

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム  
(英語) Medical research and development programs focused on technology transfers: development of advanced measurement and analysis systems

研究開発課題名 : (日本語) 細胞内1分子スクリーニングシステムの開発  
(英語) Development of in-cell single-molecule screening system

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 生命システム研究センター  
所属 役職 氏名 : グループディレクター 上田 昌宏  
(英語) RIKEN QBiC, Group director, Masahiro Ueda

実施期間 : 平成28年4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 顕微鏡およびスクリーニング技術の情報収集・市場調査  
開発課題名 : (英語) Market research for microscopy and screening technology

研究開発分担者 (日本語) 株式会社ニコンインステック ゼネラルマネージャー 藤田 亮  
所属 役職 氏名 : (英語) Nikon Instech Co., Ltd, General manager, Ryo Fujita

分担研究 (日本語) 1分子計測による免疫細胞の走化性メカニズムの解明  
開発課題名 : (英語) Investigation of immune cell chemotaxis by single-molecule measurement

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院 医学系研究科 教授 石井 優  
所属 役職 氏名 : (英語) Osaka University, Graduate school of medicine, Prof. Masaru Ishii

分担研究 (日本語) 細胞内1分子スクリーニングに適した蛍光プローブの開発  
開発課題名 : (英語) Development of fluorescent probe suitable for in-cell single-molecule screening

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院 工学研究科 教授 菊地 和也  
所属 役職 氏名: (英語) Osaka university, Faculty of engineering, Prof. Kazuya Kikuchi

分担研究 (日本語) TLR の 1 分子動態計測による免疫応答メカニズムの解明  
開発課題名: (英語) Investigation of immune response mechanism by single-molecule behavioral measurement of TLR

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任助教 熊谷 雄太郎  
所属 役職 氏名: (英語) Osaka university, Immunology frontier research center, Assistant Prof. Yutaro Kumagai

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

上田グループ (中核機関) では、細胞内 1 分子スクリーニングのプロトタイプ機器において、1 分子イメージングの完全自動化に加え、顕微鏡で得られた画像データを PC に自動転送し、分子動態を自動で解析するシステムの構築を、前年度までに達成した。本年度は実際に、上皮成長因子受容体 (EGFR) の 1 分子動態を大量の細胞や種々の条件下で計測し、開発したシステムの効率や精度の実証に取り組んだ。その結果、ウェルプレートあたり 600 細胞の計測・解析を半日程度で完了すること、また、リガンド結合によって活性化した分子動態をすべての細胞において検出できることが示された。これは、従来人手に頼っていた計測の効率を遥かに上回るものであり、同時に、統計処理に十分なデータ量が得られることで精度も向上している。

また、ウェルプレート上でリガンドとリン酸化阻害剤を濃度を変えて添加し、それぞれの作用の競合阻害について、EGFR の平均二乗変位を指標とした解析を行った。その結果、薬理パラメータである結合定数および阻害定数を、得られた二次元マップを近似し算出することができた。このことは、開発したシステムが薬剤スクリーニングに有効な手法となりえることを示している。

藤田グループ (ニコインステック (株)) では、本年度も、新製品や有用と考えられる製品やシステムに関する情報収集を行うとともに、普及タイプの開発に用いる顕微鏡や各種光学部品を選定し、納品と構築を行った。また、フィルターや光学部品の購入に際して、最適な製品についての情報を提供した。

石井グループ (阪大 (医)) では、破骨前駆細胞の走化性メカニズムの解明を目指し、関連するシグナル伝達系の受容体について、細胞内 1 分子スクリーニングシステムによる網羅的解析を目指し、受容体分子の発現量評価など種々の条件検討を行った。

菊地グループ (阪大 (工)) では、熊谷グループとともに、本年度は、開発した BL-tag と、すでに市販化されている Halo-tag の二種類のタグ化タンパク質を同時発現させてそれぞれ色素修飾し、1 分子レベルでの挙動を同時観察する系の確立に取り組んだ。

熊谷グループ (阪大 (免)) では、LPS 刺激時における TLR4 分子の動態変化を詳細に知ることを目的に、1 分子観察データを取得し、ほぼ最適化した条件下で解析を行った。その結果、刺激により遅い受容体のフラクションが増加することを見出した。Halo-tag を融合させた膜貫通型 TLR4 と、

