

「隠れマルコフモデルによる膜蛋白質の異常拡散の解析」

上田 昌宏（生命機能研究科）、松野 健治（理学研究科）、
竹林 和俊（生命機能研究科）、廣島 通夫（生命機能研究科）

1. 研究の背景

膜蛋白質は細胞膜上での拡散運動を通してシグナル伝達などの機能を発現している。この拡散は他の分子との相互作用や不均一な細胞膜構造の影響により複雑な動態を示す。これまで我々は下等真核生物の細胞性粘菌からショウジョウバエ由来の細胞、さらには哺乳類細胞に至る進化的に広く様々な生物種での1分子計測系を確立した^[1-2]。こうした様々な生物種における解析から、細胞によって膜蛋白質の拡散動態に大きな違いが見られ、拡散場となる細胞膜の構造が大きく異なることがわかってきた。例えば、細胞性粘菌では計測された全ての膜蛋白質が自由拡散を示すが、哺乳類細胞では計測された全ての膜蛋白質が自由拡散と異常拡散が混合した複雑な拡散動態を示す^[1-3]。拡散動態の調節を介したシグナル伝達の仕組みを明らかにするために、自由拡散と異常拡散を示す様々な膜蛋白質や様々な細胞種に広く適用できる1分子計測手法と拡散解析手法が必要となっている。

近年我々は、機械学習とロボット技術の導入による「細胞内1分子イメージングの自動化」を開発し、細胞膜上で拡散する膜蛋白質の大規模計測を実現した^[3]。この自動化により、受容体などの膜蛋白質の拡散動態や多量体形成に対する化合物の効果を1000種類程度の規模で解析できるようになり、創薬に利用できるようになった^[4]。本研究開発を通じて多様な細胞・分子種に対する1分子拡散計測・解析の対応力が強化することで、手法の汎用化が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、様々な細胞種において膜蛋白質の複雑な拡散動態を解析する手法を開発することを目的とする。粘菌細胞、ショウジョウバエ由来細胞、哺乳類 CHO 細胞は異なる温度領域で増殖・生存が最適化されているため、温度の影響も含めた拡散動態計測・解析法を開発する。自然環境下では、粘菌とショウジョウバエは昼夜に大きな温度変化（5~25℃）を経験するのに対して、哺乳類細胞は比較的一定温度（35℃）の恒温個体内にいる。膜の脂質組成は温度変化に対して敏感なため、温度環境の違いが膜蛋白質の拡散動態の違いを生み出す可能性がある。そこで、計測手法と解析手法の開発からなる2つの研究項目を設定した。

3. 研究の方法

3.1 温度変調下における膜蛋白質拡散動態の自動細胞内1分子計測法の開発

3.1.1 自動細胞内1分子計測の改良

既存装置（図1a）に対して高速温度変調装置を導入する。また、自動1分子計測には細胞種に応じて自動細胞認識が必要である。学習用データを作成し、機械学習により細胞種に最適化した自動細胞認識を実現する。

3.1.2 計測温度領域の設定

細胞は最適生存温度を大きく外れた環境では生存できない。最適生存温度は細胞種によって異なることから、細胞種ごとに計

測温度域を決定する。予備的実験から、粘菌の場合は 21℃から 27℃に温度を変調すると膜蛋白質の拡散が変化するが、21℃に戻すと元に戻ることが観察され、細胞の生存も維持された。つまり、一時的な温度変調に対して細胞は頑強である。この方法を用いて、生存に大きく影響しない温度変調領域を決定し、膜蛋白質の拡散を 1 分子イメージングにより計測する。至適な生育温度が異なる細胞種において、同温度で計測できれば、異なる種間での膜蛋白質の拡散動態を直接比較することが可能になる。

3.1.3 膜蛋白質の拡散動態を記述する理論モデルとの比較

膜蛋白質の拡散動態を記述する理論として、Saffman-Delbrück モデル(SD モデル)が知られている。先行研究から、細胞性粘菌では膜蛋白質の拡散動態が次式の SD モデルによって近似できることが明らかになっている^[1]。

$$D_{SD} = \frac{k_B T}{4\pi\mu_m h} \left(\ln \frac{\mu_m h}{\mu_s R} - \gamma \right)$$

ここで、 D_{SD} は拡散係数、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 π は円周率、 μ_m は膜の粘性、 h は膜の厚さ、 μ_s は溶液の粘性、 R は膜蛋白質の半径、 γ は Euler's constant と呼ばれる定数である。温度変調に対しては T と μ_m 以外は定数と考えてよい。温度変調に対する膜蛋白質の拡散係数の変化から、膜の粘性の変化を明らかにし、温度変調に対する膜構造の変化を考慮する必要があるかどうかを検討する。

3.2 隠れマルコフモデル (HMM) を用いた拡散解析手法の開発

3.2.1 温度変調下での膜構造の推定

細胞性粘菌では計測された全ての膜蛋白質が自由拡散を示し、隠れマルコフモデル (HMM) による拡散解析と膜構造の推定が可能である (図 1 b) ^[1]。粘性の異なる 3 つのナノメートルサイズの微小領域があると推定された。3.1.3 の結果により温度変調に伴い膜の粘性が変化している場合、HMM を用いて膜構造の変化を推定する。

