

細胞内情報伝達の再構成系における非線形反応の解析

●佐甲 靖志

独立行政法人理化学研究所細胞情報研究室

<研究の目的と進め方>

我々は、分子ダイナミクスと分子間相互作用キネティクスの1分子計測などの可視化計測法を開発・応用して、分子ネットワークの入出力特性を研究している。本研究では、細胞内分子システムの再構成系を新たに開発して、細胞増殖情報を処理するEGF-Ras-MAPKシステムに見られる非線形応答の分子機構に着目した研究を行ってきた。EGF-Ras-MAPKシステムを含む種々の細胞内反応、特に細胞内情報処理反応の至る所で、過剰応答性（信号増幅）、時・空間的反応分化（極性形成）、振動（周期形成）、双安定性（記憶）などの非線形応答現象が観察されている。これらの非線形応答現象は、反応システムを特徴付け、生物の示す高次機能の根幹となるものであり、その分子メカニズムの解明は生命システムの理解へ向けて特に重要な研究課題である。

本研究の研究期間前半には、EGF-Ras-MAPKシステムの過剰応答性の応答関数およびシステムを伝達するゆらぎ（ノイズ）の解析を行った。さらに、細胞の高次機能を操作可能な状態に再構成し、定量的な反応解析を行うことを目標に、構成要素の濃度や反応性を改変した再構成系でのシステム応答や素反応解析を行った。

後半では、前半の研究で開発した方法や得られた結果に基づいて、EGF受容体の活性化増幅とERK活性化に見られる双安定性という2つの非線形応答現象を、それぞれセミ・インタクト細胞内および大腸菌内に再構成し、1分子計測、可視化計測によって非線形性の性質と、非線形性を生むメカニズムを解析することを目標とした。また、これらの計測と比較検討するためのインタクト細胞（生細胞）における計測やシミュレータの開発を目標とした。

<研究開始時の研究計画>

EGF-Ras-MAPKシステムの過剰応答性の解析

我々は、先行する特定領域研究において、ヒト上皮ガン細胞由来の培養細胞A431の細胞膜を透過性にしたセミ・インタクト細胞に、蛍光蛋白質CFPを融合したERK(MAPKの1種)を含む改変細胞質画分を加えて、EGF、ATPの両者に依存してCFP-ERKの細胞核移行が起こる再構成系を構築した。

この再構成系において、EGF-Ras-MAPKシステムの応答関数すなわち、細胞外液のEGF濃度（入力）に対するERKの核移行量（出力）を計測する。カエル卵母細胞の別種のMAPKカスケードでは、大きな過剰応答性が報告されており、Raf-MEK-ERKによるMAPKカスケードを含むEGF-Ras-MAPKシステムにも、過剰応答性が期待される。

EGF-Ras-MAPKシステムを伝搬するゆらぎの解析

細胞内情報処理系に関与する分子数は少なく、分子反応は確率的におこるので、情報処理の素反応には無視できない数のゆらぎが存在すると予想される。素反応がカスケードをつくることにより、上流反応の出力ゆらぎは下流反応の入力ゆらぎとなり、下流

反応そのものが内在的に持つ反応ゆらぎとの関係で、ゆらぎは変形されながらカスケードを伝搬する。

EGF-Ras-MAPKシステムの上・中・下流反応として、EGF受容体(EGFR)の活性化認識、Rasの活性化認識、活性化ERKの核移行を可視化計測する実験系を開発し、それぞれの反応の時間ゆらぎを、再構成系および生細胞で実測し、反応ゆらぎの伝搬に関する理論との比較検討を行う。

再構成反応系における構成要素の改変

再構成系に含まれる蛋白質濃度の制御および、再構成系への人工変異蛋白質分子を導入し、素反応やシステム応答の変化を計測する。システム応答の制御を目標とする。Grb2, Raf1, MEK1, ERK2などの分子濃度を変動させて解析を行う。EGFR, Rasについては変異体遺伝子を保持しており、変異体発現細胞をセミ・インタクト化して計測を行う。

EGF受容体の活性化増幅

EGFRのリン酸化と脱リン酸化を解析するための再構成システムを構築する。EGFRを発現する細胞をセミ・インタクト化し、リン酸化反応の基質となるATPおよびATP再生系と、脱リン酸化酵素、活性化を読みとるために蛍光色素標識したGrb2(Cy3-Grb)からなる人工細胞質を加える。EGFによって再構成系を刺激し、受容体のリン酸化反応を1分子計測する。

