察を可能にする装置まで製作した。

細胞表面など凹凸を持った試料をむらなく観察するための光学系を考案した(上村他特許出願中)。細胞表面への情報分子の結合数計測などに利用できる。

蛍光 1分子観察と落射蛍光観察を同時におこなう顕微鏡を開発した。情報分子の結合の 1分子計測と細胞内カルシウム応答の同時観察が可能になった。(Sako and Uyemura, 2002)

セミ-インタクト細胞技術と 1分子観察技術を最適化し、細胞構造を保ったままで、情報分子間の結合・解離反応速度を解析する方法を開発した。(東大 総合文化、村田昌之氏との共同研究； Sako et al., 2003)

細胞内での 1分子動態(分子数、分子密度、拡散速度、会合状態、結合時間など)の計測をより正確、かつ高速・自動化するためのソフトウェア開発をおこなった。(阪大・生命機能、渡邊朋信、小塚淳氏との共同開発； Hibino et al., 2003)

細胞に安定した局所的刺激、濃度勾配刺激を与える方法を開発した。NGF による細胞伸長反応の解析に利用した。(柴田ら学会発表)

(2)EGF 受容体の 1分子反応計測

EGF 受容体の活性化増幅・伝搬反応の分子機構の解析・受容体の活性化の 1分子計測により

個々の EGF 結合部位での活性化受容体分子数の増加、細胞膜全体の活性化部位数の増加という2種の信号増幅が起ることが示された。この増幅過程は膜受容体の動的組織化(クラスター化)と熱ゆらぎによる膜上での速報拡散運動を利用して起こることが分かった。また、活性化の速度は細胞膜上で局所により大きく異なっており、受容体分子の活性が分子毎に多様であることが分かった。活性化が受容体分子間の相互作用で増幅伝搬することから、増幅率は細胞膜の受容体密度に依存すると考えられる。従来の実験に使用してきた A431 細胞は細胞当たり 3×10^6 個の受容体分子を持つ。 5×10^5 個 (A431 の 1/60) の受容体を持つ HeLa 細胞で受容体の活性化を計測したところ、生細胞では活性化増幅が観察されなかった。しかし、セミインタクト化して細胞質を流出させた細胞で計測を行ったところ、HeLa においても活性化増幅が起こり、細胞当たりほぼ同一の EGF 結合数で比較した増幅率は A431 細胞と同程度であった。生細胞とセミインタクト細胞の違いは、細胞質の脱リン酸化酵素の有無に依ると考えられ、活性化の増幅率は、受容体密度と逆反応速度のバランスにより決定されていると思われる。また、EGF が結合した受容体の内、活性化しているものは約 30%に過ぎないこと、この 30%に由来する活性化が約 10 倍に増幅されていることが明らかになった。以上の結果をまとめた論文を執筆中である。(Ichinose et al., 投稿準備中)

EGF 受容体と SH2 蛋白質の相互作用キネティクスの細胞内計測 :リン酸化された EGF 受容体は Shc, Grb2, c-Cbl, PLC γ など SH2 蛋白質と相互作用し、情報処理を行う。活性化型受容体と mSos1(Ras の Guanine nucleotide exchange factor)を繋ぐアダプター蛋白質 Grb2 との分子間相互作用の 1分子可視化計測を行った。蛍光色素(Cy5)で標識した EGF でセミインタクト細胞中の EGF/EGFR 複合体の位置を 1分子検出し、リコンビナント精製して N-末端を蛍光色素(Cy3)で標識した Grb2 との結合・解離を観察した。両蛍光色素の共局在の時系列変化から、EGFR と Grb2 との結合速度定数、解離速度定数を求めることができた。両方向の反応とも複数の速度成分を持つことが明らかになった。各成分の重み付き平均から推定した平衡状態の解離定数は、従来受容体の断片を用いて in vitro 計測された解離定数とほぼ一致した。連続した2回の結合・解離反応時間の相関関係を解析し、複数の反応様式が、各回の反応毎にランダムに選択されていることが明らかになり、情報伝達が複雑な相互作用変化によって制御されている可能性が示唆された。EGFR と Grb2 の認識反応が受容体蛋白質全長が正しく細胞膜構造に保持されたままで計測されたことは初めてであり、反応速度定数は従来の in vitro 計測においても求められていなかった。今回の 1分子計測による分子間相互作用パラメータ計測法は、細胞内分子システム研究の重要な技術となり得る。(森松他、学会発表)

