

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) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies

研究開発課題名： (日本語) 1分子・質量イメージング顕微鏡の開発と細胞膜機能解析

(英語) Development of MULTUM-PALM and its application to cell membrane biology

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院生命機能研究科・教授・上田昌宏

所属 役職 氏名： (英語) Osaka University・Professor・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)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究では、膜蛋白質全分子位置データと脂質空間分布データを同一の細胞から取得できる1分子・質量イメージング顕微鏡 (MULTUM-PALM) を開発する。この顕微鏡を細胞膜上で機能する脂質と膜蛋白質に適用し、統計解析法・数理モデルの開発を通して、脂質/膜蛋白質の時空間動態を計算機内で再現する手法を実現する。その実現に向けて、次の3つの研究項目に取り組んでいる。

[研究項目 1] 1分子・質量イメージング顕微鏡の開発

[研究項目 2] 脂質による膜蛋白質拡散動態制御の分子メカニズムの解明

[研究項目 3] イノシトールリン脂質代謝系による細胞極性形成の分子メカニズムの解明

上田グループ（大阪大学大学院生命機能研究科）と豊田グループ（大阪大学大学院理学研究科附属基礎理学プロジェクト研究センター）は共同して MULTUM-PALM の開発に取り組んでいる。本年度は、質量イメージング装置 MULTUM と超解像顕微鏡 PALM の接続部の設計を行った。

上田グループ（大阪大学大学院生命機能研究科）と高木グループ（奈良県立医科大学）らのグループは共同して、PALM 計測から得られる膜蛋白質の位置情報から分子間平均距離や多量体化、細胞膜上での空間分布の偏り、分子密度、分子数などを決定する統計解析法を開発した。この解析方法を走化性シグナル伝達に関与する GPCR 型受容体に適用した。その結果、細胞極性に応じて走化性受容体の空間分布が誘引物質濃度の高い方にバイアスされて緩やかに濃縮されていることが分かってきた。従来、走化性受容体は細胞膜上で均一に空間分布することにより、誘引物質の濃度勾配をできるだけフラットな状態で受容すると考えられてきた。こうした知見は、細胞膜上の受容体全分子をナノメートルの精度で位置決めする計測によって初めて明らかになってきたものである。走化性の濃度勾配のセンシングのメカニズムを再考する必要がある。こうしたバイアスされた空間分布を作る分子メカニズムとしては、細胞の前後極性に応じて何らかの脂質分子の空間分布に極性があることが考えられる。あるいは細胞骨格系の関与が想定される。今後は、受容体等の膜蛋白質の空間分布に対する脂質組成や細胞骨格、細胞極性度の影響を解析する。

イノシトールリン脂質代謝系は、脂質と蛋白質間のクロストークの仕組みを理解する上で有用な系であり、その時空間ダイナミクスを明らかにすることは医科学上重要な課題となっている。そこで本研究ではイノシトールリン脂質の一種である PIP₃が作るドメイン（PIP₃ドメイン）の生成に関わる4種の分子（PI3K, PTEN, PtdIns (4,5)P₂, PIP₃）に注目し、イノシトールリン脂質代謝系の時空間動態を解明する実験系を構築し、その動態を再現する数理モデルの構築を目指している。PIP₃とPTENはそれぞれ細胞の前後に相互排他的に局在し、PIP₃濃度が高い領域からはPTENが排除され細胞膜に結合していない。そこで上田グループ（大阪大学大学院生命機能研究科）は、PTEN膜結合に対するPIP₃の影響をライブイメージング法により解析した。その結果、脂質分子PIP₃によるPTEN膜結合の抑制メカニズムがあることが明らかになった。PTENはPIP₃を分解する酵素なので、PIP₃とPTENには相互抑制（mutual inhibition）の関係があることになる。このため、細胞膜のある領域にはどちらか一方しか局在することができないと考えられる。これがイノシトールリン脂質代謝系の作る細胞極性の分子メカニズムの一つとなっていると考えられる。

In this research project, we aim to reveal how membrane proteins and lipids interact in order to emerge signaling functions on plasma membrane. We attempt to develop a new correlative microscope (MULTUM-PALM) by which membrane proteins can be observed at single-molecule level with super resolution (PALM) and lipid molecules can be observed with mass spectroscopy (MULTUM). We will apply this MULTUM-PALM to various membrane proteins including GPCRs and components of phosphatidylinositol lipids signaling pathway on plasma membrane. Through the development of both statistical analysis methods for characterizing lipid/protein distributions and their mathematical modeling, we will try to reconstruct spatiotemporal dynamics of lipid/protein interactions *in silico*. For this purposes, we attempt to achieve the following three sub-research projects.