我々は以前、細胞当たりのEGF結合数に対するEGFRの活性化に反応増幅が起こることを発見した(Ichinose et al. BBRC, 324:1143, 2004)。EGFRの活性化の増幅と伝搬には、細胞膜におけるEGFRの動的会合体形成が重要であると予想している。EGFR-GFPの細胞膜上での動態（会合体分布と形成・解消、拡散運動）を1分子計測し、反応拡散モデルによって、細胞膜をin silico再構成する。

ERKの活性化反応の解析

ERKはMEK(MAPKK)による2重リン酸化で活性化し、MKPによる脱リン酸化で不活性化する。2重リン酸化・脱リン酸化は、MEK活性に対するERKの活性化応答に過剰応答性をもたらす。また、2重リン酸化・脱リン酸化それぞれが、ERKとMEKまたはMKPの2回の相互作用を必要とする場合、ある反応パラメータ領域において、ERKの活性化量に双安定性が生じると予想されている。

ERKの活性化、不活性化反応を大腸菌内に再構成する。菌体を極小体積の試験管として利用することにより、内在的な蛋白質発現量ゆらぎによって、多数の反応条件を自動的に生成させ、可視化により並列計測する。恒常的なリン酸化活性を有するMEK断片、MKP、活性化(2重リン酸化)を検出するために設計した蛍光ERKプローブの3者を大腸菌に共発現させて再構成系をつくる。計測結果は、反応ゆらぎを含む反応シミュレータで解析する。

<研究期間の成果>

EGF-Ras-MAPKシステムの過剰応答性の解析

A431細胞をストレプトリシンO (SLO) 処理することにより、細胞膜が抗体程度の分子量まで透過するようなセミ・インタクト細胞を調整することが可能になった。セミ・インタクト細胞に別途調製した細胞質画分、ATP、ATP再生系 GTP、CFP-ERK2 および MEK1 を加え、様々な濃度の EGF で刺激して CFP-ERK の細胞核/細胞質濃度比を個々の細胞について計測した。このシステムでは、生細胞で見られる活性化受容体の細胞内取り込み・消化による入力の減衰が起こらないため、入力を受容体のリン酸化酵素活性と、細胞質の脱リン酸化酵素活性の釣り合いで決定される定常状態となり、結果として再生系で ATP 濃度が維持されている間、ほとんどの分子の活性化量が活性化反応と不活性化反応の釣り合った定常状態に保持される。このような反応条件は生細胞中とは異なっているが、別の見方をすると生細胞では不可能な定常状態計測が可能であり、反応システムの解析においてはむしろ有利な点を持っている。

各 EGF 濃度での定常状態における ERK の核移行量を定量することにより、EGF 濃度と ERK 移行量の関係 (応答関数) を求め、ERK の核移行量が 1nM EGF 付近で急激に立ち上がる過剰応答性 (ultrasensitive) の反応であることを確認した。過剰応答性反応を表現する Hill の式で応答関数を近似し、 $K_M=0.56$ nM, Hill 係数 = 34 というパラメータを得た。 K_M の値は従来報告されてきた EGF と EGFR の解離平衡定数に近い。Hill 係数は、我々が生細胞で計測した EGF による細胞内カルシウム応答の Hill 係数 (3.9) に比べてかなり大きく (Uyemura et al. 2005)、EGF-Ras-MAPK システムに含まれる Raf-MEK-ERK の MAPK カスケードも、Ferrell らによって計測されたカエル卵母細胞の別種の MAPK カスケードと同様に、2桁以上の Hill 係数を持っている可能性を示唆している。大きな過剰応答性を反映して、個々の細胞で見ても反応は全無的であり、中間的な核移行量を示す細胞はほとんど見られなかった。生体内での EGF 濃度はサブ nM オーダーと言われており、このようなシステムを持つ細胞の集団は生体内では応答する細胞としない細胞に二分されてしまう可能性が高い。このことの生理的意義は今後考えていく必要がある。

EGF-Ras-MAPKシステムを伝搬するゆらぎの解析

EGF の結合した受容体 (EGFR) は相互リン酸化によって活性化される。EGFR リン酸化を特異的に認識する細胞質蛋白質 Grb2 に蛍光色素 (Cy3) 標識を施して再構成系に導入することにより、EGF の活性化を 1 分子計測で定量できる。細胞膜上で EGFR と MAPK カスケードの中間に位置する Ras の活性化も同様に、活性化された Ras を認識して結合する細胞質蛋白質 RalGDS の Ras 認識部位 (RBD) に GFP を融合した GFP-RalGDSRBD によって計測できる。

