T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	生細胞分子イメージングに基づくタンパク質分子動態と相互作用の定量解析
Title(English)	Quantitative analysis of protein dynamics and interactions by live-cell molecular imaging
著者(和文)	伊藤由馬
Author(English)	Yuma Ito
出典(和文)	学位:博士（工学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9803号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:徳永　万喜洋,十川　久美子,山口　雄輝,立花　和則,木村　宏
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9803号, Conferred date:2015/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生命情報　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（　工学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	伊藤　由馬	指導教員（主）： Academic Advisor(main)	徳永　万喜洋　教授
		指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	十川　久美子　准教授

要旨（和文 2000 字程度）
Thesis Summary（approx.2000 Japanese Characters ）

生きた細胞の中で、生体分子がどのように振る舞って機能しているか、分子動態と相互作用を定量的に明らかにして機能を解明することは、生命科学における大きな命題である。遺伝情報の発現、複製、修復は、生体システムを維持するための重要な機能であり、その制御において多くのタンパク質因子が、DNA とともに細胞核内で重要な役割を果たしている。したがって、これらのタンパク質因子の制御メカニズムを解明することが重要な課題である。そこで本研究では、分子イメージングを中核に据え、新たな手法開発とともに、情報伝達と遺伝情報に関わる分子動態の解明をおこなった。手法開発として、細胞表面分子の本来の動態を維持したまま、生きた細胞を基板上に保持する手法を開発した。解析方法として、生細胞内におけるタンパク質分子の多様な動態に対応した、蛍光１分子イメージング法と FRAP 法およびシミュレーションを組み合わせた定量解析法を考案し構築した。この新しい手法を生細胞分子イメージングに適用して、その詳細な分子動態の解析により、クロマチンとそのリモデリングに関わる新しい動的モデルの提示をおこなった。

第１章では、遺伝情報の制御を担うタンパク質因子であるヌクレオソームとそのリモデリング複合体について、現在までの知見を解説し、実際に生きた細胞核内における動態を調べることの重要性を述べた。さらに、蛍光顕微鏡を用いた生細胞の定量観察手法について言及し、多様なタンパク質の動態に対応した解析法が開発されていないために、その活用が不十分である現状の問題点を指摘した。その上で、生細胞分子イメージングを中核に据え、新たな手法開発とともに、遺伝情報と情報伝達に関わる分子の動態解明を、本論文の目的とした。

第２章では、ヌクレオソームの構成因子ヒストンタンパク質の生細胞内動態を解明するため、SNAP-tag を融合したヒストンタンパク質 H3.1 および H2A を、生きたヒト由来 HeLa 細胞内で薄層斜光照明法により蛍光 1 分子イメージングし、定量解析により、核内のヒストンタンパク質は異なる 2 つの動的状態として存在することを明らかにした。平均変位およびシミュレーションを用いた新たな解析手法を開発し、核内ヒストンタンパク質に適用することにより、個々のヌクレオソームは、異なる 2 つの動的状態を 1 秒程度の速度で確率的に遷移しているという、クロマチンの動的モデルを提案した。さらに、ヒストン H3.1 と H2A の動態比較から、状態間の遷移確率の制御がクロマチン機能に重要な機構であることが示唆された。

第３章では、クロマチンリモデリング動態の解明のため、INO80 クロマチンリモデリング複合体の主要構成因子 Ino80 に蛍光タンパク質を融合し、低濃度で定常発現させた HeLa 細胞にて生細胞蛍光 1 分子イメージングと定量解析をおこなった。さらに光褪色後蛍光回復法（FRAP 法）による定量解析と合わせて詳細な動態を解析した結果、核内の Ino80 はクロマチンと結合解離を繰り返しており、平均として 30%の Ino80 が 6 秒間の寿命で結合状態にあり、残りが拡散係数 2.3 $\mu m^2/s$ で 14 秒間の寿命で拡散状態にあることを明らかにし、核内クロマチンリモデリング複合体の新たな動態モデルを提案した。

