

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14509

研究課題名(和文)細胞における膜タンパク質の膜内動態予測法の開発

研究課題名(英文)Comprehensive analysis and prediction of diffusional mobility of membrane proteins in living cells

研究代表者

上田 昌宏 (UEDA, Masahiro)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：40444517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多数の膜タンパク質について生細胞内で1分子拡散動態解析を行い、その運動性(運動モードや拡散性)を網羅的に解析する手法を確立した。その実現のために、(1)ハイスループット化した細胞内1分子顕微鏡の開発、(2)計測対象となる蛍光標識タンパク質の安定発現株の作成、(3)1分子トラッキングと拡散統計解析の自動化を実施した。これら全ての項目について目標を達成した。こうした網羅的解析により、膜タンパク質の構造(膜貫通領域から推定されるタンパク質の半径)と拡散係数の間にSaffman and Delbruckモデルで記述されるような比較的単純な関係が成立する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a method to analyze comprehensively diffusional mobility of many membrane proteins in living cells by using single-molecule imaging analysis. In order to realize the method, we carried out (1) development of an automated single-molecule imaging microscope, (2) preparation of cells expressing fluorescently-labelled target proteins stably, (3) development of software for statistical analysis of diffusion based on the data obtained by single-molecule tracking. Through such comprehensive analysis, we found a relatively simple relationship between the structure of the membrane protein (the protein radius estimated from the number of transmembrane alpha helices) and the diffusion coefficient, suggesting that the Saffman and Delbruck model can describe well the relationship even in living cells.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子イメージング 膜たんぱく質 拡散 1分子トラッキング 脂質ラフト 細胞性粘菌

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム配列には、タンパク質のアミノ酸配列や発現制御の情報、タンパク質の細胞内局在を規定する情報などが書き込まれている。本研究で着目する膜タンパク質の膜内動態に関連した例としては、例えば、タンパク質がシグナル配列により特定のオルガネラに輸送されることが知られている (G. Blobel, 1999 年ノーベル賞)。しかしながら、輸送先でさらに局在が詳細に規定されるアミノ酸配列が存在するかどうかは不明であり、ゲノム配列に書き込まれた情報についてはまだ我々の理解が限られている可能性がある。

膜タンパク質の膜内動態については、近年、イメージング技術の進展により、多くの知見がもたらされるようになった。例えば、生体膜内の微小環境 (例えばラフト、脂質組成の heterogeneity) により、膜タンパク質の機能が変化することがわかってきた。したがって、こうした機能調節もゲノム配列によって規定されている可能性がある。

加えて、Saffman-Delbrück (1975) の理論モデルにおいては、膜タンパク質の構造により膜内動態が物理的に決定されるとされているが、膜タンパク質の構造を規定するアミノ酸配列と膜内動態の関係は全く不明である。膜タンパク質の膜内運動性や膜内局在、膜内微小環境との相互作用を決めるアミノ配列や構造の特徴があるとすれば、それを特定することにより、ゲノム配列に書き込まれた情報の新たな理解へとつながる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム配列から得られる膜タンパク質のアミノ酸配列情報に基づいて、膜タンパク質と微小環境との相互作用を予測する技術の確立に向け、受容体、イオンチャネル、ポンプなど多数の膜タンパク質について生細胞内で 1 分子拡散動態解析を行い、その運動性 (運動モードや拡散性) を網羅的に解析する手法を確立する。アミノ酸配列情報を利用したデータ解析により膜タンパク質の構造と膜内動態の相関モデルの構築を目指す。特に、Saffman-Delbrück (1975) モデルで予想される膜タンパク質の大きさと拡散動態の関係について検証を進める。Saffman-Delbrück モデルが成立する場合、タンパク質の半径  $a$ 、膜の粘性  $\mu$ 、まわりの粘性  $\mu'$ 、膜の厚さ  $h$  として、拡散係数  $D_T$  は次の式 (1) で記述される。 $\gamma$  は定数である。

$$D_T = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} (\log \frac{\mu h}{\mu' a} - \gamma) \quad (\text{式 1})$$