生細胞内においても、EGFR の活性化を GFP-Shc の細胞質から細胞膜への移行、Ras の活性化を RalGDS 同様に Ras の活性化を認識する GFP-Raf の細胞質から細胞膜への移行、ERK の活性化を GFP-ERK の細胞質から核への移行によってそれぞれ計測できる。これらの定量に必要な蛍光標識蛋白質や、GFP 融合蛋白質を作製し、また、これらの GFP 融合蛋白質を安定に発現する細胞 (HeLa および PC12) を樹立した。

生細胞で EGFR の活性化が脱リン酸化や細胞内への取り込みと消化により一過性になるのに対し、再構成系における計測では定常的な入力状態を実現することができるため、1 分子計測を利用して定常状態での反応ゆらぎ計測が可能である。セミ・インタクト細胞の再構成系で単位面積当たりの Cy3-Grb2 あるいは

GFP-RalGDSRBD の結合分子数変動を計測し、EGFR/Grb2 および Ras/RalGDS の情報伝達反応のゆらぎを計測したところ、平均結合量を 1 と規格化して、Grb2 では 0.008 の反応ゆらぎ (rms)、RalGDS では 0.02 の反応ゆらぎが観察された。また、後者の反応ゆらぎの時定数がより大きくなっていった。過剰応答性を示す反応カスケードにおいては、Shibata & Fujimoto の解析 (PNAS 102:331, 2005) により、カスケードの後段においてより大きくゆっくりした反応ゆらぎが現れることが予想されているが、今回の 1 分子計測結果は定性的にこれと一致している。すなわち EGF-Ras-MAPK システムの過剰応答性において、従来他の経路で示されているような MAPK カスケードの応答性に加えて、EGF-Ras システムによる寄与があることが示唆された。

一方、生細胞における計測では、反応が最大値を迎える時間を EGF 濃度の関数として表すと、その細胞間ゆらぎ (SD/average) は、Shc, Raf においては EGF 濃度 0.3 nM に、ERK では EGF 濃度 3 nM に最大値を持ち、これらの濃度付近で大きな傾きを持つ過剰応答性の存在が示唆された。これらの濃度値は再構成系における過剰応答性の閾値 0.56 nM に近く、再構成系と生細胞で一致した結果が得られたことは、再構成系の妥当性を示している。また、反応経路の上流 (Shc)・中流 (Raf) と下流 (ERK) が異なる EGF 濃度に反応閾値を持つことが示唆されたことは、上流の過剰応答性による過剰ノイズを下流に伝わりにくくするために、上・下流に閾値のズレが生じていることを予想させる。

生細胞中で反応の持続時間の細胞間ゆらぎを計測したところ、低濃度 (< 0.03 nM) EGF の側で中流域のゆらぎが下流に比べて大きいことがわかった。反応持続時間は主として不活性化 (この場合 GTPase または脱リン酸化) 反応の速度で決定されていると考えられるが、不活性化反応においても中流の反応ゆらぎを容易には下流に伝わりにくくする反応システムが存在すると思われる。

再構成反応系における構成要素の改変

再構成系に加える人工細胞質に含まれる MEK と ERK の濃度比を変化させて ERK の核移行量を計測することにより、MEK が ERK の数倍以上存在するときに、EGF 依存的な ERK の分布変化が最適化されることがわかった。これは静止時においては MEK が ERK と複合体を形成して ERK の核輸送を阻害しているが、EGF 刺激によって起こる MEK の活性化 (リン酸化) が ERK のリン酸化を起こすと、リン酸化 ERK が MEK から解離して、活性化依存的な ERK の核移行が開始されるためであると考えられる。言い換えると、MEK/ERK 比が低い時には、非活性型の ERK の一部は細胞質と核を循環している。生細胞の中で ERK 循環が起こっているとすると、この循環が情報伝達効に与える影響は興味深い問題である。