(3) NGF 受容体の 1分子反応計測

蛍光 NGF の 1分子観察によって、神経成長円錐での NGF/NGF 受容体複合体の形成と運動を解析した。複合体は、極めて速い拡散運動、成長円錐基部へ向けた方向性輸送など、いくつかのモードで複雑に運動することが分かった。(都立臨床研、原田慶恵氏ら、産総研関西、田口隆久氏らとの共同研究、谷ら学会発表)

NGF は TrkA, p75 の 2種の受容体を持つ。p75-GFP を PC12 細胞に発現させ、1分子運動解析を行った。NGF の添加によって、不動成分が 5%から 15%に増加するとともに、可動成分の拡散係数は約 2倍に増加すること、すなわち NGF による受容体の運動様式の分化が観察された。(由井ら学会発表)

(4) Ras, Rho family の反応計測

Ras, Raf1 の 1分子計測 :Ras は EGF, NGF の下流で共通に働く低分子量 GTPase であり Ras

の活性化は細胞質の Raf1 を細胞膜へ局在変化させることによって Raf1 のリン酸化による活性化を促す。HeLa 細胞に GFP, YFP を融合した Ras, Raf1 を発現させることにより EGF による Raf1 の局在変化を可視化し、また、Ras, Raf1 の細胞膜における挙動を 1 分子計測した。EGF の結合が細胞膜全体でほぼ均一に起こり、数分後には EGF の細胞内取り込みが起こるのに対し、Ras, Raf1 の相互作用部位は空間的に不均一であり、また、Ras の存在するすべての場所に Raf1 が結合する訳ではないこと、Ras, Raf1 の相互作用が、局所的には生化学的に計測されていたよりも数倍長く持続し、そのような部位から細胞の形態変化が起こること、長期的な相互作用部位に置いても個々の Raf1 分子は細胞質と細胞膜の間で常に交換されていること、Raf1 の膜滞在時間には 2 つの成分があり、その一方は長期集積部位のみに限られていることなどを明らかにした。これらは、Ras の活性化と分子認識が細胞内の時間・空間特異的に制御されていることを示唆している。(Hibino et al., 2003)

Rho, Rac は Ras の下流で働き、細胞の伸展、収縮運動を制御する情報分子である。細胞内で Rho の活性化(GTP 結合)を可視化計測するために、YFP-Rho と蛍光 GTP の結合を蛍光共鳴エネルギー移動により画像化する方法を開発した。PC12 細胞を NGF 刺激すると、細胞-基質間接着部位に GTP-Rho が濃縮することを発見した。一方、GTP-Rac は葉状仮足やその他の細胞膜に集積した (Murai et al., 2003; Miyachi et al., 投稿中)。

(5) 細胞内カルシウム応答

HeLa 細胞においてカルシウム応答と EGF の結合数の関係を測定した。細胞集団のうち半数の細胞にカルシウム応答を引き起こす EGF 結合数 (応答率 50%) は 300 分子であり、このとき 100 分子は単量体として、残りの 200 分子は多量体として受容体に結合した。応答率は多量体の結合数と比例関係があった。通常の HeLa 細胞は 5×10^4 程度の EGF 受容体を持つが EGF の連続投与による down regulation で細胞当たり 10^4 まで受容対数を減らしても EGF 結合数当たりの応答率はほとんど変化しなかった。いずれの場合も EGF 結合数の減少とともに反応開始時間は遅延したが、その後の反応の大きさは EGF 結合数によらず、EGF 受容体によって活性化された PLC β の反応による IP $_3$ の蓄積をまって、それ以降の反応は on/off 的に進行することが分かった。(Uyemura et al., 投稿準備中)

(6) NGF による軸索伸長

神経伸長モデルとして PC12D 細胞の NGF による突起伸長を使い、神経突起の形成部位決定と伸長機構を明らかにするために、細胞周辺部の運動と突起伸長の関係を計測した。NGF 添加後数分で広く細胞周囲に葉状仮足の形成が起こり、1 時間後には 1 ~ 数本の軸索様突起が伸長する。将来的に突起伸長が起こる部位においては、NGF 添加 5-15 分後の葉状仮足の伸展収縮運動周期が有意に短縮していた。これに対し、伸展および収縮の速度と継続時間は部位による差が認められなかった。すなわち、伸展収縮 1 周期あたりの伸長は、細胞周囲のどこでも均一であるが、将来的な伸長部位では運動周期の短縮により、他の部位よりも速い伸長がおこる。伸長には伸展収縮のダイナミクスが重要であり、伸展運動が一方向的に促進されるのでは無いことが分かった。(柴田ら、学会発表) NGF による運動周期短縮の分子機構を研究するため、蛍光 NGF の 1 分子観察により、NGF 入力と伸展収縮運動変化の関係を計測している。