- [Research 1] Development of a correlative microscope MULTUM-PALM
- [Research 2] Applications to membrane proteins to reveal regulatory mechanisms of its diffusion
- [Research 3] Applications to phosphatidylinositol lipids signaling pathway to reveal molecular mechanisms of polarity formation

In this year, Ueda group (Graduate school of frontier biosciences, Osaka University) and Toyoda groups (Graduate school of sciences, Osaka University) started to develop MULTUM-PALM by research collaboration between them. We designed the connection part between mass imaging optics of MULTUM and super-resolution imaging optics of PALM.

Research collaboration between Ueda group (Graduate school of frontier biosciences, Osaka University) and Takagi groups (Nara Medical University) developed statistical analysis method for PALM measurements of membrane proteins. We applied this method to a G-protein coupled chemoattractant receptor in order to analyze its spatial distributions, oligomerizations, density, and molecular number with nanometer accuracy. Results revealed that the chemoattractant receptor has a polarized distribution long the length of the polarized chemotaxing cell directed up the gradients. In the conventional view, it is assumed that chemoattractant receptors are distributed uniformly on the plasma membrane and thus chemoattractant gradients are sensed spatially with no bias. The mechanisms of directional sensing by chemoattractant receptors should be reconsidered by including their heterogeneous distributions. Such biased distribution of the receptors seems to be due to lipid compositions and/or cytoskeletons along the cellular polarity. We will further analyze the effects of lipid compositions and/or cytoskeletons on the spatial distribution of membrane proteins with nanometer scales.

Ueda group (Osaka University) revealed that PTEN, a phosphatase acting on PIP3, adopts 3 interchangeable membrane-binding states by using single-molecule imaging analysis. We developed a novel analysis method, the ‘lifetime-diffusion analysis method’, to derive the kinetics of state transition and membrane dissociation, and the diffusion coefficient of each state from stochastic trajectories of the lateral diffusion. The proposed statistical model described the variations in the kinetics depending on the location of the PTEN molecules in polarized cells and accounted for PIP3 polarity along the chemical gradient. These analyses on the phosphatidylinositol lipids signaling pathway suggests the mutual inhibition between PTEN and PIP3 by which a part of membrane can adopt exclusively PTEN-enriched state or PIP3-enriched state leading to cellular polarization.

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 2 件）

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

2. 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.*, Apr 19; 113(16): 4356-4361. doi: 10.1073/pnas.1516767113.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development of a Time and Position Sensitive Ion Detector for a Stigmatic Imaging Mass Spectrometer, ポスター, J. Aoki, Y. Kawai, Y. Fujita, H. Hazama, T. Hondo, H. Matsuoka, K. Awazu, M. Toyoda, Y. Arai, American Society for Mass Spectrometry Conference, 2016/6/5-9, 国外.
2. Single molecule analysis of intracellular signaling in eukaryotic chemotaxis, Invited talk, Masahiro Ueda, Gordon Research Conference, Single Molecule Approaches to Biology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China, 2016/07/3-8, 国外.
3. Surface Analysis of Murchison Meteorite with MALDI Stigmatic Imaging Mass Spectrometer, ポスター, Jun Aoki, Yosuke Kawai, Kentaro Terada, Michisato Toyoda, International Mass Spectrometry Conference, 2016/8/20-26, 国外.
4. General aspects in dynamics of spontaneous cell migration in different species, ポスター, Hiroaki Takagi, International Conference on Systems Biology 2016, 2016/9/17, 国外.
5. Development of High-Resolution Multi-Turn Time-of-Flight Mass Spectrometers, 口頭, Michisato Toyoda, 台湾アカデミアシニカ相互交流会シンポジウム, 2016/10/5, 国内.
6. 超解像イメージングによる細胞膜上受容体の空間分布解析, ポスター, 高木拓明, 宮永之寛, 後藤裕太郎, 廣島通夫, 佐甲靖志, 上田昌宏, 日本細胞性粘菌学会第6回例会, 2016/10/15, 国内.
7. 細胞性粘菌の濃度勾配センシングと走化性運動, 招待講演, 上田昌宏, 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」, 神奈川県横須賀市文化会館, 2016/10/25, 国内.
8. 阪大における質量分析装置の開発と応用の近況, 口頭, 青木順, 豊田岐聡, 蛋白研セミナー, 2016/12/2-3, 国内.
9. Automated single-molecule imaging analysis in living cells, talk, Masahiro Ueda, Single Molecule Biophysics 2017, Aspen Center for Physics, Colorado, USA, 2017/01/09, 国外.
10. 投影型イメージング質量分析計の開発と材料分析への応用, 口頭, 豊田岐聡, 高分子MS研究会, 2017/1/27, 国内.
11. Dynamics of spontaneous cell migration in 2D & 3D environment, ポスター, Hiroaki Takagi, the 61th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2017/2/13, 国外.