野生型 EGFR もしくは EGFR の変異体として、Grb2 に対する主要な結合部位のうちチロシン 1068 をフェニルアラニン置換したものを、内在性 EGFR を持たない CHO-K1 細胞に発現させた再構成系で、EGFR と Grb2 との認識反応解析をおこなった。その結果、野生型・変異体いずれの受容体も Grb2 との結合反応、解離反応双方に多状態性を示した。両者の比較から、結合反応の多状態性は局所的な結合部位の差異ではなく、全体的な分子構造に基づいていること、解離反応の多状態性は、EGFR と Grb2 の衝突頻度に依存していることなどが明らかになった。EGFR と Grb2 の親和性 (K_a) は Grb2 濃度が上昇するに連れて低下した。この濃度依存性は EGF-Ras システムにおける過剰応答性を緩和する効果を持っており、EGF-Ras-MAPK システム全体に見られる過剰応答性を考える上で、Ras-MAPK システムの性質がより重要であることを示唆している。

EGF受容体の活性化増幅

EGFRの主要な脱リン酸化酵素は、PTP-1BとCdc25であると言われている。両蛋白質のGFP融合体を作成した。Cy3-Grb2の作成も行った。今後、再構成系における増幅定量を行う。

同時に、活性化増幅に重要と予想されるEGFRの会合体形成を1分子解析している。分子間相互作用を直視するには、通常の蛍光顕微鏡計測の空間分解能は不十分(~200 nm)であるので、光感受性の蛍光蛋白質mKikGRを融合したEGFRでPhotoactivation localization microscopy (PALM)法により20 nm程度の空間分解能で1分子検出を行う方法を開発し、EGFRの会合数分布と会合体の空間分布計測を行った。2量体を単位とする高次会合体が形成されていることを示す結果が得られた。また、細胞膜のコレステロール含有量を減らすと、3量体以上の会合体形成が見られなくなった。一方、EGFR-GFPを用いてEGFR会合体の側方運動計測を行い、静止成分・遅い拡散・速い拡散の3成分が存在すること、会合数と運動成分比には相関がないこと、コレステロール除去により、遅い拡散成分が著しく減少することなどが明らかになった。

現在、以上の結果に基づいたEGFRの動的会合体形成と側方拡散運動のモデル化を行っている。このモデルに、EGF結合とEGFRの活性化を実装し、今後解析する反応増幅・伝搬の再現を試みる。

ERKの活性化反応の解析

ERK、および活性化MEKとMKPを組み込んだ発現プラスミドを構築し大腸菌で発現を行った。各々の蛋白質には色の異なる蛍光蛋白質を融合させ、発現量計測を可能にしている。また、それぞれが異なった発現誘導プロモータシステムに組み込まれており、3者の発現量を制御できる。

蛍光計測により3種の蛋白質の発現が確認された。また、発現誘導システムで、MEKおよびMKPの発現量を10倍程度制御することが可能になった。2重リン酸化ERKを認識する抗体によるWestern blotでMEKとMKPの発現依存的にERKの2重リン酸化が変化することを確認した。蛍光抗体法で個々の大腸菌内のERK活性化量を検出し、過剰応答性の存在を確認した。また、細胞間の反応量分布に基づいた反応ゆらぎの計測が可能になった。

実験に対応した数理モデル解析のため、決定論的および確率的な計算によるERKリン酸化反応解析を行った。決定論的な数値計算(連立微分方程式モデル)において、ERKリン酸化状態に双安定性が現れるパラメータ範囲を求めた。さらにGillespieの方法による確率的な反応シミュレータを構築し、決定論モデルで双安定性が見られた条件で、細胞サイズ(分子数)を変えて、反応ゆらぎの影響をシミュレートした。細胞サイズが大腸菌程度($0.2 \mu\text{m}^3$)以下に減少すると時間オーダーの反応ゆらぎが起こる(すなわち双安定性は消失する)が、哺乳類細胞レベルの大きさでは、リン酸化レベルは100時間を超えて安定に維持されることが予想された。

<国内外での成果の位置づけ>

ゲノム情報を有効に利用し、生命システムを解明するためには、細胞の高次機能を操作可能な状態に再構成し、定量的な反応解析を行うことが必要である。本研究はこれを目標にして行ってきた。我々が開発する実験法は、近年盛んになっている分子システムの計算機シミュレーションと相補的なものである。すなわち、初期条件、境界条件を自由に操作できる再構成系において、細胞内分子システムの反応パラメータを1分子計測で精密に決定