(7) その他

細胞性粘菌の走化性応答反応の計測 (さきがけ上田昌宏氏との共同研究) : 細胞性粘菌の cAMP による走化性応答反応において、cAMP と受容体の解離速度を 1 分子計測し、細胞の前後軸に沿って前端では解離速度が速く、後端で遅いことを発見した。分子の結合密度に空間的差違

はないが、反応速度を制御することによって前後軸の形成、運動方向の安定化が図られていることを明らかにした。(Jeda et al., 2001)

CD44 の会合体形成による Rac の活性化計測 (阪大医 村井稔幸氏との共同研究) : CD44 の会合が CD44 細胞外部位の切断を通してがん細胞の運動、浸潤を起こす過程において、Rac の活性化が起こることを蛍光共鳴エネルギー移動法によって計測した。(Murai et al., 2003)

細胞性粘菌のミオシンフィラメントの動態解析 (山口大 理、祐村恵彦氏との共同研究) : 走化性応答、細胞分裂中の細胞内でミオシン II のフィラメントの動態を観察している。空間的に制御されたミオシンモノマーとフィラメントの動的平衡によってフィラメントの細胞内局在が起こることなどが明らかになりつつある。(祐村他、学会発表)

その他、阪大 医、神戸大 理、九大 医、東レリサーチセンターとの共同研究が進行中である。

5. 自己評価 :

細胞内 1 分子計測法をはじめとする顕微計測法に関しては、かなりの進展があり、分子数、分布、動態、リン酸化等の修飾、分子間相互作用などを計測することが可能になった。すなわち、今や、細胞内情報処理システムの反応素過程のほとんどを定量することが原理的に可能である。これらの方法を利用して、分子素子として情報処理システムの要である細胞膜受容体(EGFR, NGFR)と低分子量 GTPases (Ras, Rho family)の動態・反応を計測した。EGFR に関しては、分子のシステム化を利用した活性化、分子認識など、情報処理反応のかなりの部分を明らかにすることができ、現在論文を準備している。GTPase の分子動態、分子認識にも 1 分子レベルでの反応の空間的多様性などをみることができた。NGF 受容体(TrkA, p75)は発現系構築の難しさから EGF 受容体ほど研究が進展しなかったが、p75 の 1 分子動態計測など、徐々に結果が出始めている。以上のように、分子素子の反応計測に関しては相当の進展があった。

分子システムの反応としては、細胞のカルシウム応答システムの EGF 入力に対する応答関数を求めた。また、神経細胞分化にともなう形態変化を定量し突起形成との関係を計測した。結果をとりまとめているところであるが、細胞反応の研究に定量性という視点を導入できるものと期待している。

以上のように、分子素子、分子システムの反応計測ともに一定の成果を得ることができたが、多くの反応素過程を含む複雑な反応システムを対象としているため、決定すべきパラメータはまだ多数存在する。また、分子システムの入出力関係の計測もある程度可能になったが、素子の反応を闇雲に計測すればシステムの応答特性を説明できるというものではない。素子とシステムという2つの階層をどのように結びつけて全体を理解するかが問題である。残念ながら、この問題にあまり踏み込むことができなかったが、以下の2つのアプローチを開始した。ひとつはセミインタクト細胞技術を利用した情報処理システムの再構成系の構築である。要素数を最小にし、かつ要素濃度を自由に制御して反応計測を行い、これを分子ネットワークシミュレーションと比較検討することを計画している。また、個々の反応の詳細に拘泥することなく一般論として分子システム、情報処理の原理を解明することが基礎生物学としては最重要であると考え。この線に沿って、複雑系物理学との融合を目指して広島大 柴田達夫、東京大 金子邦彦氏らと定期的に意見交換を行っている。

本研究の進展につれて明らかになってきたことは、分子、分子システム、細胞レベルいずれにおいても、細胞情報処理反応には大きな多様性とゆらぎがあることである。分子反応の多様性やゆらぎが情報処理に利用されているのか否か。細胞反応の多様性、ゆらぎがどのような法則で推

移すのかを研究することが今後の課題である。幸いにして、平成15年度より5年間、文部科学省リーディングプロジェクト「細胞・生体機能シミュレーション」の一部として、生命機能可視化技術の開発を行うこととなり、本研究の研究グループを新プロジェクトへ移行することができた。本研究で得られた成果を継続・発展させることを目指して研究を進める。

6. 研究総括の見解：

一分子イメージング領域におけるトップリーダーと目される阪大・柳田研究室における助教授として、実質的且つ高度な活動を行ってきた。本研究領域に選ばれてから、受容体およびチャネルなどの機能に対してブレークスルーに値する画期的な成果をあげたことは高く評価できる。その評価もあってか、今後は指導者として名実ともに独立した活動を続けることになった。