3.2.2 異常拡散を含む複雑な拡散動態に対する HMM の適用と膜構造の推定

HMM を用いると、時々刻々と遷移する拡散状態を推定・解析することが可能である。細胞性粘菌の膜蛋白質は複数の拡散状態を示すが、全て自由拡散であったため、これまでに開発してきた HMM は自由拡散のみを扱ってきた^[1]。そこで自由拡散と異常拡散の両方の拡散状態を含むデータセットをシミュレーションによって作成し、これを用いて HMM によって拡散状態の推定が可能か確認する。異常拡散も含めた解析手法の開発により、哺乳類細胞などの様々な細胞種における複雑な拡散動態へ適用する。また、拡散動態から 3.2.1 と同様の手法により膜構造を推定する。

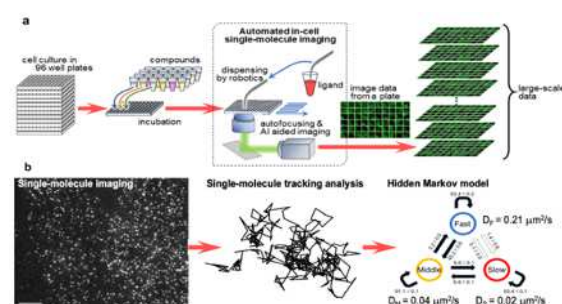


図 1 細胞膜蛋白質の拡散動態の自動 1 分子計測と HMM を用いた拡散解析。
a)大規模 1 分子自動イメージング解析、
b)自動 1 分子トラッキングと拡散動態解析から得られるモデル構築

4. 研究成果

温度変調装置を導入により、観察試料の温度を 0.1℃以下の精度で制御し、高速

(100°C/s) の温度変調が可能になった。粘菌細胞の場合は、生育温度 (21 度) を中心に 14 度から 37 度の範囲で温度を変化させ、様々な膜蛋白質の拡散を計測できた (図 2)。拡散の平均二乗変位 (MSD) は直線であることから、温度変化に依らず自由拡散であった。粘菌細胞では異常拡散をもたらすような膜構造の変化はないと結論づけることができた。また、HMM 解析から 3 つの拡散状態が確認され、対応する膜構造は温度によってほとんど変化せず、計測された拡散動態の変化は膜の粘性の変化によって説明することができた。

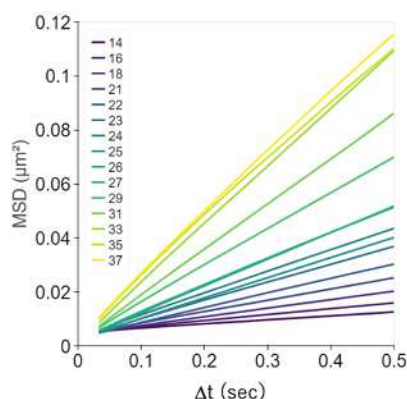


図 2 膜蛋白質の拡散に対する温度変化の影響。MSD : 平均二乗変位。

一方、哺乳類細胞では HMM 解析から 3 つの拡散状態が確認できた。HMM を用いる受容体について 1 分子の軌跡を解析すると、時々刻々と遷移する拡散状態によって 3 つの軌跡に分解することができた。それぞれの MSD を計算することから自由拡散、異常拡散、停止の 3 状態に分離された。このことは、自由拡散と異常拡散の両方を含む複雑な拡散を解析できることを示している。こうした特徴は野生型 EGF 受容体を含む 5 種類の受容体で確認できた。温度に対する拡散状態の変化については、計測・解析系はほぼ確立できたが、定量的な結果を出すまでには至らなかったため、今後の課題としたい。

細胞の自動認識は、我々の 1 分子自動計測系では経験的に細胞のサイズが 50 ミクロンを超える大きさと比較的容易である。本開発によって CHO や HeLa、A594 など比較的サイズが大きい哺乳類細胞に加えて、10 ミクロン程度の粘菌細胞でも自動認識が可能になった。細胞識別には深層学習を用いた。

引用文献

- [1] Takebayashi K., Kamimura Y., Ueda M. “Field model for multistate lateral diffusion of various trans- membrane proteins observed in living Dictyostelium cells”, *J. Cell Sci.* 136: jcs260280 (2023).
- [2] Utsunomiya S., Takebayashi K., Yamaguchi A., Sasamura T., Inaki M., Ueda, M., Matsuno, K. “Left-right Myosin-Is, Myosin1C, and Myosin1D exhibit distinct single molecule behaviors on the plasma membrane of *Drosophila* macrophages”, *Genes to Cells*, 29: 380-396 (2024).
- [3] Yasui M., Hiroshima M., Kozuka J., Sako Y., and Ueda M. “Automated single-molecule imaging in living cells”, *Nature Commun.* 9, 3061 (2018).
- [4] Watanabe, D., Hiroshima, M., Yasui, M. and Ueda, M. “Single molecule tracking based drug screening”, *Nature Commun.* 15, 8975 (2024).

発表論文等

[雑誌論文]

- ① Hiroshima, M., Bannai H., Matsumoto G., Ueda, M. “Application of single- molecule analysis to singularity phenomenon of cells”, *BPPB* 21, e211018 (2024).

[学会発表]

- ① Hiroshima M., Ueda M. “Automated single-molecule imaging for drug discovery”, High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy IX, SPIE, The Moscone Center, San Francisco California USA.
- ② Ueda M., Watanabe D., Takebayashi K. "Automated single-molecule imaging in living cells", NTU-OsakaU Bilateral Symposium on Systems Biology in Human Disease, National Taiwan University, Taiwan (2024).