することにより、計算機シミュレーションの精度やモデルの現実性を高めるとともに、相互で観察・予測された現象を検証しあうことが可能になる。

本研究は細胞内1分子計測法と、セミ・インタクト細胞法という独自の研究開発に基づいている。精製した分子を集積して細胞構造を組み立てることは著しく困難である。セミ・インタクト細胞法では、生細胞の細胞質を除き、人工的に再構成した溶液を加えて再構成系を構築する。我々はセミ・インタクト細胞をEGF(上皮成長因子)で刺激し、蛍光蛋白質(CFP)で標識したERK2(MAPK)を活性化して細胞核へ移行させることに成功した。また、細胞内1分子蛍光観察法を改良し、EGFと膜受容体の結合、受容体の活性化と分子認識、Rasの活性化に伴うRaf1(MAPKKK)の局在変化などを1分子計測する方法を開発した。定量的なPALM法によって、膜受容体の会合を蛋白質サイズに迫る分解能で計測することも可能になった。細胞内1分子計測の応用例は増加しつつあるが、ほとんどが蛋白質の運動ダイナミクス計測である。我々は1分子計測を、主に細胞内反応キネティクスの解析に用いているが、我々の方法は最近注目を集めつつあり、細胞内情報伝達反応の1分子キネティクス計測に関する英文の総説や、書籍の執筆・編集を依頼されて作業を進めている。

本研究で取り扱ってきたEGF-Ras-MAPKシステムは、分子システムシミュレーションで最もよく取り上げられている反応系のひとつであるが、実際の細胞内での定量的計測は全く進んでいなかったと言って良い。本研究は情報伝達系において*in vivo*と*in silico*の生物学を定量的に対応づける研究例になると期待している。

大腸菌内におけるMAPKカスケードの再構成は、人工蛋白質分子回路を再構成する試みとしても新規なものである。近年、遺伝子発現ネットワークによる分子回路を大腸菌内に再構成することが盛んになっているが、蛋白質間の分子認識や酵素反応だけで再構成された人工反応回路は、まだほとんど報告例がない。新規遺伝子発現を必要とする回路に比べ、蛋白質反応だけで構成される回路は、高反応速度が期待され、反応系も単純であることから、独自の応用が開けて来るかもしれない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

SLOを用いたセミ・インタクト細胞の再構成系では、実験条件の最適化に最大の困難がある。我々の核移行の実験では、EGF非存在下でも10%程度核移行を起こした細胞が見られ、一方、飽和量のEGF存在下で核移行する細胞は60-70%程度である。この問題を克服するため、細胞膜系や、大腸菌細胞での再構成構築に取り組んできた。

ERKの活性化検出に関しては、当初共鳴エネルギー移動を用いた蛍光プローブを作成して、単一細胞の反応時系列解析を行う計画であったが、プローブ作成が困難であり、現時点では、固定細胞の蛍光抗体法を用いたスナップショット計測の積み重ねで、平均時系列を求めることを考えている。

EGFRの活性化増幅や、ERK活性化の過剰応答性・双安定性に関する計測とモデル化の最終結果はまだ得られていないが、計測・解析方法は確立してきたので、今後も引き続き研究を続ける。

<今後の課題、展望>

EGF-Ras-MAPKシステムが非常に高い共同性を持つ分子システムであることが分かってきた。今後、共同性を支配する反応を同定する必要がある。EGFRの活性化増幅が過剰応答性関与する可能性があるが、一方でEGFR-Grb2反応には過剰応答性を抑制する作用が発見された。また、Rasの下流に位置するMAPKカ

スケードも MEK, ERK の活性化に必要な 2 重リン酸化や、階層性反応によって高い共同性を示すことが予想されている。EGF-Ras システムと Ras-MAPK システムのどちらが優位であるかを決定するには、現在行っている EGFR と ERK の活性化反応の定量とモデル化が必須である。

高い協同性、すなわち全無的な反応は、個々の細胞の運命を明確に決定する上では都合のよい反応である。しかし、生体内での EGF 濃度はサブ nM とされており、我々が求めた K_M 値と同程度である。このようなシステムを持つ細胞の集団は生体内では応答する細胞としない細胞に確率的に 2 分されてしまう可能性が高い。EGF-Ras-MAPK システムは発生過程や、創傷治癒、組織再生などにおける細胞増殖に関与している。今後、個々の細胞の応答と、組織レベルでの体制維持の間の関係を考える必要がある。細胞レベルの応答と、分子反応を単一細胞で対応づけることに着手している。