本研究では、この式の妥当性を細胞内での膜タンパク質の網羅的拡散計測により評価する。膜タンパク質の構造と膜内動態についての新しい原理として、式 1 とは異なり、細胞内の複雑な膜構造を考慮した新たな関係式を提案できる可能性がある。

## 3. 研究の方法

膜タンパク質の網羅的 1 分子イメージング解析を実現するために、(1) ハイスループット化した細胞内 1 分子顕微鏡の開発、(2) 計測対象となるタンパク質の選定と蛍光標識、(3) 得られた 1 分子画像の 1 分子トラッキング (single-molecule tracking) と拡散統計解析の自動化に関する開発を行う。得られる実験データ (運動性の指標となる拡散係数や運動モード) とタンパク質の配列情報から予測される構造との相関解析を行う。式 1 が成立するか検証する。

## 4. 研究成果

(1) ハイスループット化した 1 分子顕微鏡の開発 多量の生物試料を計測するために、既存の全反射型蛍光 1 分子顕微鏡を改良した。細胞培養によく用いられるマルチウェルプレートに多数の生物試料を入れ、生物試料の自動搬送、自動焦点合わせ機能を導入することにより、1 分子計測の省力化・高速化を図った。これにより、複数の細胞株を効率よく計測できるようになった。

(2) 計測対象となるタンパク質の選定と蛍光標識 PDB の構造データや UniProtKB の構造予測データを基にし、細胞膜に存在すると予測されるタンパク質を細胞膜貫通部位の貫通回数を指標に分類して選定した。合計 170 種類のタンパク質を測定候補とし、蛍光 1 分子観察に適した HaloTag で標識した。細胞に遺伝子導入し 25 種類について安定発現株を樹立した。安定発現株を得ることができなかった約 145 種類については現在も発現プロモーターの変更や蛍光色素の変更により調製を続けている。安定発現株が得られた候補タンパク質については、順次細胞内 1 分子拡散解析を実施した。また、HaloTag に適用できる量子ドットプローブを開発した (Komatsuzaki et al., 2015)。

(3) 1 分子トラッキングと拡散統計解析の自動化 上述した方法で調製した膜タンパク質を 1 分子イメージングし、その拡散を解析したところ、全ての膜タンパク質において複数の拡散状態を持つことが明らかになった。こうした違いは膜内の微小環境の違い等を反映していると考えられる。従って、膜タンパク質の拡散の多状態性を想定し、状態数と各拡散状態における拡散係数の決定する手法が必要となった。こうした 1 分子拡散多状態動態解析を実施するために、我々が以前開発した 1 分子拡散キネティクス統計解析法 (Matsuoka et al., 2009; Matsuoka et al., 2013) の適用を図った。この解析法では、拡散する分子の変位に関する統計理論に基づき、赤池情報量基準 (AIC) を用いて拡散分子の状態数と拡散係数を推定し、変位時系列の自己相関解析

により状態間遷移を検出する。分子反応を含む2次元拡散方程式に基づきモデル関数(変位確率密度関数など)を導出し、拡散係数、状態間遷移速度などの反応速度パラメータを推定した。こうした1分子拡散解析を大量の実験データに対して適用するために専用の解析ソフトを開発した。一連の解析プロセスを自動で実行できる自動解析プログラムを開発することにより、熟練者でなくとも短時間に1分子の統計解析ができるようになった。1分子画像取得から多状態の状態数推定および拡散パラメータの推定、1分子軌跡への状態割り当てまでを自動で行う解析ソフトを構築した。計測した膜タンパク質分子のうちインテグリンについては原著論文として発表した(Ishibashi et al., 2015)。

こうした網羅的な膜タンパク質の1分子拡散解析により、実験的に得られた拡散係数とアミノ酸配列から予想される膜貫通回数の比較を行った。その結果、拡散係数とタンパク質の構造から予測される大きさ(半径 $a$ )との間には、Saffman and Delbrückモデルから予測される相関関係が成立していることが示唆された(式1)。全ての膜タンパク質において3状態の拡散が認められ、それぞれの状態においてSaffman and Delbrückモデルが成立しているようであった。細胞膜の構造的な不均一性を考慮すると、膜タンパク質の構造と拡散の間に普遍的関係が存在する可能性がある。