7. 主な論文等：

論文 総説

1. Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P. N., and Yanagida, T. (2001) Single molecule analysis of chemotactic signaling in Dictyostelium cells. *Science*, 294, 864-867.
2. Sako, Y. and Uyemura, T. (2002) Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells. *Cell Struct. Funct.*, 27, 357-365.
3. Sako, Y. (2002) Imaging of biological molecules. 2. Membrane receptors. in "Nano-Optics" Kawata, S., Ohtsu, M., and Irie, M. ed. pp.209-215. Springer.
4. Hibino, K., Watanabe, T., Kozuka, J., Iwane, A. H., Okada, T., Kataoka, T., Yanagida, T., and Sako, Y. (2003) Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to c-Raf1 visualized on the plasma membrane of living cells. *Chem. Phys. Chem.*, 4, 748-753.
5. Sako, Y. and Yanagida, T. (2003) Single-molecule visualization in cell biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, SS1-5.
6. Sako, Y., Ichinose, J., Morimatsu, M., Ohta, K., and Uyemura, T. (2003) Single-molecule visualization of cell signaling processes of epidermal growth factor receptor. *J. Pharmacol. Sci.*, 93, 253-258.
7. Murai, T., Miyazaki, Y., Nshinakamura, H., Sugahara, K. N., Miyauchi, T., Sako, Y., Yanagida, T., and Miyasaka, M. (2003) Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* in press.
8. 佐甲靖志 (2001) 上皮成長因子受容体の1分子反応計測 *細胞工学* 20, 678-682.
9. 佐甲靖志 (2002) 一分子イメージング *医学のあゆみ* 200, 1092
10. 上田昌宏、佐甲靖志 (2002) GPCR型走化性受容体の細胞内1分子可視化解析 *バイオイメージングでここまで理解る* 楠見明弘、小林剛、吉村昭彦、徳永万喜洋編 *実験医学別冊* pp.99-103.
11. 宮内崇行、日比野佳代、佐甲靖志 (2002) 蛍光共鳴エネルギー移動のイメージング *シリーズ・バイオサイエンス新世紀 第12巻 感覚器官と脳内情報処理* 御子柴克彦、清水孝雄編 共立出版 pp.210-217.
12. 上田昌宏、佐甲靖志 (2003) 1分子と細胞 *ナノテクノロジーハンドブック IV 編 バイオ化学へ使う* ナノテクノロジーハンドブック編集委員会編 pp.123-127 オーム社
13. 佐甲靖志 (2003) 細胞内情報処理過程の1分子観察 *生理学会誌* 65, 277-282.

招待講演

1. 佐甲靖志、蛍光 1分子可視化法の細胞生物学への応用 (2000) 第53回日本細胞生物学会大会 細胞機能を見て、知る」福岡
2. 佐甲靖志、細胞内情報処理過程の 1分子計測 (2001) 第13回バイオエンジニアリング講演会 単一細胞における物理現象の計測」仙台
3. Sako, Y., Single molecule imaging of cell signaling reactions in the plasma membrane. (2002) "Moving beyond the boundaries: New trends of biotechnology in the post-genomic era" Kazusa
4. Sako, Y., Single molecule analysis of cell signaling in living cells using total internal reflection fluorescence microscopy (2003) Japan-France conference on molecular photonics and biophotonics at micro and nano-scale JFC2003. Awaji

他37件

口頭発表

1. 佐甲靖志、上田昌宏、一ノ瀬純也、宮内崇之、上村武、日比野佳代、太田康友、柳田敏雄、細胞内情報伝達反応の 1分子観察 (2000) 日本生物物理学会第38回年会 仙台
2. 佐甲靖志、箕口滋、吉村昭彦、柳田敏雄、細胞膜の上皮成長因子受容体クラスターの動的構造変化 (2001) 第54回日本細胞生物学会大会 岐阜
3. Sako, Y., X. Yu, E. Mekada, and T. Yanagida. (2002) Accelerated signal transduction depending on pre-clustering of epidermal growth factor receptor: a single-molecule analysis. 46th Annual meeting of the American Biophysical Society, San Francisco, USA.
4. 森松美紀、太田康友、村田昌之、柳田敏雄、佐甲靖志、蛍光 1分子観察による上皮成長因子受容体とアダプター分子間相互作用様式の解析 (2003) 日本生物物理学会第41回年会 新潟

他42件

特許出願

1. 上村武、佐甲靖志、柳田敏雄 (2002) 新規光学系、及びその光学系を備える顕微鏡 特願 2002-09915