セミ・インタクト細胞系では、EGF-Ras-MAPK システムの反応は擬似的な定常状態になる。入力制御法を開発することによって、生細胞に類似した反応ダイナミクスを再現することも今後の課題である。細胞内反応の時間制御法につながるかもしれない。

一方で、定常状態を利用して反応システムの詳細な解析を進めることができる。EGF 受容体、Ras の活性は、活性化認識分子の膜結合で 1 分子計測が可能である。これを利用して、分子認識反応の時間ゆらぎ (反応ノイズ) 計測ができるようになった。分子システムの上流 (受容体) から下流 (Ras) へのノイズの伝達の計測は、数学的にインパルス応答計測と等価であり、ゆらぎ計測から分子システムを記述する微分方程式 (システム構造) とその反応パラメータ (システムの機能) を知ることができる。今後、数理生物学者との連携を深め、ゆらぎを利用した反応ネットワーク解析法を開発することができるかもしれない。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0901081745
Yumura, S., Ueda, M., Sako, Y., Kitanishi-Yumura, T., and Yanagida, T.: Multiple Mechanisms for Accumulation of Myosin II Filaments at the Equator during Cytokinesis. *Traffic* 9, 2089-2099 (2008)
2. 0801281546
Miyachi, T., Yanagida, T., and Sako, Y.: 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 (2007)
3. 0801281540
Morimatsu, M., Takagi, H., Ota, K.G., Iwamoto, R., Yanagida, T. and Sako, Y.: 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 (2007)
4. 606091611
Ichinose, J., Morimatsu, M., Yanagida, T. and Sako, Y.: Covalent immobilization of epidermal growth factor molecule for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. *Biomaterials*, 27, 3343-3350 (2006)
5. 608051338
Teramura, Y., Ichinose, J., Takagi, H., Nishida, K., Yanagida, T., Sako, Y.: Single-molecule analysis of epidermal growth factor binding on the surface of living cells. *EMBO J*, 25, 4215-4222 (2006)
6. 701201357

- Sako, Y.: Imaging single molecules for systems biology, *Mol. Syst. Biol.*, doi:10.1038/msb41001001. (2006)
7. 0601262117
Uyemura, T., Takagi, H., Yanagida, T. and Sako, Y.: Single-molecule analysis of epidermal growth factor signaling that leads to ultrasensitive calcium response. *Biophys. J.* 88, 3720-3730 (2005)
 3. 0601262122
Murai, T., Miyauchi, T., Yanagida, T. and Sako, Y.: Epidermal growth factor-regulated activation of Rac GTPase enhances CD44 cleavage by metalloproteinase disintegrin ADAM10. *Biochem. J.* 395, 65-71 (2006)
 9. 0601262130
Shibata, S. C., Hibino, K., Mashimo, T., Yanagida, T. and Sako, Y.: Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 342, 316-322 (2006)
 - 2) 学会発表
 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
 2. Sako, Y.: Single-molecule kinetic analysis of cell signaling reactions. (2008.5.22) Conference on Systems Biology of Mammalian Cells (SBMC2008). Dresden.
 3. Sako, Y.: Single-molecule analysis of EGF-Ras-MAPK pathway. (2008.3.10) OIST Workshop on Systems Biology of MAPK pathways. Onna.
 4. 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
 5. Sako, Y.: Signal transduction across the cell membrane. (2006.12.5) NANO-BIO-TOKYO 2006 Tokyo
 6. Sako, Y.: Single-molecule analysis of RTK signaling networks in living cells (2006.10.12) ICSB2006 RTK Systems Biology Training Course, Tokyo
 7. Sako, Y.: Single-molecule analysis in living cells. (2005.4.21) Human Genome Meeting 2005, Symposium "Emerging technologies" Kyoto
 - 3) 図書
 1. 0901081753
Hibino, K., Hiroshima, M., Takahashi, M., and Sako, Y.: Single-molecule Imaging of Fluorescent Proteins Expressed in Living Cells. *Methods Mol. Biol.* 48, pp.451-460. Lee, J. W. ed. Humana Press, (2008)
 3. 0901081800
Ueda, M., Shibata, T., and Sako, Y.: Signal Transduction Across the Plasma Membrane. "Single Molecule Dynamics in Life Science", pp. 99-116. Yanagida, T. and Ishii, Y. ed. WILEY-VCH (2009)
 - 4) データベース/ソフトウェア
なし
 - 5) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況
なし
 - 6) 新聞発表、その他顕著なもの
なし