今後は、ゲノム配列に書き込まれた情報の新たな理解へとつなげるために、こうした解析の網羅性をさらに拡張する必要があるだろう。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Kamimura, Y., Miyanaga, Y. and Ueda, M.\* (2016). "Heterotrimeric G protein shuttling via Gip1 extends the dynamic range of eukaryotic chemotaxis.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 113(16):4356-4361. doi: 10.1073/pnas.1516767113. 査読有 .

Matsuoka, S., Miyanaga, Y. and Ueda, M. (2016). Multi-state Transition Kinetics of Intracellular Signaling Molecules by Single-Molecule Imaging Analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1407: 361-379. doi: 10.1007/978-1-4939-3480-5\_25. 査読有 .

Komatsuzaki, A., Ohyanagi, T., Tsukasaki, Y., Miyanaga, Y., Ueda, M., and Jin, T. (2015). "Compact Halo-Ligand Conjugated Quantum Dots for Multicolored Single-Molecule Imaging of Overcrowding GPCR Proteins on Cell Membrane." *Small*, 11: 1396-1401. doi: 10.1002/smll.201402508. 査読有 .

Ishibashi, M., Miyanaga, Y., Matsuoka, S., Kozuka, J., Togashi, Y., Kinashi, T. and Ueda, M.\* (2015). "Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464: 459-466. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.155. 査読有 .

Watabe M, Arjunan SNV, Fukushima S, Iwamoto K, Kozuka J, Matsuoka S, Shindo Y, Ueda, M., Takahashi K. (2015). "A computational framework for bioimaging simulation", *PLoS One*, 10: e0130089. doi: 10.1371/journal.pone.0130089 査読有 .

〔学会発表〕(計 15 件)

Ueda M (2017) "Automated single-molecule imaging analysis in living cells", *Single Molecule Biophysics 2017*, Aspen Center for Physics, January 9, Colorado, USA.

上田 昌宏 "細胞性粘菌の濃度勾配センシングと走化性運動", 日本微生物生態学会第31回大会シンポジウム「原生生物の環境センシングと運動」, 2016年10月25日(火), 神奈川県横須賀市, 横須賀市文化会館 .

Ueda M "Single molecule analysis of intracellular signaling in eukaryotic chemotaxis", *Gordon Research Conference, Single Molecule Approaches to Biology*, July 3-8, 2016, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China.

上田 昌宏 "Spatiotemporal dynamics of the phosphatidylinositol lipids signaling pathway for chemotaxis", 第93回日本生理学会大会, 2016年3月24日, 札幌, 札幌コンベンションセンター .

上田 昌宏 "走化性シグナル伝達系の自己組織化による細胞運動の制御", 第38回日本分子生物学会年会, ワークショップ "生命への道程: 自己集合・自己組織化による秩序形成と創発" 2015年12月1日, 神戸, 神戸国際展示場 .

〔図書〕(計 1 件)

松岡里実, 上田昌宏 (2015). "イノシトールリン脂質シグナル", *生体の科学*, 66巻5号, 増大特集『細胞シグナル操作法』, pp392-393. 査読なし .

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ueda/>

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

## アウトリーチ活動

上田 昌宏 (2015) “細胞の中の分子を見て、その働きを解き明かすナノバイオロジー”, 第47回大阪大学公開講座「科学の求心力」, 2015年11月6日(金)開催, 大阪大学中之島センター.

上田 昌宏 (2015). サーチプロジェクト「ニュー“コロニー/アイランド”」2015年3月28日～2015年6月28日. 大阪中之島アートエリア B1.  
<http://artarea-b1.jp/archive/2015/0628705.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 昌宏 (UEDA, Masahiro)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授  
研究者番号: 40444517