(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。

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) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies

研究開発課題名： (日本語) 1分子・質量イメージング顕微鏡の開発と細胞膜機能解析
(英語) Development of MULTUM-PALM and its application to cell membrane biology

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院生命機能研究科・教授・上田昌宏
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University・Professor・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) 1分子・質量イメージング顕微鏡における質量イメージング法
開発課題名： (英語) Development of mass imaging optics for MULTUM-PALM

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学学院理学研究科附属基礎理学プロジェクト研究センター
教授 豊田岐聡
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University・Professor・Michisato Toyoda

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 上田昌宏 (大阪大学大学院・生命機能研究科) 総括研究報告を参照。

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 0 件）
該当なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development of a Time and Position Sensitive Ion Detector for a Stigmatic Imaging Mass Spectrometer, ポスター, J. Aoki, Y. Kawai, Y. Fujita, H. Hazama, T. Hondo, H. Matsuoka, K. Awazu, M. Toyoda, Y. Arai, American Society for Mass Spectrometry Conference, 2016/6/5-9, 国外.
2. Surface Analysis of Murchison Meteorite with MALDI Stigmatic Imaging Mass Spectrometer, ポスター, Jun Aoki, Yosuke Kawai, Kentaro Terada, Michisato Toyoda, International Mass Spectrometry Conference, 2016/8/20-26, 国外.
3. Development of High-Resolution Multi-Turn Time-of-Flight Mass Spectrometers, 口頭, Michisato Toyoda, 台湾アカデミアシニカ相互交流会シンポジウム, 2016/10/5, 国内.
4. 阪大における質量分析装置の開発と応用の近況, 口頭, 青木順, 豊田岐聡, 蛋白研セミナー, 2016/12/2-3, 国内.
5. 投影型イメージング質量分析計の開発と材料分析への応用, 口頭, 豊田岐聡, 高分子 MS 研究会, 2017/1/27, 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

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) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies

研究開発課題名： (日本語) 1分子・質量イメージング顕微鏡の開発と細胞膜機能解析
(英語) Development of MULTUM-PALM and its application to cell membrane biology

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学大学院生命機能研究科・教授・上田昌宏

所属 役職 氏名： (英語) Osaka University・Professor・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) 細胞膜分子動態再現法における理論・数理モデル・データ統計解析法の開発
開発課題名： (英語) Development of theory, mathematical modeling, and statistical analysis for the reproduction of the dynamics of membrane-protein systems

研究開発分担者 (日本語) 奈良県立医科大学医学部・講師・高木拓明

所属 役職 氏名： (英語) Nara Medical University・Lecturer・Hiroaki Takagi

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：上田昌宏 (大阪大学大学院・生命機能研究科) 総括研究報告を参照。

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 0 件）
該当なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. General aspects in dynamics of spontaneous cell migration in different species, ポスター, Hiroaki Takagi, International Conference on Systems Biology 2016, 2016/9/17, 国外.
2. 超解像イメージングによる細胞膜上受容体の空間分布解析, ポスター, 高木拓明, 宮永之寛, 後藤裕太郎, 廣島通夫, 佐甲靖志, 上田昌宏, 日本細胞性粘菌学会第6回例会, 2016/10/15, 国内.
3. Dynamics of spontaneous cell migration in 2D & 3D environment, ポスター, Hiroaki Takagi, the 61th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2017/2/13, 国外.

(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。