第４章では、生きた細胞表面分子の本来の動態を維持したまま、細胞を基板上に保持する、簡便で汎用的な手法を確立した。ガラス表面上に構築した脂質二重膜は、流動性があり生体分子の結合も可能であり、分子動態保持に適している。しかし従来法では、煩雑なガラス表面洗浄処理や専用装置が必要であるため、生細胞観察への適用に困難が伴い、利用が限られていた。そこで、煩雑な処理や専用装置を必要としない、簡便な脂質二重膜構築法を開拓し確立した。当方法は、均一な膜を再現性高く調製でき、光学顕微鏡に限らず *in vitro* での表面分子の分析など、広汎に脂質二重膜を利用することを可能にした。さらにこの方法を用いて、免疫細胞表面の活性化微小領域であるマイクロクラスター（約 50 分子以上の集合体）内におけるＴ細胞受容体（TCR）とシグナル伝達分子の、生細胞３色同時 1 分子イメージングを実現した。定量解析から、マイクロクラスター内の相互作用を反映するものとして、TCR 等のシグナル伝達分子が少なくとも異なる 2 種類の動態をとっていることを見出した。

第５章では、総括として以上の結果をまとめ、今後の展望を述べた。本研究では、生きた細胞において、生理的に重要な機能を果たしている分子について、従来には得ることのできなかった、新しい動的な描像を定量的に明らかにすることができた。今後、本研究で用いた多色同時１分子イメージング法、FRAP 法に加え、FRET 法・FCCS 法・超解像顕微鏡法といった分子イメージングを統合的に用い、シミュレーションを加えた融合的な動態定量解析手法をさらに開発し、多種類の分子に適用することで、さらなるクロマチン動的メカニズムの解明をはじめとして、新たな分野を開拓できると期待される。

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生命情報　　専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（　工学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	伊藤　由馬	指導教員（主）： Academic Advisor(main)	徳永　万喜洋　教授
		指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	十川　久美子　准教授

要旨（英文 300 語程度）
Thesis Summary（approx.300 English Words ）

Analysis of molecular dynamics and interactions in living cells is an important subject in the life sciences. New methods are desired to elucidate quantitatively molecular dynamics and interactions of biomolecules in living cells. The present dissertation describes novel methods for preparation of glass-supported lipid bilayers and for quantitative analysis of molecular imaging in living cells. I applied these methods to clarify regulation of genetic information and signal transduction.

Chapter 1 is a general introduction of regulation of genetic information via nucleosomes and their remodeling complexes. Furthermore, quantitative analyses of molecular dynamics in living cell using fluorescence microscopy, such as single-molecule imaging and Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP), are also outlined.

Chapter 2 describes quantitative analysis of nucleosome dynamics in living cells. Single molecule imaging of histone H3.1 and H2A in living HeLa cells and novel quantitative analysis with simulation revealed that nucleosomes in chromatin exist in two diffusive states and transfer between the states.

Chapter 3 describes dynamics of chromatin remodeling complexes in living cells. Through combination approach of single-molecule imaging and FRAP analysis of green fluorescence protein tagged Ino80 protein in living HeLa cells, it was revealed that INO80 chromatin remodeling complexes dynamically associate with chromatin. Based on this, a quantitative model of the dynamics is proposed.

Chapter 4 describes a simple and rapid method for reproducible preparation of homogeneous glass-supported lipid bilayers. The method provides a facile means for bioimaging and analysis of molecular dynamics with retaining the innate motility of biomolecules on living cell surfaces. Using this method, I performed multi-color single-molecule imaging of T cell receptors (TCR) in the microclusters, initial signaling clusters containing approximately 50 or more TCRs, on activated living T lymphocytes. I found that the diffusion of TCR has at least two components in the microclusters. This suggests that TCR dynamically transfers different molecular states in the microclusters.

Finally, Chapter 5 summarizes and concludes the dissertation.

備考 ： 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).