BL-tag を融合させたアダプタータンパク質それぞれを発現した細胞について開発した機器での計測を試み、網羅的計測に適した細胞条件の検討を行った。

In Ueda's group, the automation of all the processes of single-molecule microscopy including searching and focusing cells for observation, drug dispensing, image acquisition and so forth was completed, enabling expertise-free operation. Automatic systems for well plate transfer and immersion oil feeder were also equipped for large-scale experiments. Additionally, quantitative analysis on the acquired images is executed automatically. Using the automated apparatus, single-molecule imaging of GFP labeled epidermal growth factor receptor (EGFR) in the plasma membrane of CHO cells was executed on 5 cells with and without ligand treatment in 60 wells, totally 600 cells. The series of observation and analysis were completed within 12 hours without any manual handling and ligand stimulated cells were distinguished perfectly by the significant changes in averaged receptor behavior, indicating that the apparatus enables comprehensive single-molecule analysis with high efficiency and accuracy. Furthermore, we assessed the competitive effect between the ligand and inhibitor in the mean square displacement (MSD) of EGFR in the cells. As a result, we succeeded to estimate the dissociation and inhibitory constants by fitting the obtained two-dimensional efficiency map with an equation considering the competitive inhibition, indicating that novel drug and molecular screening is possible by the apparatus.

We were provided information about new microscope products by **Fujita's group** and chose optical parts for a developed apparatus based on the information. By collaborating with **Ishii's group** to elucidate the mechanism of chemotaxis of the osteoclast precursor cells, suitable experimental conditions for the large-scale single-molecule analysis of the related receptor molecules were executed. **Kikuchi's group** established an experimental system in which two-color single-molecule imaging of proteins with their developed BL tag and commercialized HaloTag is available. **Kumagai's group** started to measure the molecular behavior of TLR4 and its adaptor protein with the BL tag and HaloTag, respectively, under LPS stimulation.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 6 件）

#### 石井グループ

1. Maeda H, Kowada T, Kikuta J, Furuya M, Shirazaki M, Mizukami S, Ishii M, Kikuchi K. Real-time intravital imaging of pH variation associated with osteoclast activity. Nat Chem Biol. 2016, 12, 579-85.

#### 熊谷グループ

2. Matsushima H\*, Kumagai Y\* (\*co-first), Vandenbon A, Kataoka H, Kadana M, Fukamachi H, Arimoto T, Morisaki H, Fujiwara N, Okahashi N, Kuwata H: Microarray analysis of macrophage response to infection with Streptococcus oralis reveals the immunosuppressive effect of hydrogen peroxide. Biochemical and biophysical research communications 2017, 485(2):414-420.

3. Kadena M\*, Kumagai Y\* (\*co-first), Vandebon A, Matsushima H, Fukamachi H, Maruta N, Kataoka H, Arimoto T, Morisaki H, Funatsu T, Kuwata H: Microarray and transcription binding site analysis reveals that melatonin attenuates immune responses and modulates actin rearrangement in macrophages. Biochemical and biophysical research communications 2017, 485(2):461-467.
4. Maruyama K, Kawasaki T, Hamaguchi M, Hashimoto M, Furu M, Ito H, Fujii T, Takemura N, Karuppuchamy T, Kondo T, Kawasaki T, Fukasaka M, Misawa T, Saitoh T, Suzuki Y, Martino MM, Kumagai Y, Akira S: Bone-protective Functions of Netrin 1 Protein. The Journal of biological chemistry 2016, 291(46):23854-23868.
5. Kumagai Y (corresponding author), Vandebon A, Teraguchi S, Akira S, Suzuki Y: Genome-wide map of RNA degradation kinetics patterns in dendritic cells after LPS stimulation facilitates identification of primary sequence and secondary structure motifs in mRNAs. BMC genomics 2016, 17(Suppl 13):1032.
6. Hobro AJ, Kumagai Y, Akira S, Smith NI: Raman spectroscopy as a tool for label-free lymphocyte cell line discrimination. The Analyst 2016, 141(12):3756-3764.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

上田グループ (中核機関)

1. 膜蛋白質動態の大規模解析を可能とする自動化 1 分子計測, 口頭発表, 廣島通夫、安井真人、小塚淳、佐甲靖志、上田昌宏, 平成 28 年度生理学研究所研究会「膜システムの機能的・構造的統合」、2016/9/8、国内
2. Development of automatic single molecule imaging system, ポスター発表, 安井真人、小塚淳、廣島通夫、佐甲靖志、上田昌宏、第 54 回日本生物物理学会年会、2016/11/26、国内
3. Cholesterol Mediated Mechanism for Signaling Cluster Formation of Epidermal Growth Factor Receptor, ポスター発表、廣島通夫、上田昌宏、佐甲靖志、第 54 回日本生物物理学会年会、2016/11/26、国内

熊谷グループ

4. 免疫システムの情報処理、口頭発表、熊谷雄太郎、第 1 回理論免疫学ワークショップ、2017/1/19、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし