

# THE 定量

青木 一洋

京都大学大学院医学研究科  
時空間情報イメージング拠点



# 今日の内容

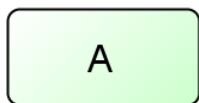
- イントロ
- 生化学的なパラメーターの定量
  - タンパク質濃度
  - 拡散定数
  - 解離定数
  - 反応速度定数
- その他の定量事例

簡単

↓  
難しい

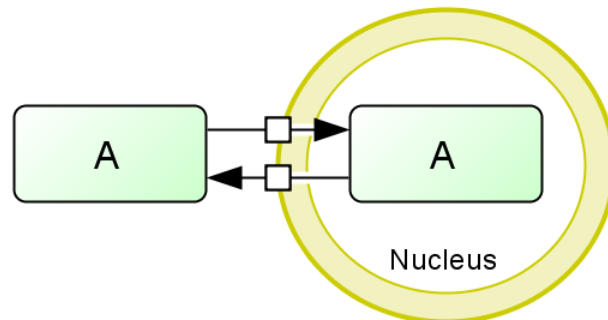
# 生化学的なパラメーター

タンパク質濃度



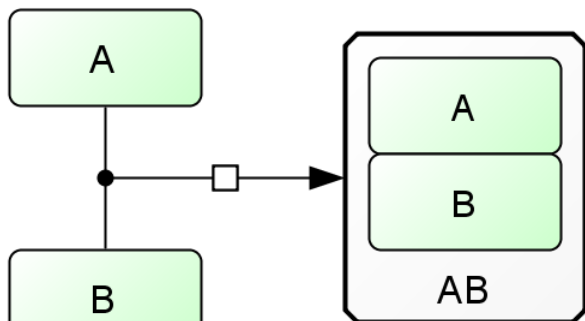
C [M]

拡散定数



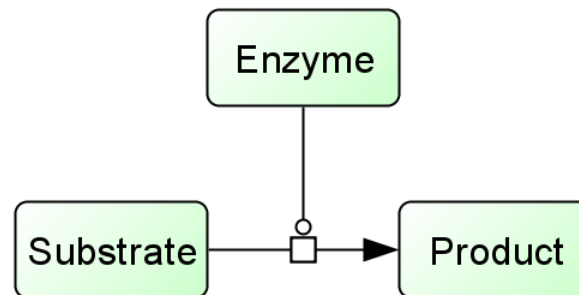
D [m<sup>2</sup>/sec]

解離定数(相互作用)



$K_d$  [M]

酵素反応速度定数

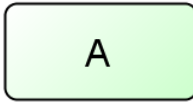


$k_{cat}$  [1/M/sec]    $K_m$  [M]

# タンパク質濃度/細胞

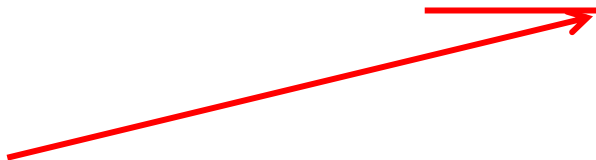
## タンパク質濃度

単位: M (モラー) = mol/L



C [M]

molecules/L/cell



1細胞あたりの分子数  
( $10^3 \sim 10^6$  個)

1細胞あたりの体積  
( $\sim$  pL)

少ない分子で 1~10 nM

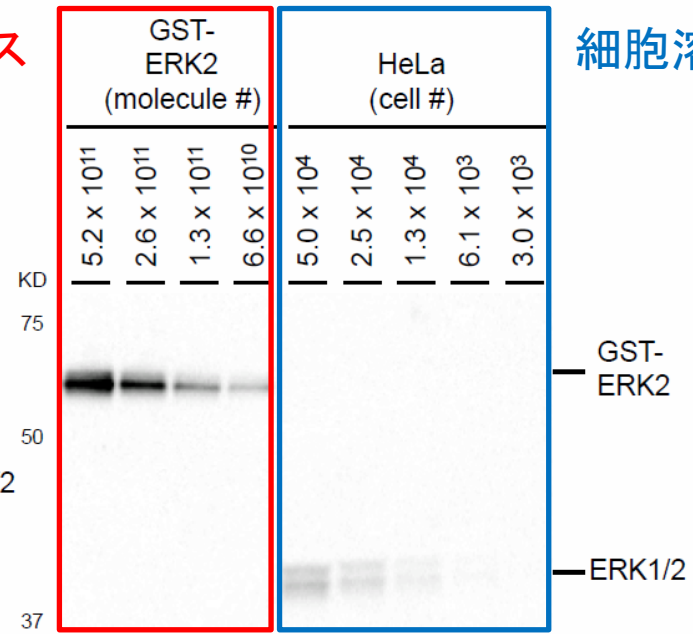
多い分子で 1~10  $\mu$ M

# 分子数/細胞の測定法-1

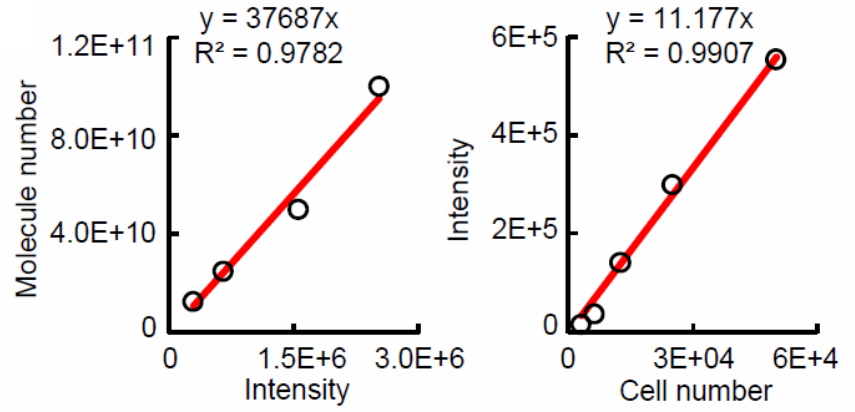
結構難しい

1. リファレンスとなるタンパク質を精製
2. 濃度を測定 (Bradford, BSAを基準にCBB染色)
3. 細胞の数を測定し (Cell counter)、決まった細胞数の細胞溶解液を準備する
4. 2, 3を流して、densitometryで定量

リファレンス

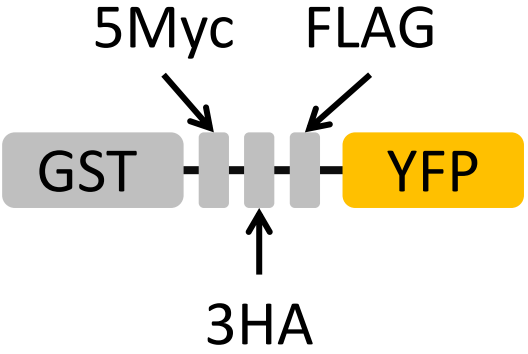


細胞溶解液



# タンパク質の精製ができない場合は

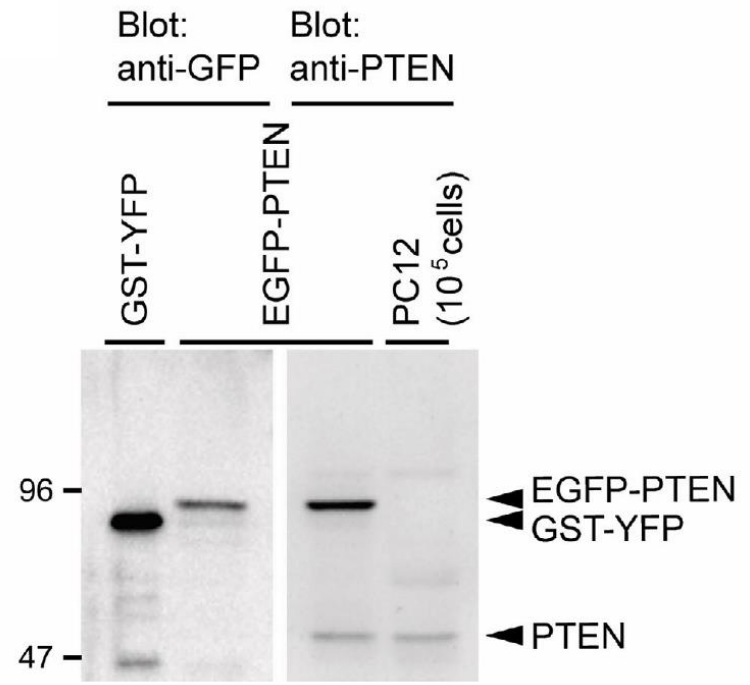
- 1. リファレンスとなるTagタンパク質を精製



- 2. Tagを融合したタンパク質を細胞に発現させて、細胞溶解液を作る

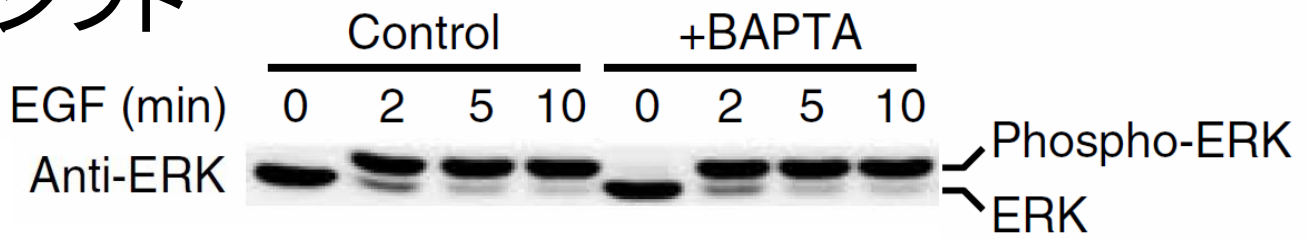
- 3. 二段階で定量する。

**1段階目** タグ融合タンパク質の数を定量  
**2段階目** 定量したタグ融合タンパク質から内在性のタンパク質濃度を逆算



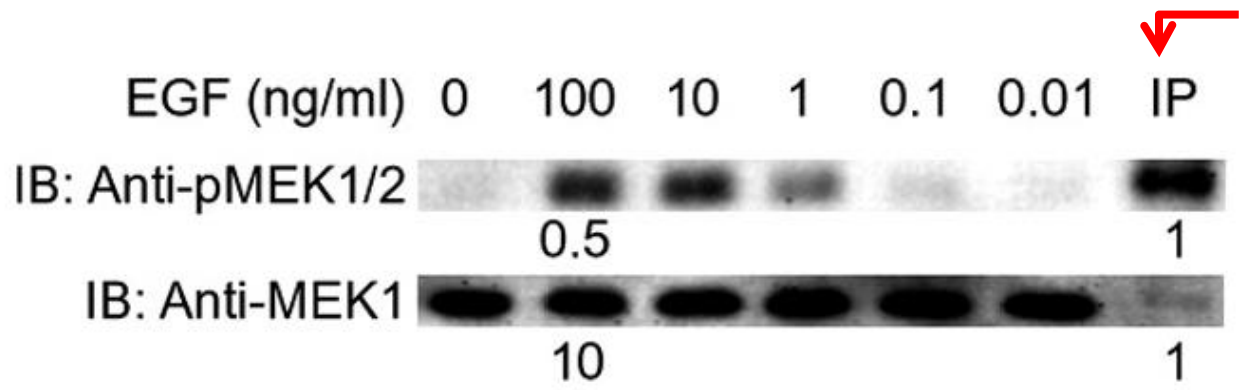
# 余談:リン酸化量の定量

## 1. バンドシフト



Terai et al., EMBO Rep, 2006

## 2. 100% リン酸化Referenceを作る



リン酸化抗体でIPした  
サンプル  
(100% リン酸化)

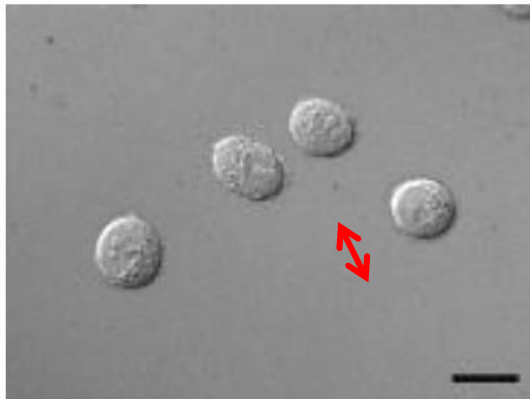
Fujioka et al., JBC, 2006

## 3. Phos-tag (後述)

# 細胞の体積の定量

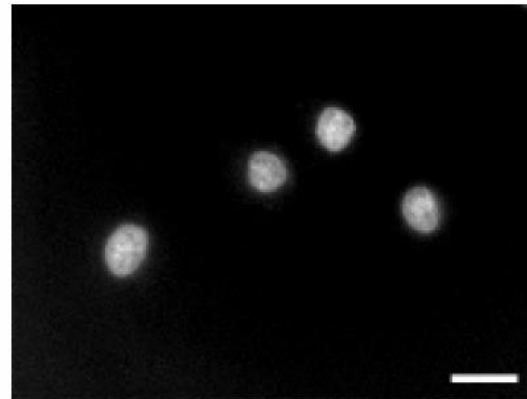
培養細胞をトリプシンではがして、球として計算

Differential interference  
contrast



細胞体+核

Hoechst 33258



核

$$Volume = \frac{4}{3} \pi r^3$$

共焦点で測定してもあまり変わらなかった。



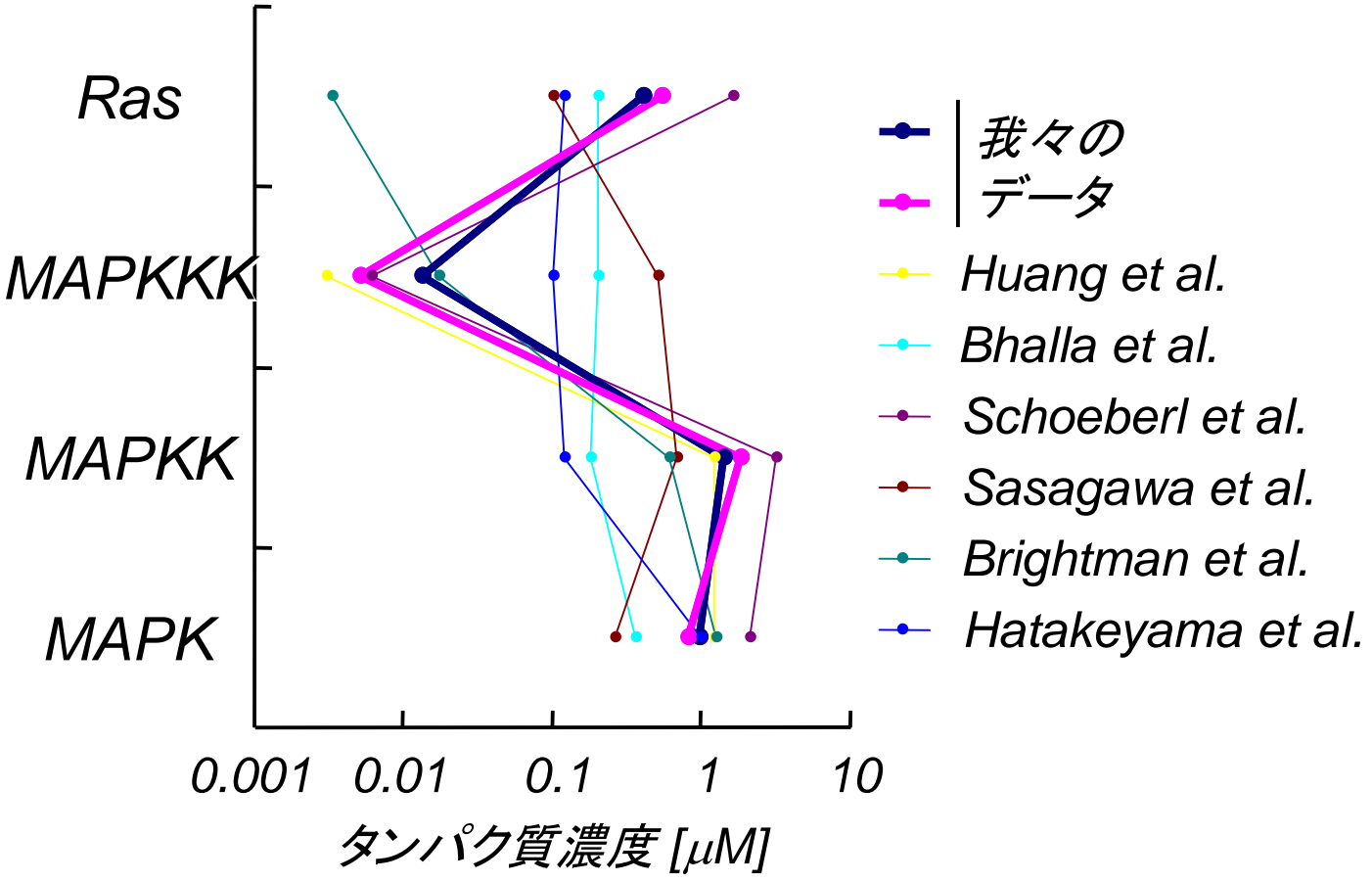
# タンパク質の濃度測定あれこれ

- Western blottingに付随するブレ
  - トランスファームラ
  - 当てムラ
  - 抗体 (polyclonal or monoclonal)
- 体積のブレ
  - 細胞ごとのブレ

→ 細かいことは気にしない！

有効数字一桁くらいが限界

# 分子数を知るだけでも面白い

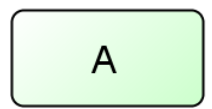


# コメント、将来展望

- 内在性の分子を認識する抗体が必要、時間がかかるが、比較的簡単
  - 質量分析による絶対定量。
- 大多数の細胞の平均値となっている
  - TALEN、CRISPRによる1細胞レベルでの内在性分子の可視化

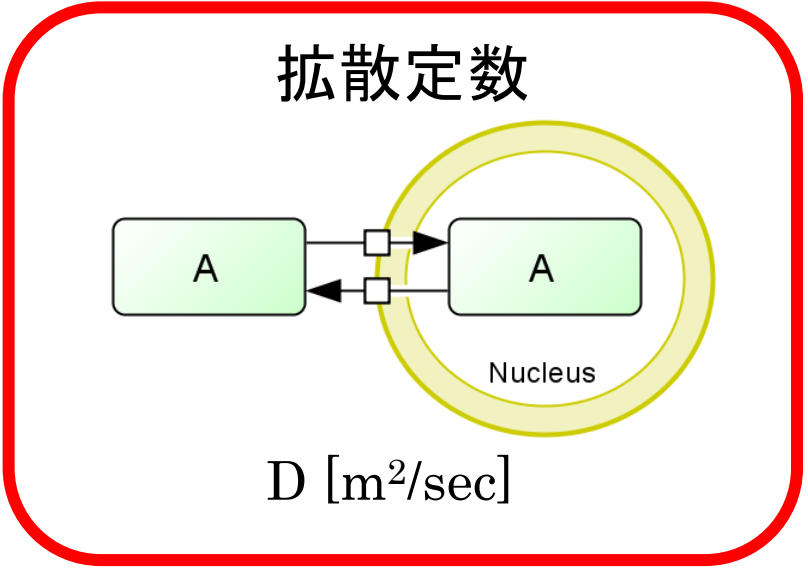
# 生化学的なパラメーター

## タンパク質濃度



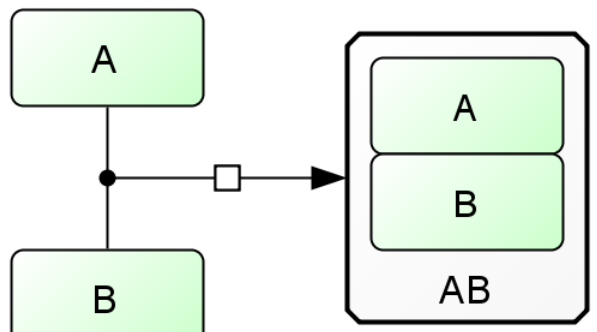
C [M]

## 拡散定数



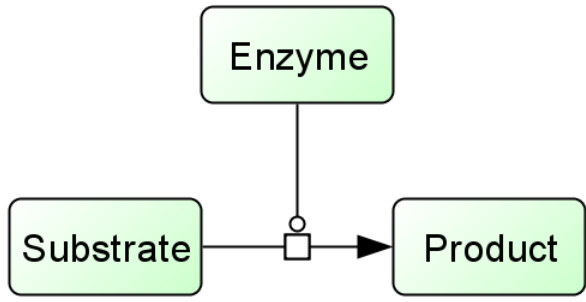
D [m<sup>2</sup>/sec]

## 解離定数(相互作用)



K<sub>d</sub> [M]

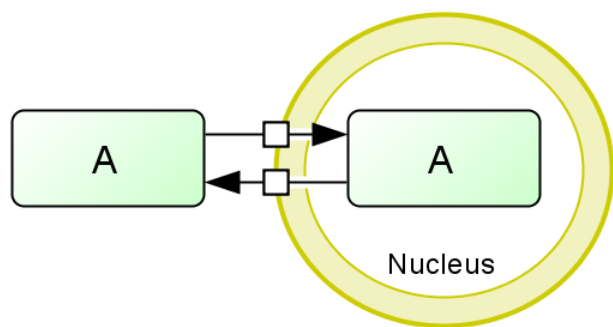
## 酵素反応速度定数



k<sub>cat</sub> [1/M/sec]    K<sub>m</sub> [M]

# 拡散定数

## 拡散定数



拡散定数  $D$  [ $\text{m}^2/\text{sec}$ ]

核内核外  
移行速度  $k_{\text{imp}}, k_{\text{exp}}$  [ $1/\text{sec}$ ]

拡散が早い分子(細胞質)で  $1\sim 10 \mu\text{m}^2/\text{sec}$

→ 培養細胞スケールであれば、数秒で端から端まで動く

→ 従って、細胞内の反応の多くは活性化律速(×拡散律速)

拡散が遅い分子(細胞膜)で  $0.01\sim 0.1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$

# Stokes-Einsteinの式

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$

$D$  拡散速度 [ $\text{m}^2/\text{sec}$ ]

$\eta$  粘性係数 [ $\text{g}/\text{m}/\text{sec}$ ]

$k_B$  ボルツマン定数 [ $\text{m}^2 \text{g sec}^{-2} \text{K}^{-1}$ ]  $R$  流体力学的粒子半径 [ $\text{m}$ ]

$T$  絶対温度 [ $\text{K}$ ]

ねばねばの液体 ( $\eta$ 大)  $\rightarrow$  拡散遅い

でかい分子 ( $R$ 大)  $\rightarrow$  拡散遅い ( $R$ は分子量  $M$ の1/3乗)

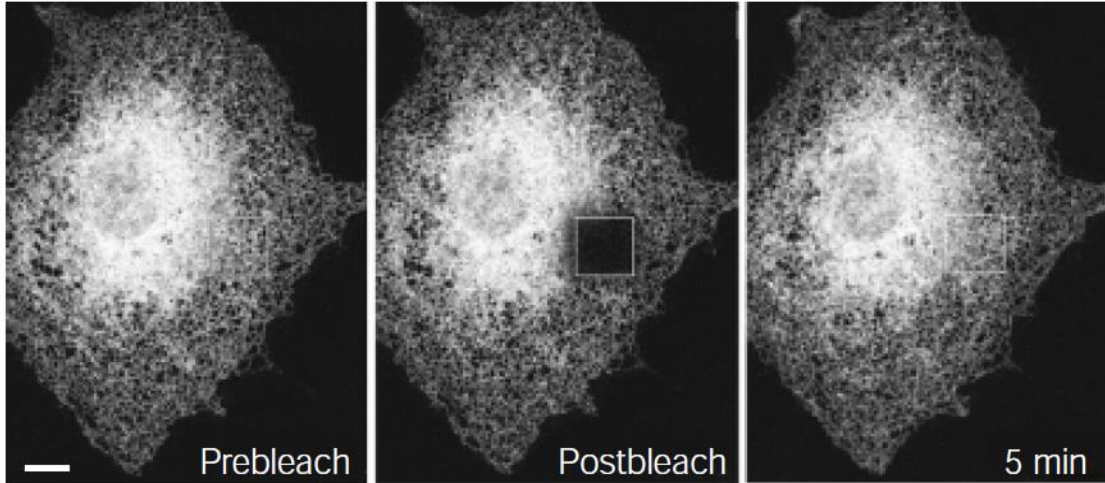
温度はあまり関係ない ( $0\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$ )

# どうやって測定するか：蛍光イメージング

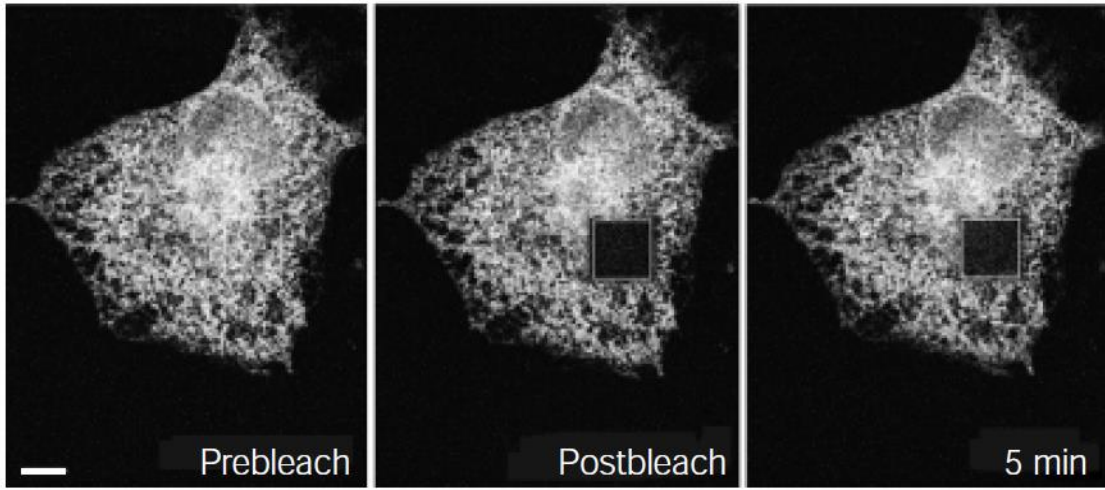
- FRAP (fluorescence recovery after photo-bleaching 褪色後蛍光回復法), FDAP (fluorescence decay after photo-activation 光活性化後蛍光減衰法)
  - 拡散速度が小さい分子の測定に適している
- FCS (Fluorescence correlation spectroscopy 蛍光相関分光法)
  - 拡散速度が大きい分子の測定に適している

# FRAP 褪色後蛍光回復

生細胞



ホルマリン  
固定細胞





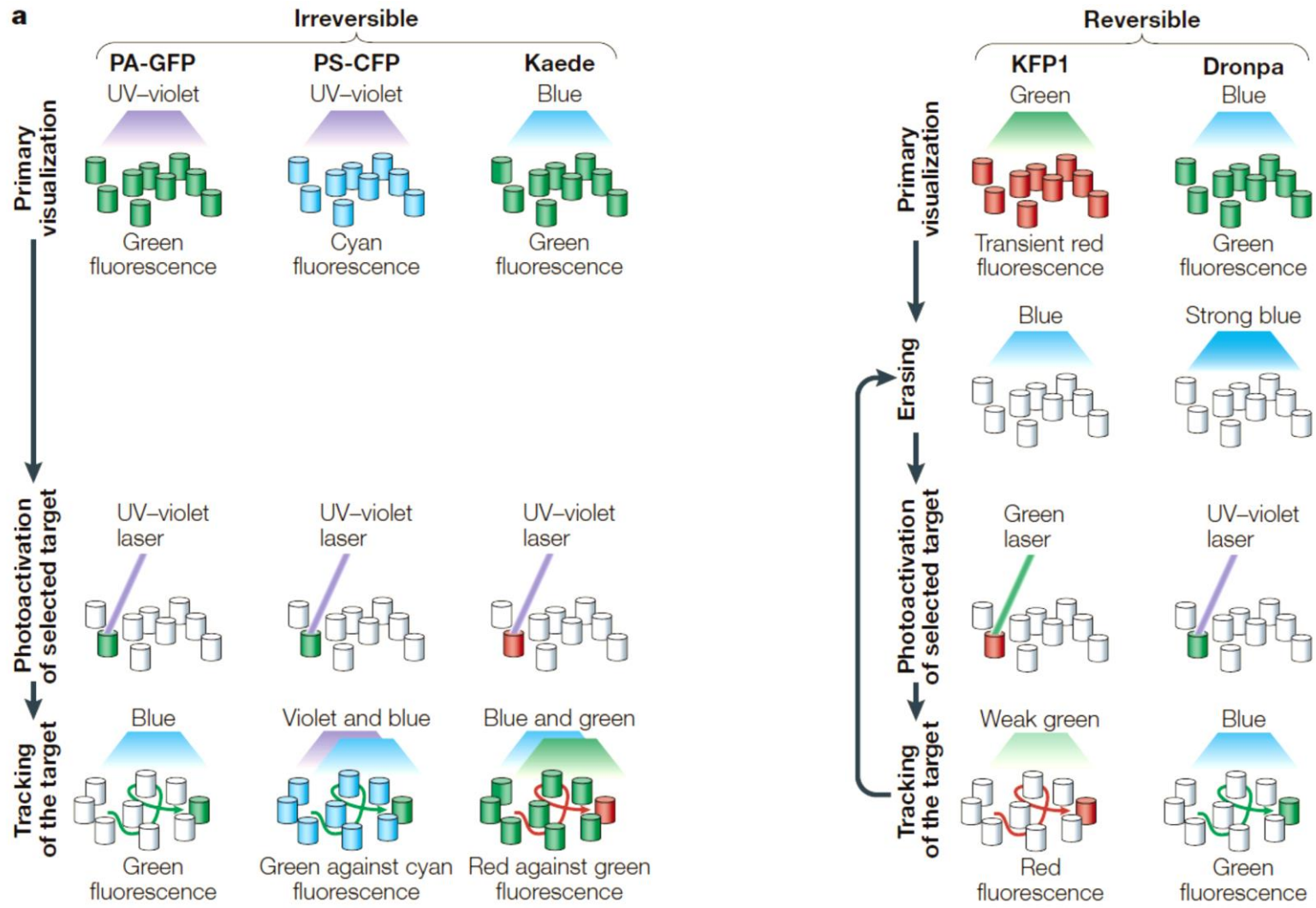
# Photo-bleaching by CLSM



Venus-KRasCT

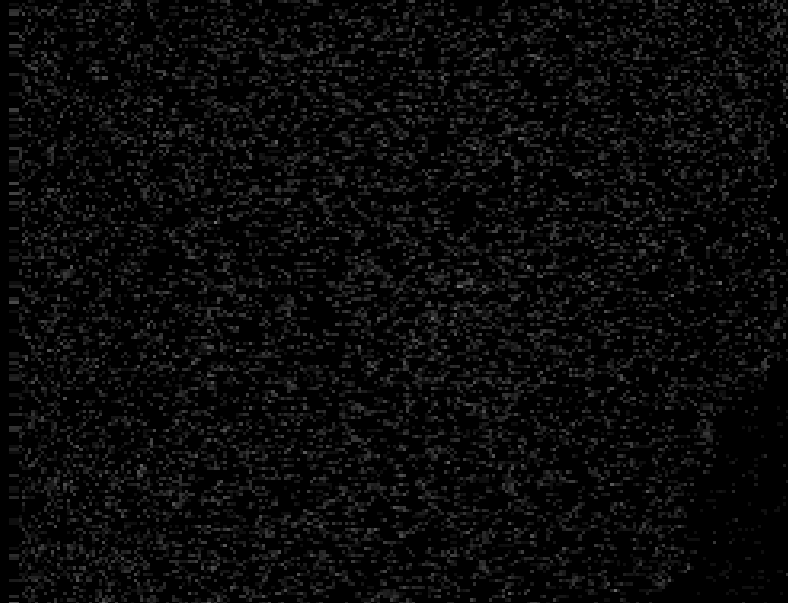
形質膜アンカー

# 光活性化型蛍光タンパク質



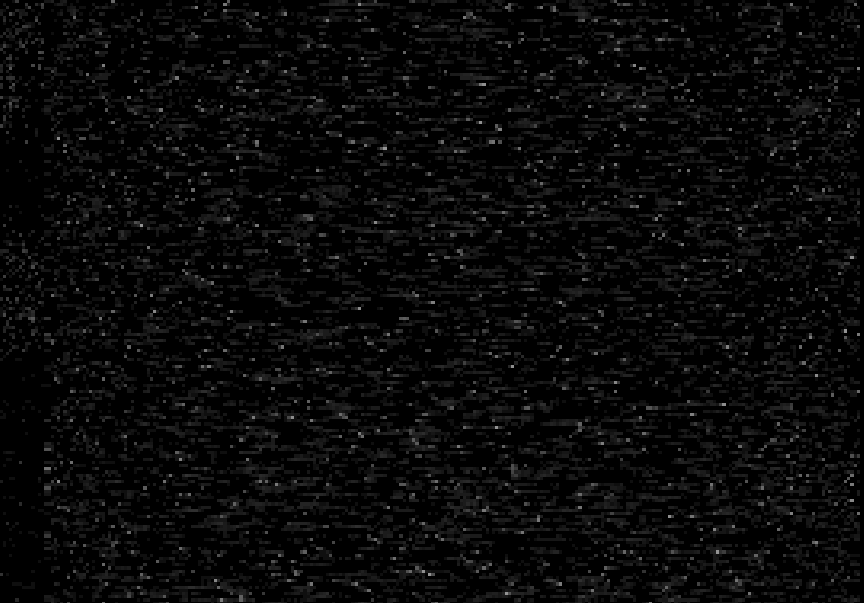
# Diffusion of PA-GFP in a cell and in PBS

00.000 sec



GST-paGFP in a cell

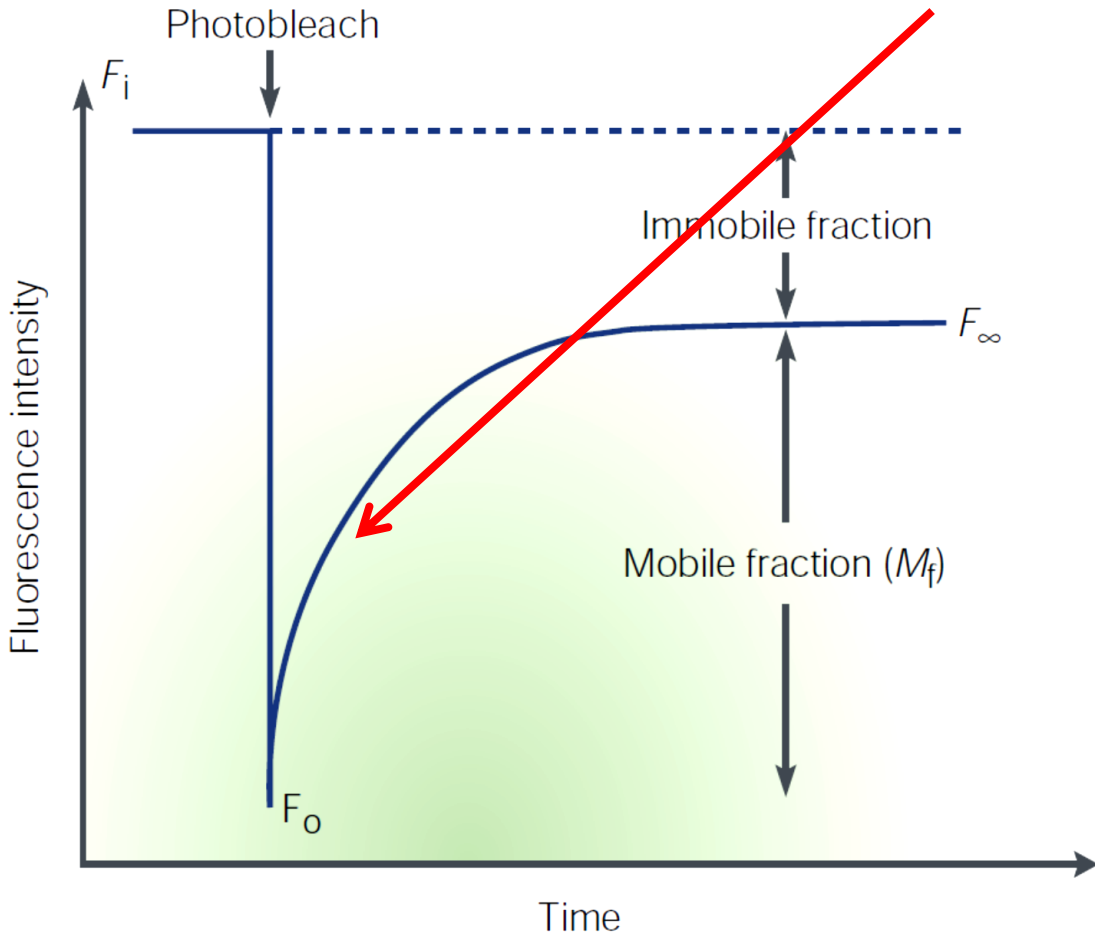
00.000 sec



GST-paGFP in PBS

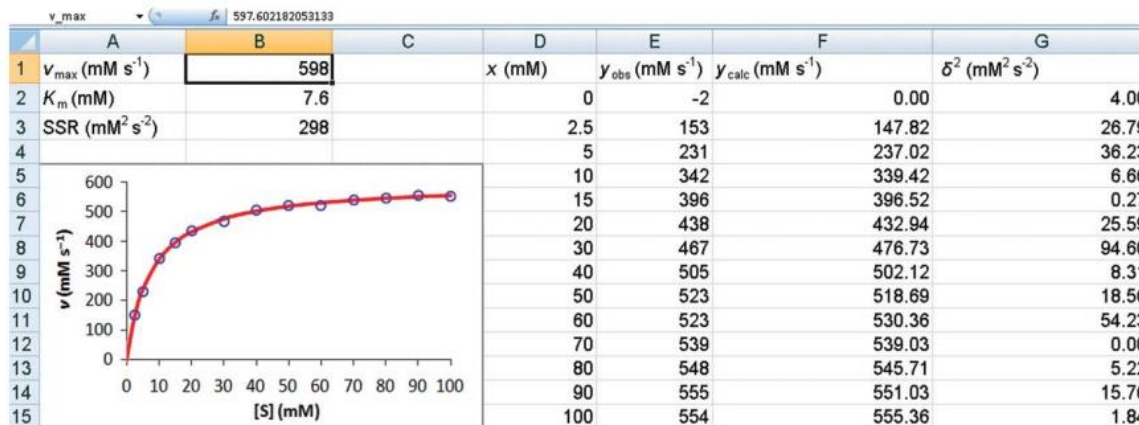
# FRAPによる拡散速度の定量

時定数  $\rightarrow$  拡散時間  $\tau_D$



# (Non-linear) fitting ってどうやるの？

→ Excel の Solver による最適化が簡単  
 実験やってる人は覚えて損はない



**Figure 6** | Worksheet after the completion of Step 10. Cells B1 and B2 contain the best-fit values for  $v_{\max}$  and  $K_m$ , respectively. The solid red line represents the best fit ( $y_{\text{calc}}$ ) to the measured data ( $y_{\text{obs}}$ ; blue scatter).

この論文参照して↓

# (二次元拡散の) 拡散速度の算出

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau_D}$$

$D$  拡散速度 [m<sup>2</sup>/sec]

$\omega$  ブリーチ半径 [m]

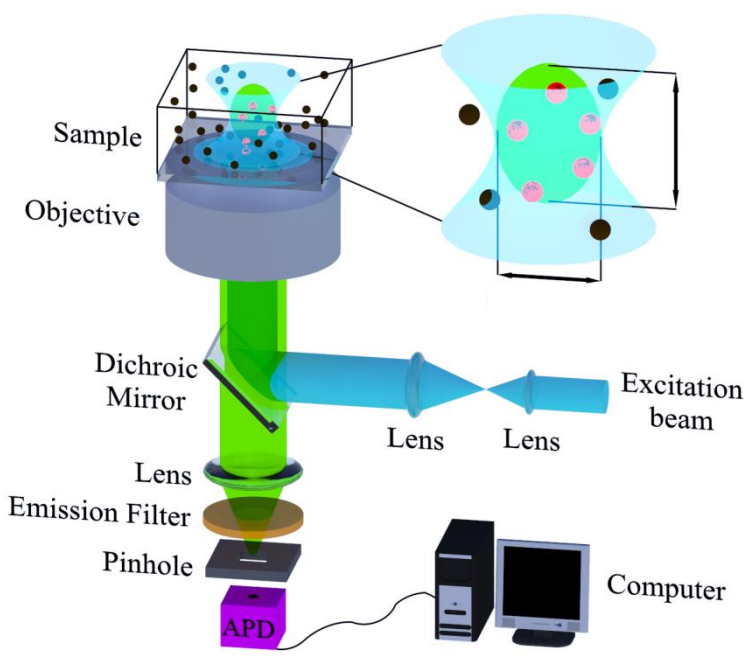
$\tau_D$  拡散時間 [sec]

あくまで二次元拡散、かつ円の領域を褪色させた  
ときに適応できる理論

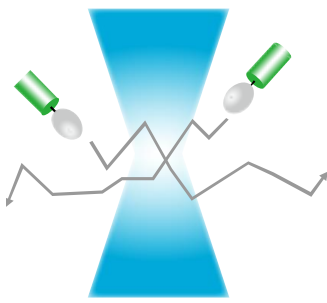
- 細胞膜分子の拡散(二次元)のときには使える
- 細胞質分子の拡散のときには別の式を使わないといけない。細胞形状の影響がコントロールしづらい

# 蛍光相関分光法FCS

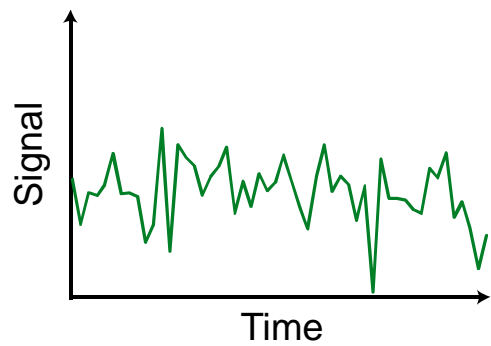
### 共焦点レーザー顕微鏡



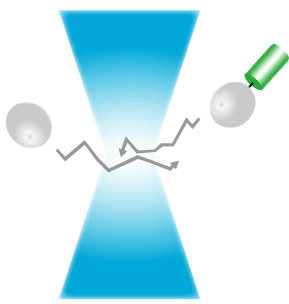
### 早い拡散



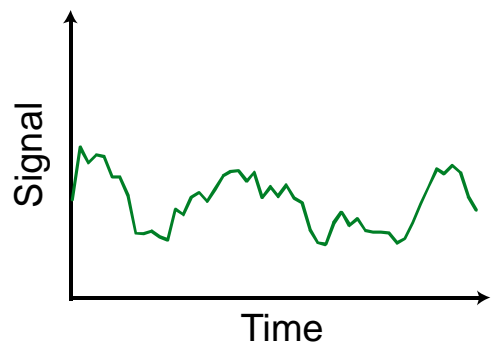
### 早い揺らぎ



### 遅い拡散

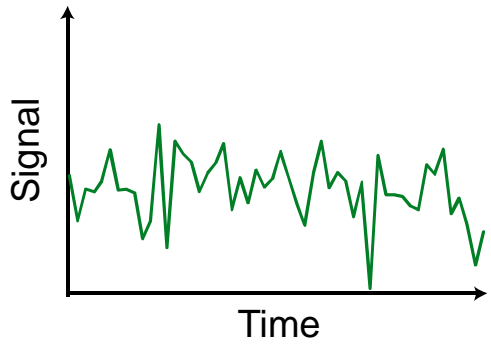


### 遅い揺らぎ

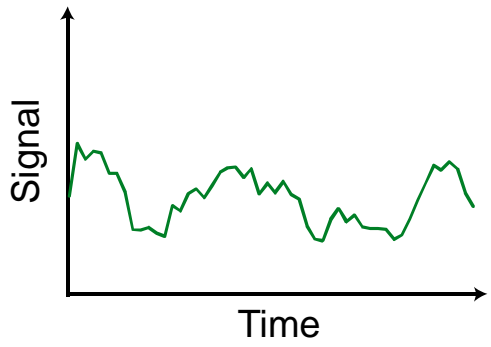


# 自己相関関数

早い揺らぎ



遅い揺らぎ

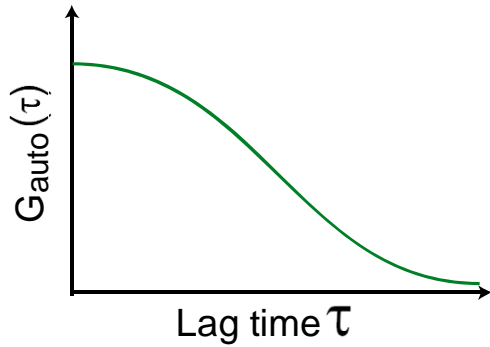


自己相関関数

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \rangle \langle \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle \delta F(t) \rangle^2}$$

$$\delta F(t) \equiv F(t) - \langle F(t) \rangle$$

$$\langle F(t) \rangle \equiv \text{平均値}$$



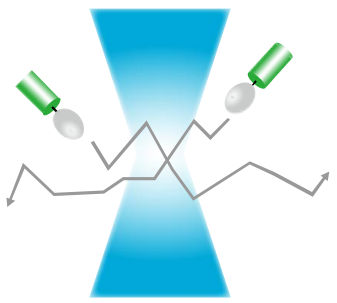
ラグ時間τ後に、  
どれくらい相関が  
残っているか

自己相関関数は自力でも求められますがMatlabやRなどで一瞬で計算可能

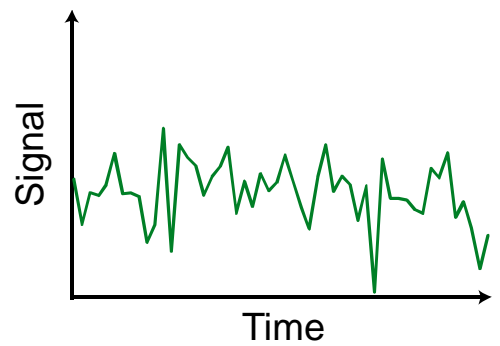


# 蛍光相関分光法FCS

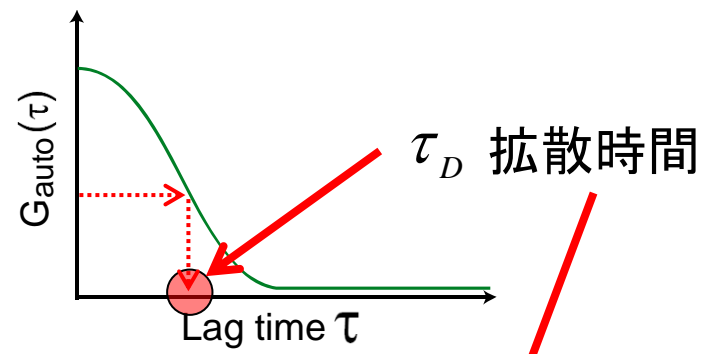
早い拡散



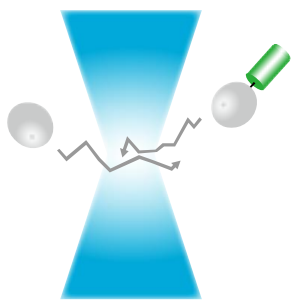
早い揺らぎ



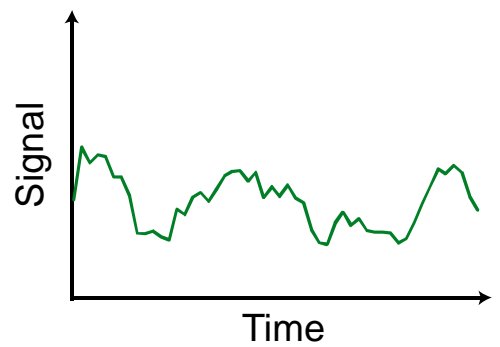
自己相関関数  
小さい拡散時間



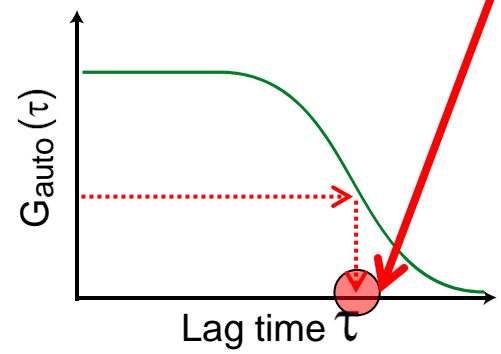
遅い拡散



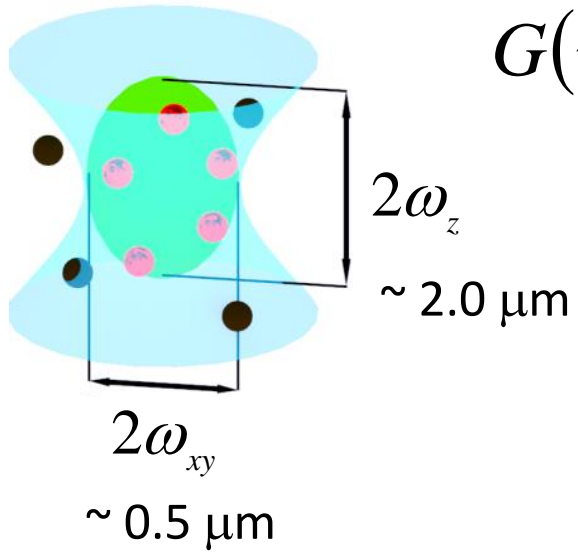
遅い揺らぎ



大きい拡散時間



# 3D単純拡散モデル



$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \sqrt{\frac{1}{1 + 1/k^2 \cdot \tau/\tau_D}}$$

$$G(0) = \frac{1}{V_{eff} C} \rightarrow \text{共焦点体積の中の蛍光分子数}$$

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_{xy}^2 \omega_z \text{ 実効体積 (共焦点体積) [m}^3\text{]}$$

大体、~ fL くらい。細胞の体積が ~ pL。

拡散速度の式

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_D}$$

$C$  蛍光分子濃度 [molecules/m<sup>3</sup>]

$\tau_D$  拡散時間 [sec]

$k$  構造定数 (structure parameter)  
=  $Z_0/r_0 \sim 2-5$

# Rhodamine 6Gをつかって $\omega$ , $k$ を求める

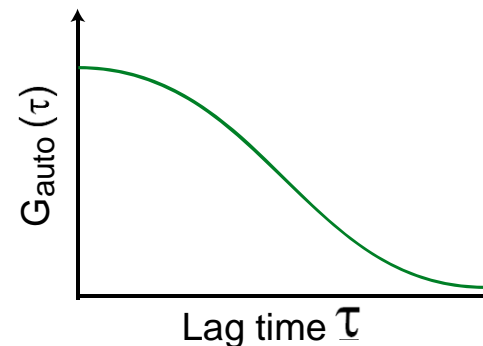
0. 水溶液中のRhodamine 6Gの拡散定数(20°C)は

$$D_{Rhod6G} = 280 \quad [\mu\text{m}^2/\text{sec}]$$

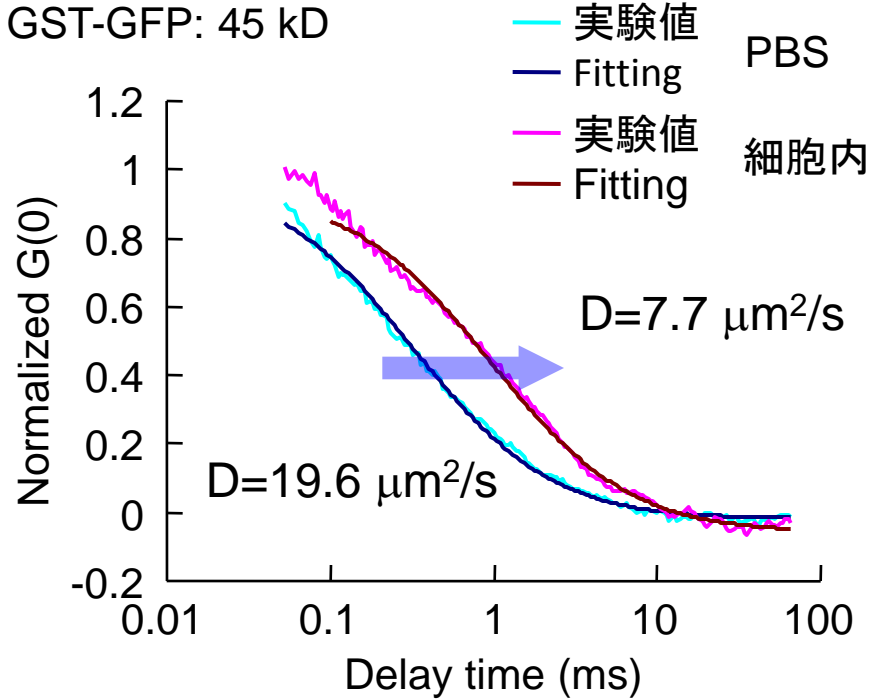
と分かっている。

1. 水溶液中のRhodamine 6GのFCS測定をする。
2. 得られた自己相関関数を3D単純拡散モデルでフィッティングし  $\tau_D$ ,  $k$  を求める
3. 拡散速度の式に代入して  $\omega_{xy}$  を求める

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_D}$$



# FCS 実例



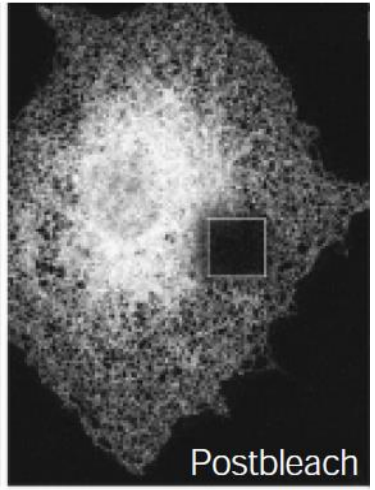
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$

↑  
粘性

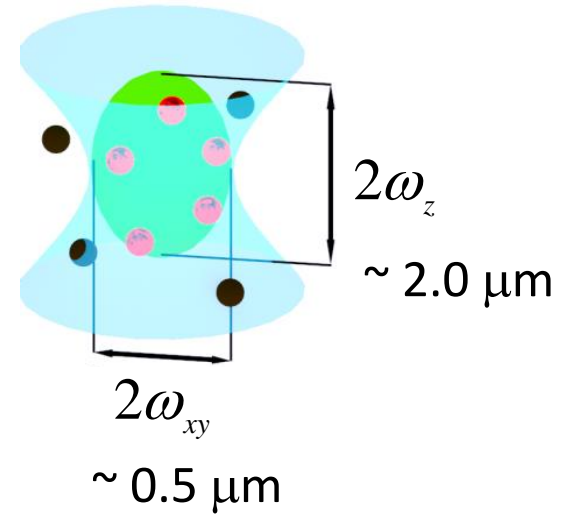
細胞内環境は水に比べて2-3倍粘性が高い

# FRAP vs FCS

## FRAP



## FCS



$\omega_{xy}$  大きい ( $\sim 1-10 \mu\text{m}$ )

時間分解能  $\sim \text{msec}$

➔ マクロスコピックな拡散現象

$\omega_{xy}$  小さい ( $\sim 0.5 \mu\text{m}$ )

時間分解能  $\sim \mu\text{sec}$

➔ ミクロスコピックな拡散現象

共焦点レーザー顕微鏡があればできる

共焦点レーザー顕微鏡+専用の装置、ソフトが必要。

# 異常拡散、分子混み合い

マクロスコピックな拡散

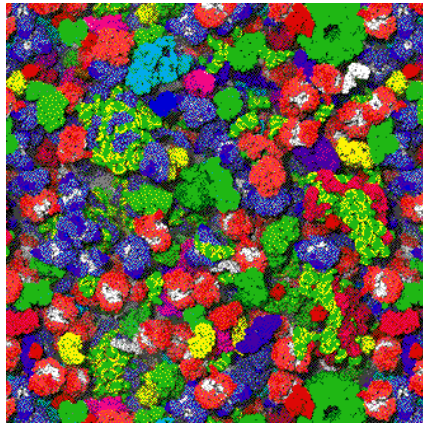
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$



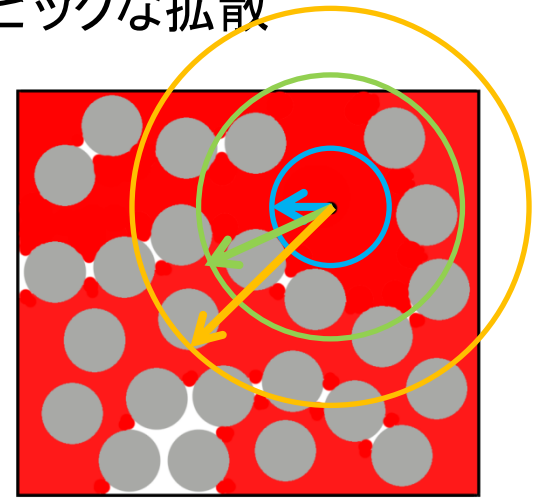
粘性

(マクロスコピックな物理定数)

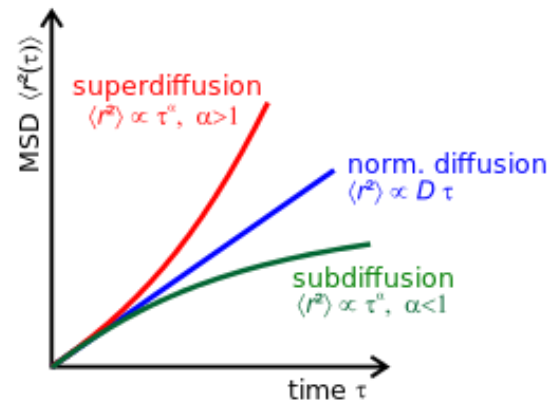
ミクロスコピックな拡散



McGuffee SR, Elcock AH. PLoS Comput Biol. 2010



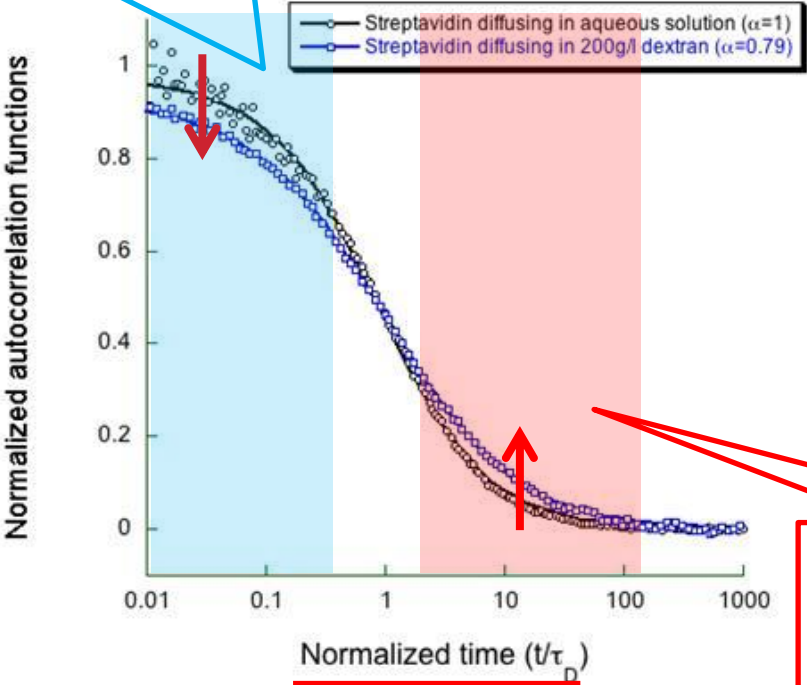
Time t1 t2 t3



$$D = D_0 t^\alpha$$

# FCSによる異常拡散の定量

マイクロなスケールではすぐに相関がなくなる。  
隙間のところで早く拡散するから。



$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{1 + (\tau/\tau_D)^\alpha} \sqrt{\frac{1}{1 + 1/k^2 \cdot (\tau/\tau_D)^\alpha}}$$

$$D = D_0 t^\alpha$$

$\alpha$  Anomalous exponents

マクロなスケールでは相関があがる。  
混み合い分子により動きにくくなるから。

Banks et al., 2004, 60(2), 131-139.

# 核内核外移行速度の定量

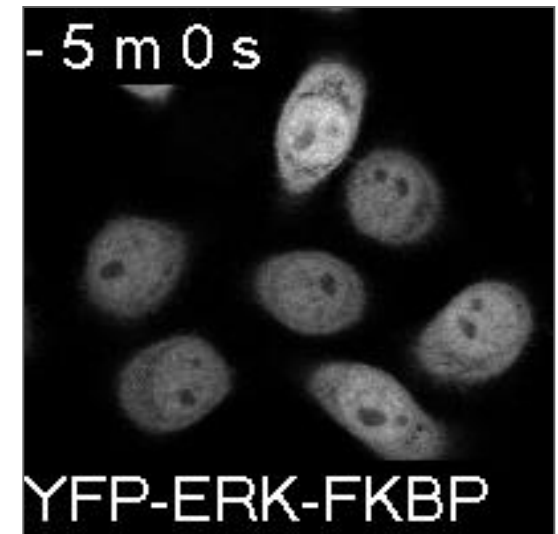
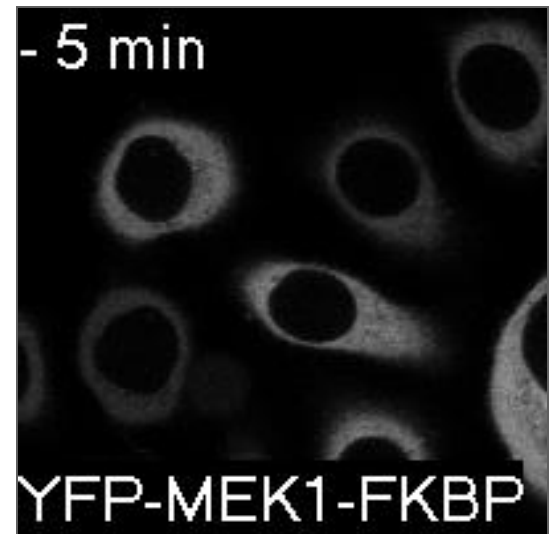
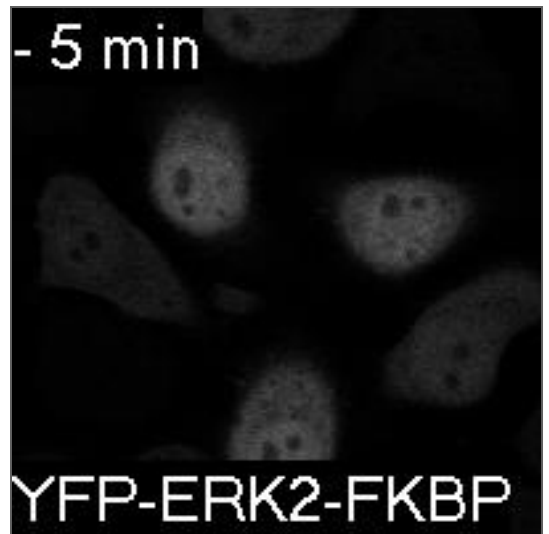
## 核内移行速度

- (1) YFP-ERK2-FKBP
- (2) H1-FRB

- (1) YFP-MEK1-FKBP
- (2) H1-FRB

## 核外移行速度

- (1) YFP-ERK2-FKBP
- (2) FRB-NES



共焦点顕微鏡;  
HeLa 細胞

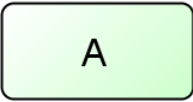


# コメント、将来展望

- 顕微鏡は高いが、顕微鏡さえあれば、蛍光タンパク質をくっつけて測定するだけ。比較的簡単。
- ただ、細胞質に局在するようなタンパク質は拡散速度が大きいことから、ほぼ一瞬で細胞の端から端まで動く
- 細胞膜や細胞内オルガネラに局在するようなタンパク質に関しては、まだまだ拡散速度を測定することで面白いことが見えてくると思われる。

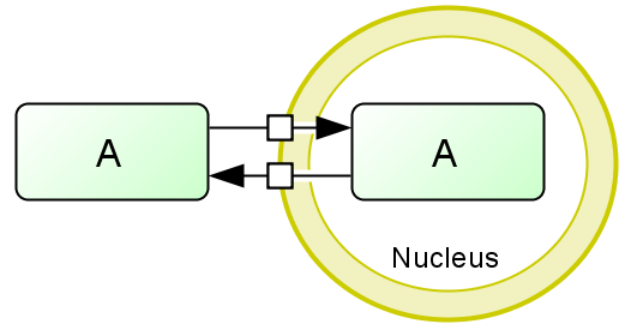
# 生化学的なパラメーター

タンパク質濃度



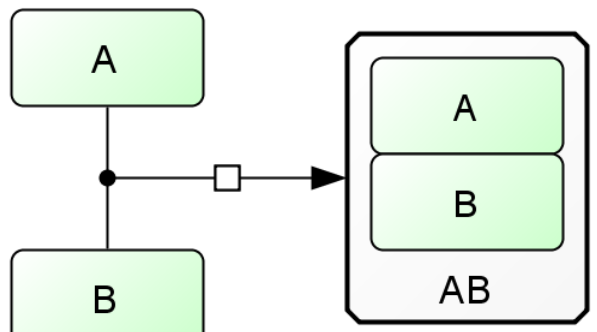
C [M]

拡散定数



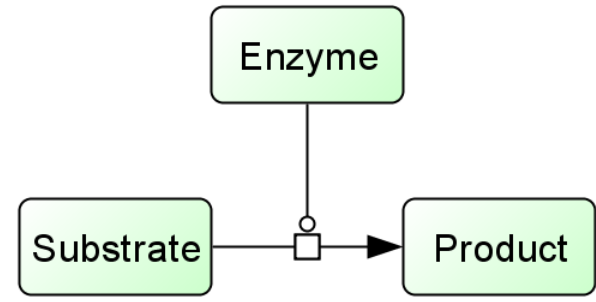
D [m<sup>2</sup>/sec]

解離定数(相互作用)



K<sub>d</sub> [M]

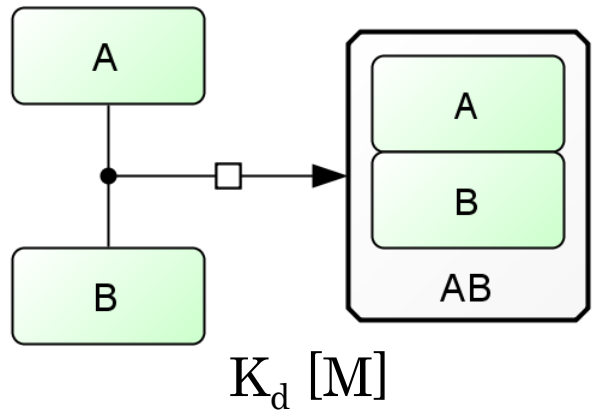
酵素反応速度定数



k<sub>cat</sub> [1/M/sec]    V<sub>max</sub> [M]

# タンパク質相互作用、解離定数

解離定数(相互作用)



$$K_d = \frac{k_b}{k_f} \frac{[/\text{sec}]}{[/\text{M}/\text{sec}]} \rightarrow [\text{M}]$$

単位は  
モラー

小さければ小さいほど強い結合力

- ~ nM: めっちゃ強い
- ~ μM: あんまり強くない

# 平衡状態近似によるKdの計算式

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_f [A][B] + k_b [AB] = 0$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_f [A][B] + k_b [AB] = 0$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_f [A][B] - k_b [AB] = 0$$

この辺が  
平衡状態

$$\frac{k_b}{k_f} = K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} \leftarrow$$

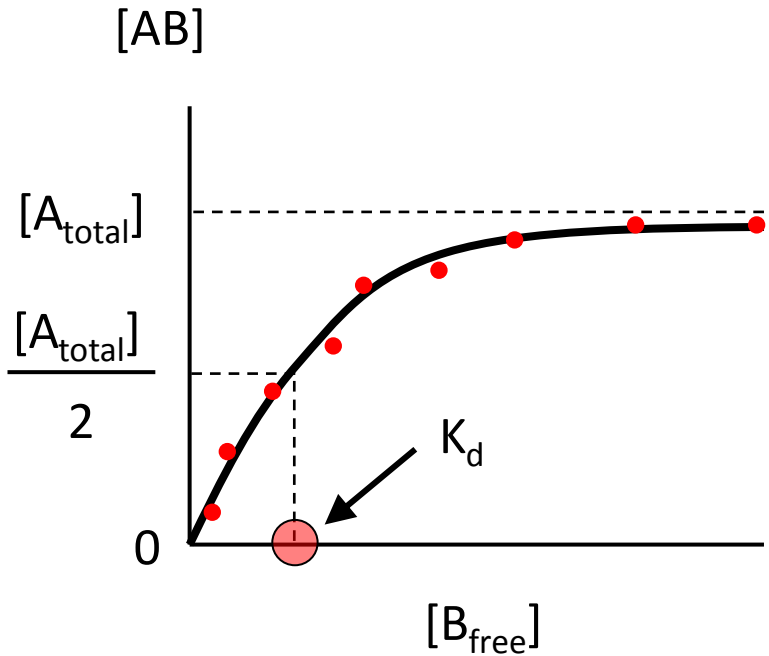
[A], [B]は、  
結合していない、  
フリーのA, Bの濃度

# 平衡状態近似によるKdの計算式

$$K_d = \frac{[A_{free}][B_{free}]}{[AB]}$$

$$[AB] = \frac{(totalA - [AB])[B_{free}]}{K_d}$$

$$[AB] = \frac{totalA[B]}{K_d + [B]}$$



# Scatchard plot法

受容体等のタンパク質へのリガンドの結合を解析する際に用いられてきた古典的手法である<sup>[1]</sup>。受容体Bに対するリガンドAの結合を考えると、受容体総濃度 $B_{max}$  = (非結合型のBの濃度) + (Aの結合したBの濃度) =  $[B] + [AB]$ であり、これを式(2)に代入すると

$$K_B = \frac{[AB]}{[A](B_{max} - [AB])}$$

これを变形すると

$$\frac{[AB]}{[A]} = K_B(B_{max} - [AB]) \quad \dots\dots(3)$$

Scatchard解析では慣例的に以下の記号を用いる。

B (Boundの意): リガンドA-受容体Bの複合体の濃度 (=  $[AB]$ )

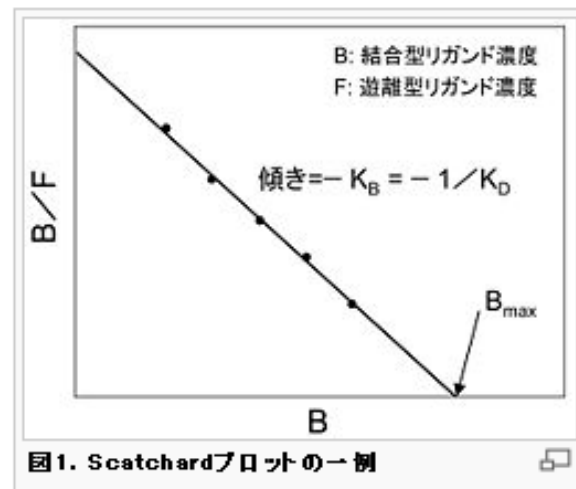
F (Freeの意): 遊離型のリガンドAの濃度 (=  $[A]$ )

これらの記号を用いると、式(3)は以下のように書き換えられる。

$$\frac{B}{F} = K_B(B_{max} - B)$$

Bを横軸、B/Fを縦軸にとると直線関係が得られ、その傾き(=  $-K_B$ )より $K_B$ が求められる(図1)。性質の異なる複数の結合が存在する場合には、プロットは複数の直線が合成された形の曲線となる。

Scatchardプロットの作成に必要なBおよびFの値は、 $^3\text{H}$ や $^{125}\text{I}$ などの放射性同位元素で標識したリガンドを用いた結合実験により測定できる。結合型と遊離型のリガンドを分離する手法としては、低分子量化合物のみを通す透析膜を用いた平衡透析法や、一定以上の分子量のものを通さない限外ろ過膜を用いた限外ろ過法などがある。

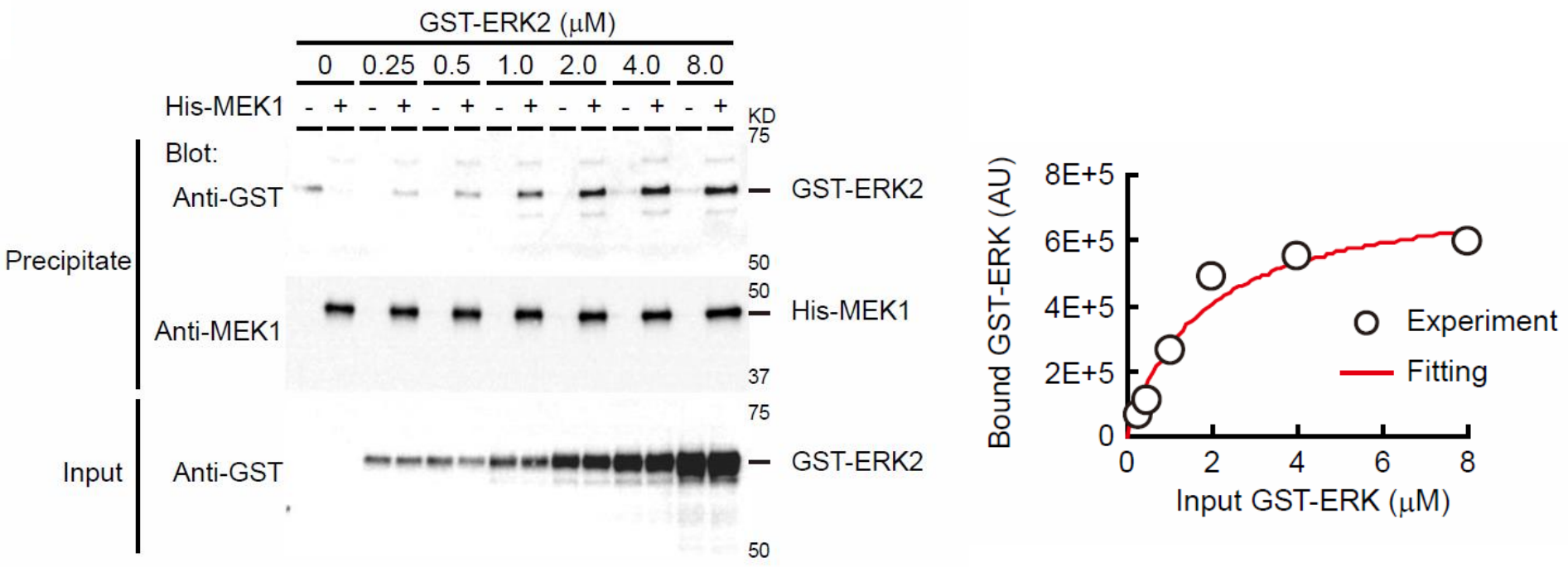


# タンパク質間相互作用の検出法

- In vitro
  - In vitro結合アッセイ
  - 表面プラズモン共鳴法
- In vivo (in cellulo?)
  - 蛍光共鳴エネルギー移動 FRET
  - 蛍光相関分光法 FCCS
  - ~~– 二分子蛍光相補 BiFC~~
  - ...

# In vitro結合アッセイ

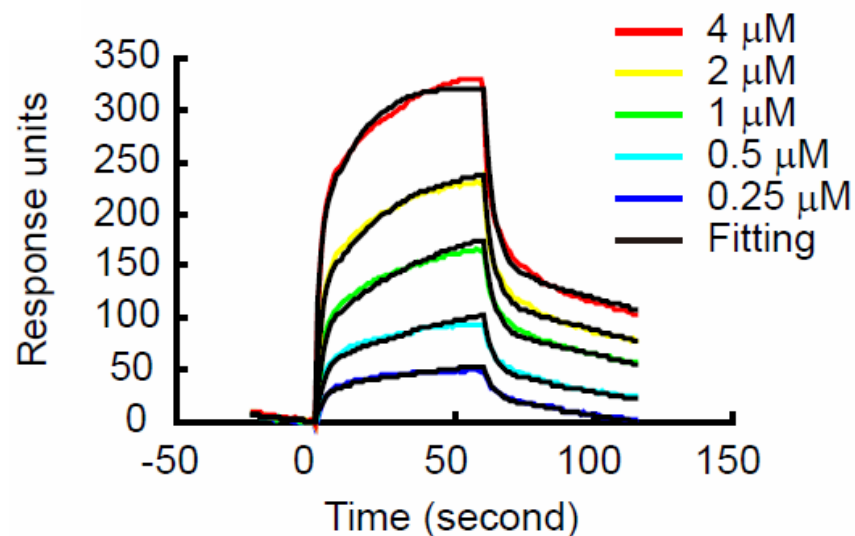
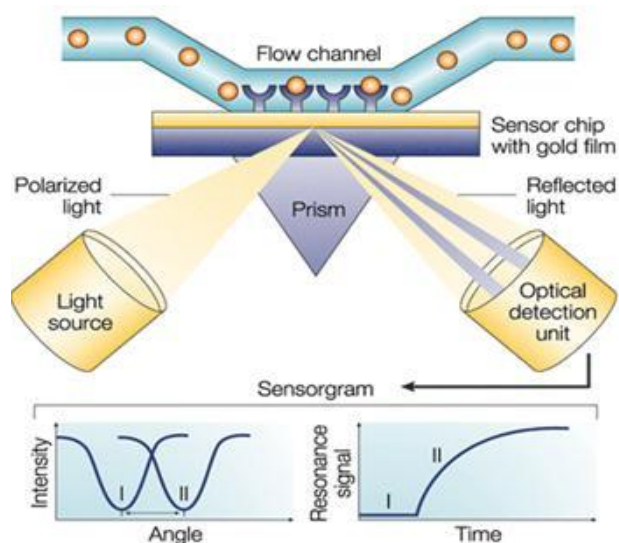
- 1. 結合タンパク質を精製する(結構難しい)
- 2. チューブ内で混ぜて、ビーズで共沈させる
- 3. Western blottingで定量





# 表面プラズモン共鳴法 BIACORE

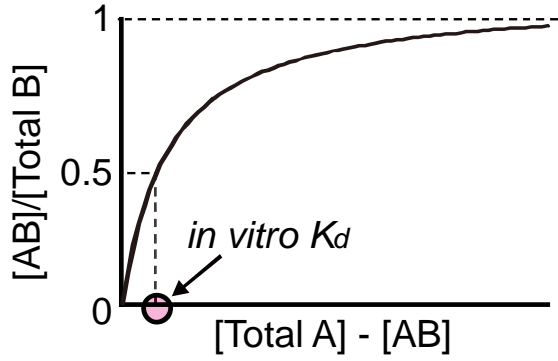
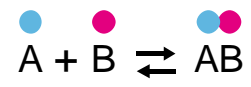
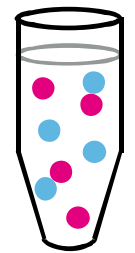
1. 結合タンパク質を精製する(結構難しい)
2. 片方をチップに固定
3. もう片方のタンパク質を流して、RU (Response unit)を測定



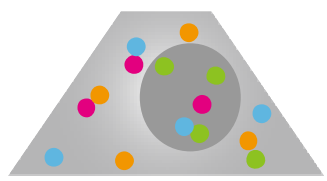
メリット: 結合速度定数 ( $k_f$ )、解離速度定数 ( $k_b$ ) も測定できる

# In vitro と In vivo の違い

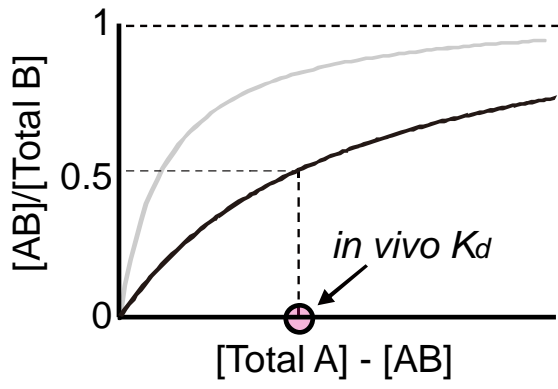
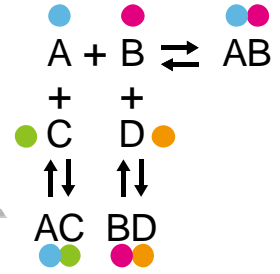
*in vitro*



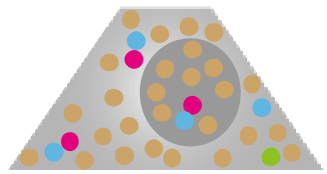
*in vivo*



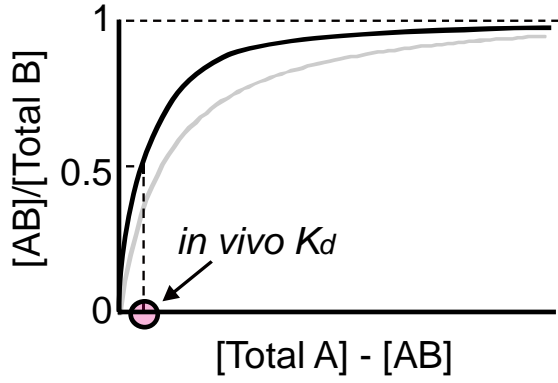
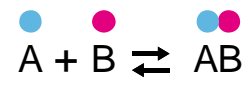
競合阻害



In vivo Kd > In vitro Kd

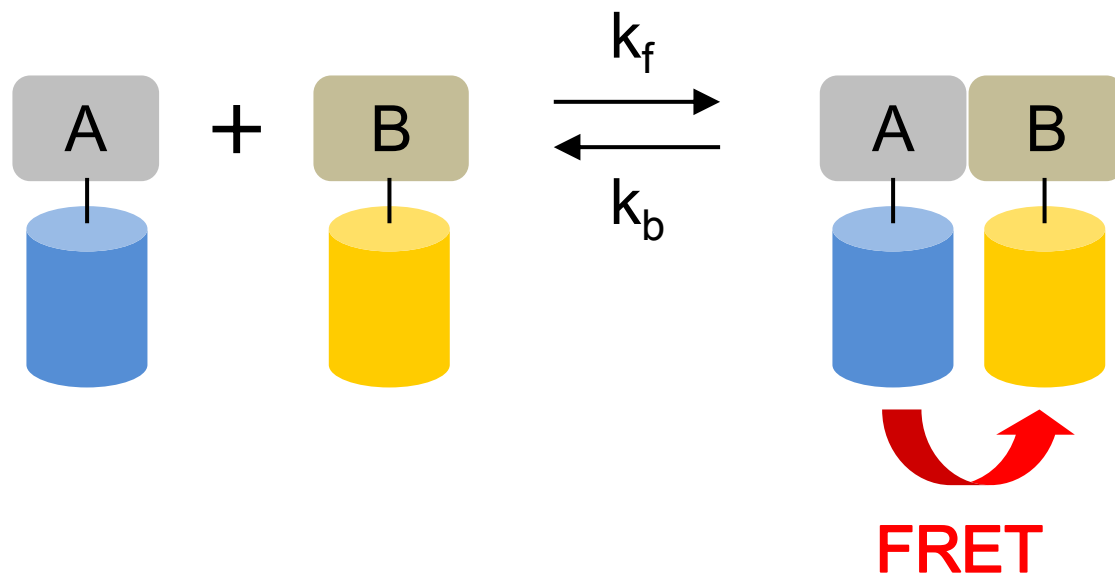


分子混雑



In vivo Kd < In vitro Kd

# 蛍光共鳴エネルギー移動FRET

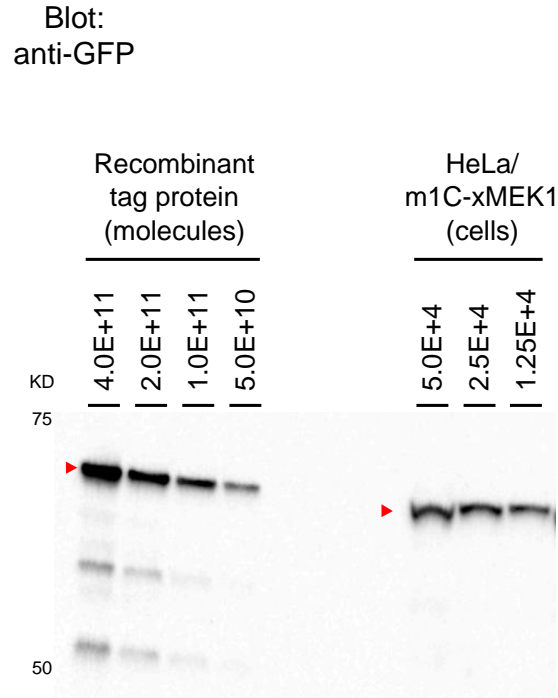
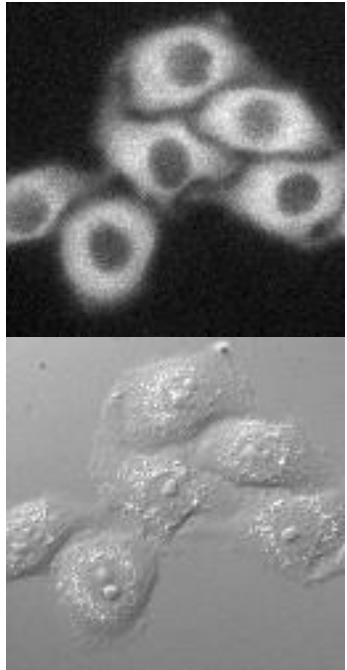


1. 細胞内のCFP, YFP融合タンパク質の数
2. FRETの補正 (Cross-excitation, Bleed-through, FRET効率、Quantum efficiency)

# 蛍光タンパク発現細胞クローンを取る

## HeLa/CFP-MEK1

1. 蛍光タンパク質遺伝子をゲノムに導入(レトロ/レンチウイルス、トランスポゾン、線形DNAなど)
2. シングルセルクローニング(限界希釈法)
3. 取れてきたクローンに対して、蛍光タンパク質の発現量を定量する
4. イメージング条件を固定して蛍光タンパク数/蛍光強度質を算出する

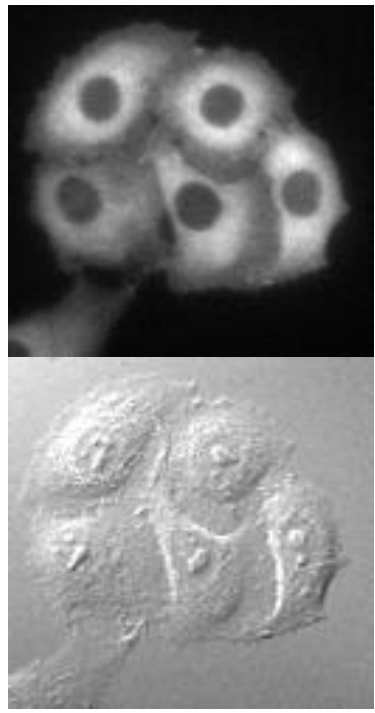


→ 9.2 x 10<sup>6</sup> CFP / cell

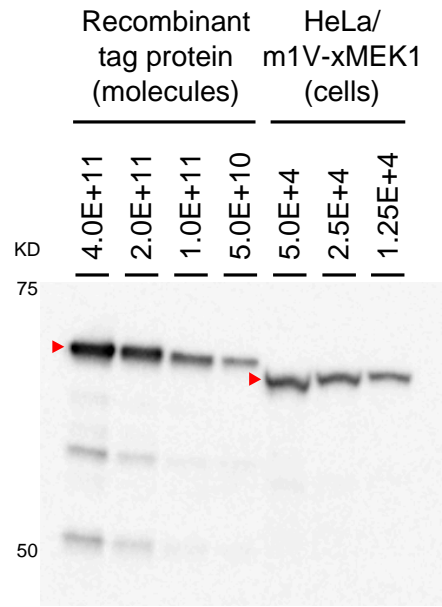
# 蛍光タンパク発現細胞クローンを取る

## HeLa/mVenus-MEK1

1. 蛍光タンパク質遺伝子をゲノムに導入(レトロ/レンチウイルス、トランスポゾン、線形DNAなど)
2. シングルセルクローニング(限界希釈法)
3. 取れてきたクローンに対して、蛍光タンパク質の発現量を定量する
4. イメージング条件を固定して蛍光タンパク数/蛍光強度質を算出する



Blot:  
anti-GFP



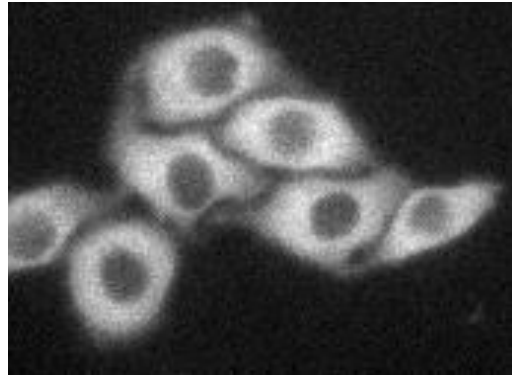
→ 6.2 x 10<sup>6</sup> YFP / cell

# キャリブレーション用ビーズ

Microscopy: IX-71

x60, ND 0, bin 8, Glass Dichro, c-c 100 ms

HeLa/  
mVenus-MEK1



$$9.2 \times 10^6 \text{ [CFP / cell]}$$

/

$$7.2 \times 10^4 \text{ [intensity / cell]}$$

||

$$\rightarrow 130 \text{ [CFP / intensity]}$$

CFP beads  
( $\phi = 100 \text{ nm}$ )



$$5.4 \times 10^2 \text{ [intensity / bead]}$$

x

$$130 \text{ [CFP / intensity]}$$

||

$$\rightarrow 6.9 \times 10^4 \text{ [CFP / bead]}$$

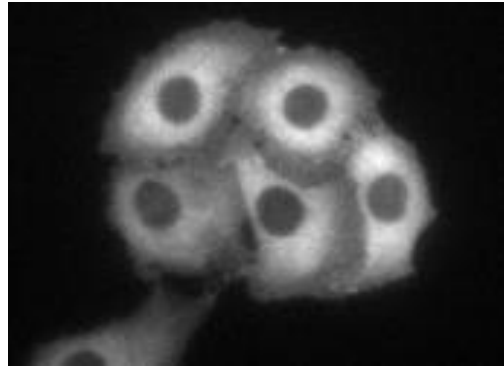
一度キャリブレーションしてしまえば、実験後にビーズを加えて蛍光強度を測定すれば細胞内の蛍光タンパク質分子数が分かる

# キャリブレーション用ビーズ

Microscopy: IX-71

x60, ND 0, bin 8, Glass Dichro, y-y 100 ms

HeLa/  
mCFP-MEK1



$$6.2 \times 10^6 \text{ [YFP / cell]}$$

/

$$2.8 \times 10^5 \text{ [intensity / cell]}$$

||

$$\rightarrow 22 \text{ [YFP / intensity]}$$

YFP beads  
( $\phi = 5 \mu\text{m}$ )



$$1.8 \times 10^4 \text{ [intensity / bead]}$$

x

$$22 \text{ [YFP / intensity]}$$

||

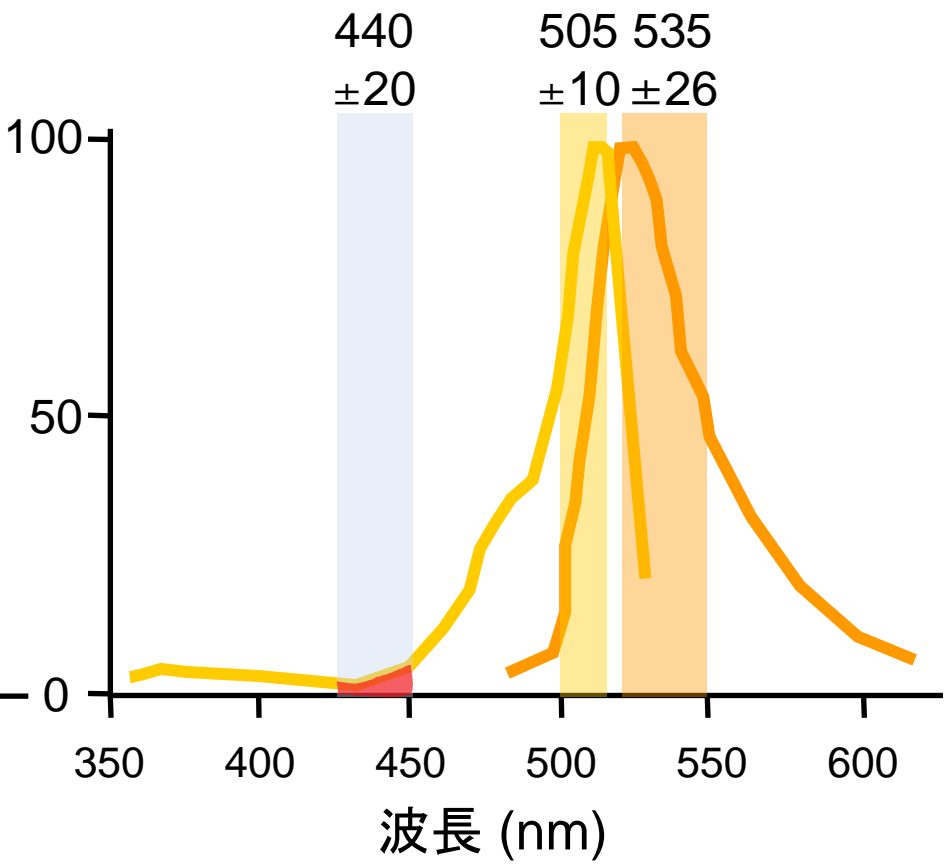
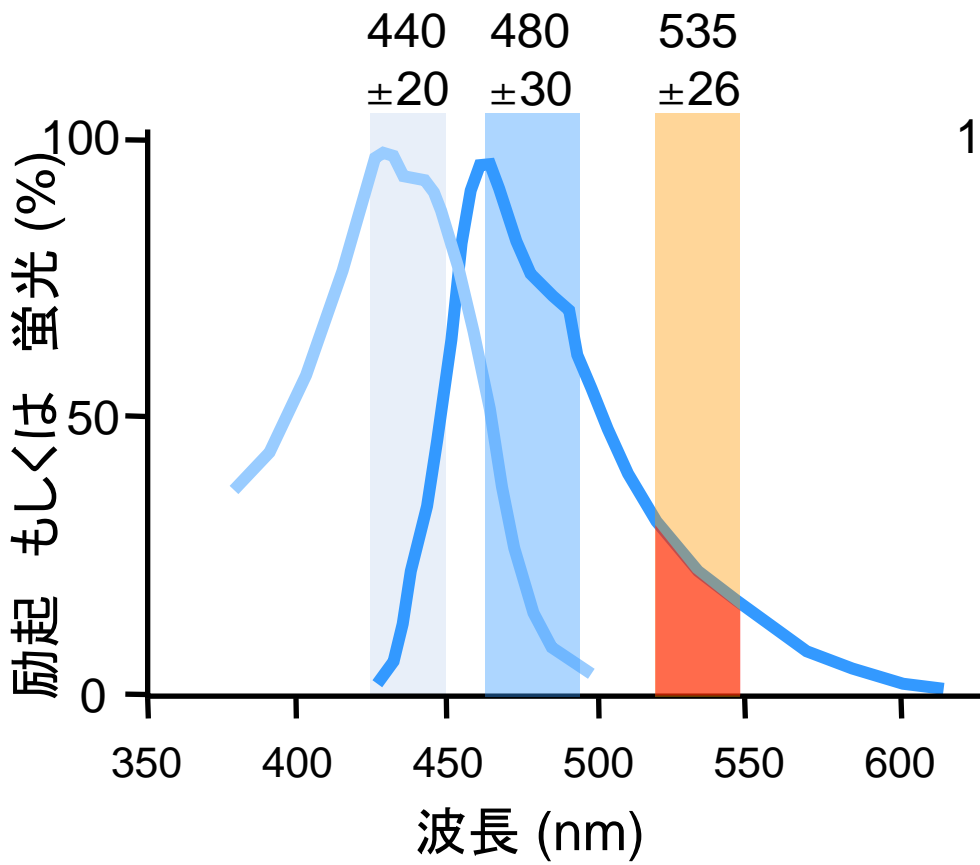
$$\rightarrow 3.9 \times 10^4 \text{ [YFP / bead]}$$

一度キャリブレーションしてしまえば、実験後にビーズを加えて蛍光強度を測定すれば細胞内の蛍光タンパク質分子数が分かる

# 分子間FRETに必要な補正

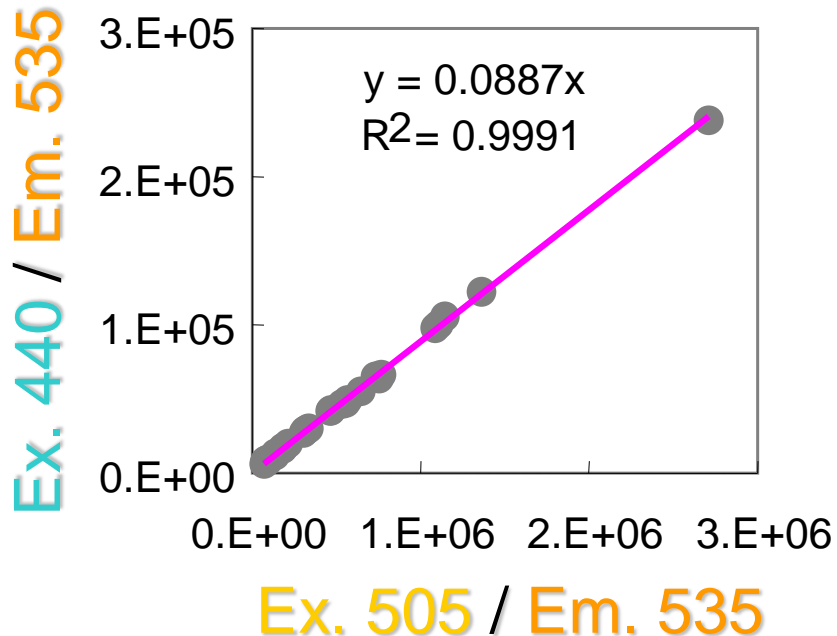
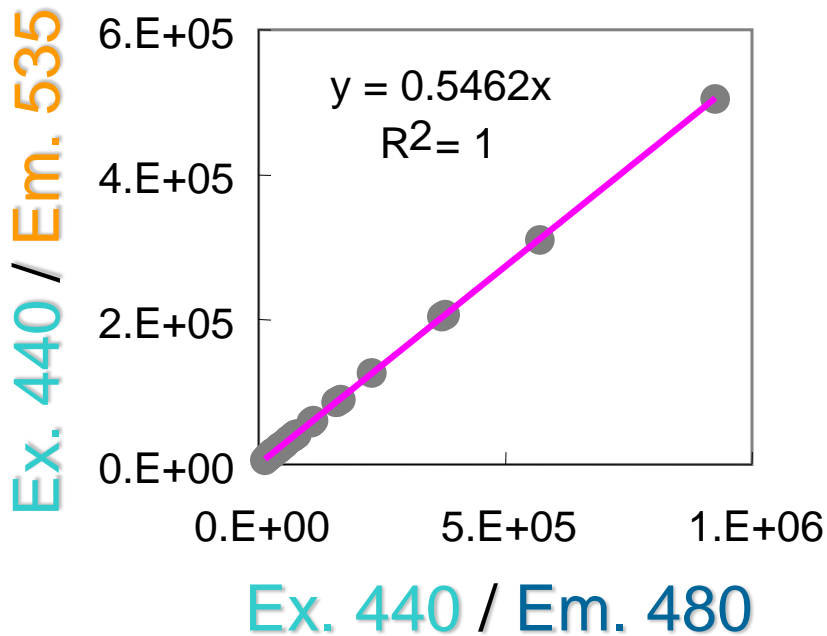
CFP の Bleed Through

YFP の Cross Excitation





# Bleed Through, Cross Excitationの補正



CFP の 54.6%の蛍光が FRETチャンネルにもれる

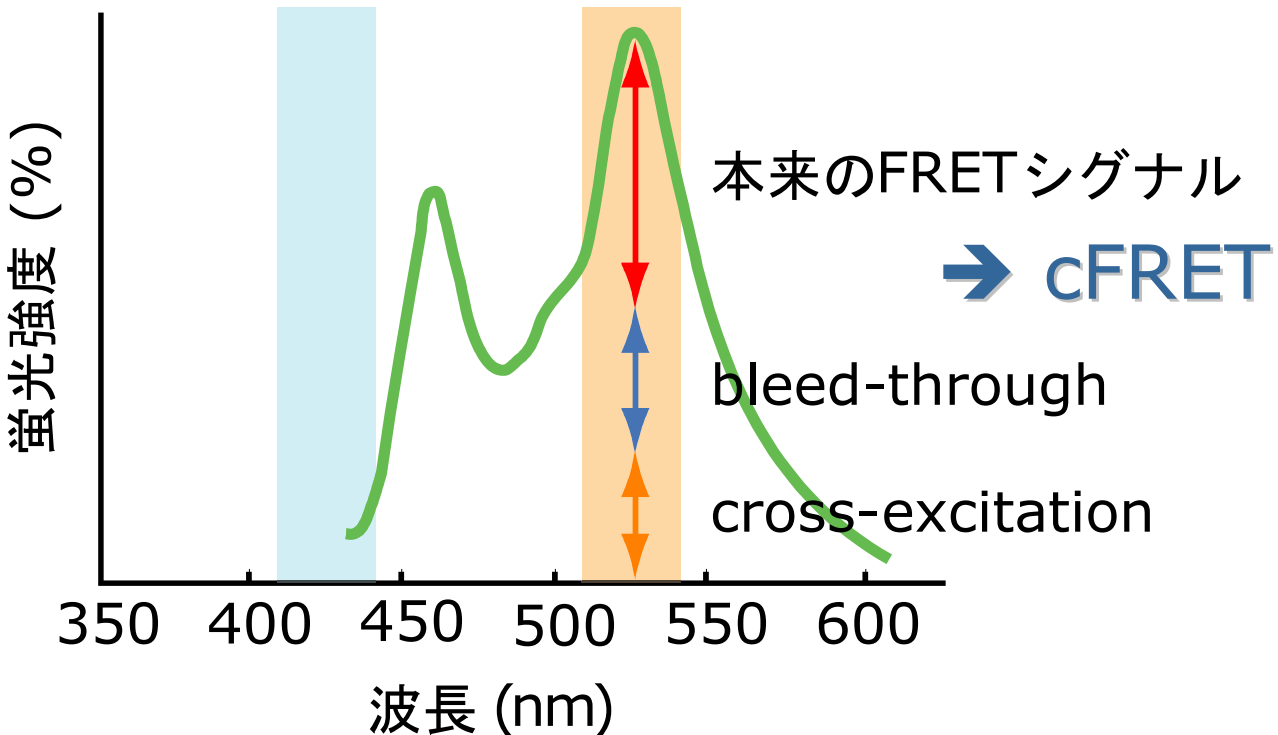
YFP の 8.9%の蛍光が FRETチャンネルにもれる

注意：顕微鏡セットによって値が異なる！

# Corrected FRET (cFRET) の計算

$$cFRET = FRET - (Bleed Through) - (Cross Excitation)$$

$$= FRET - 54.6 \times CFP - 8.9 \times YFP$$

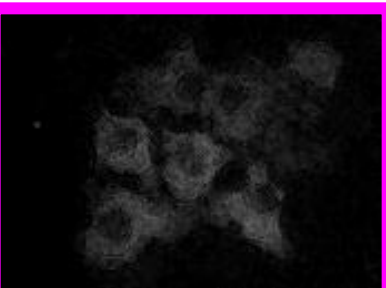
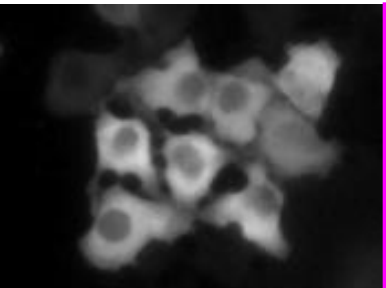
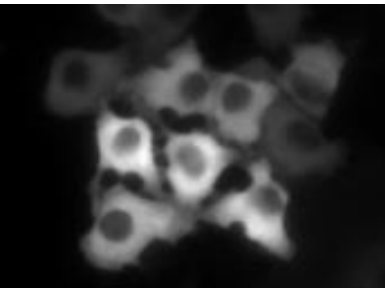
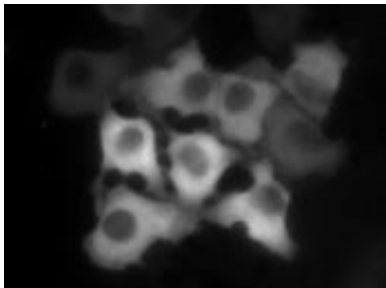


# 最適な蛍光タンパク質ペア

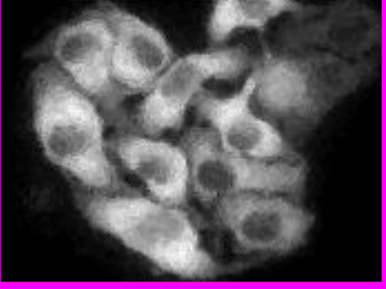
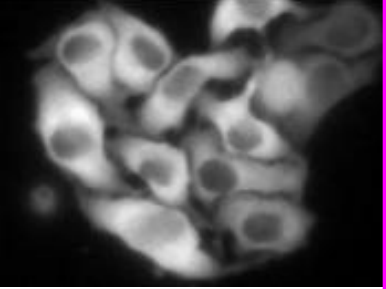
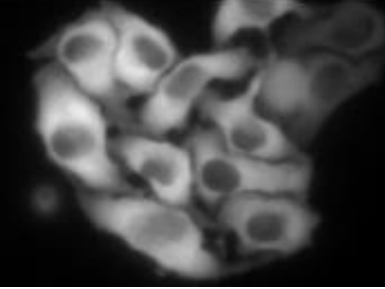
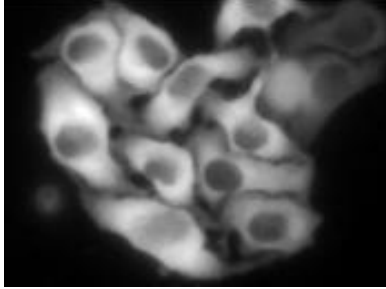
Epi;  
HeLa cell

C - Y		Y - Y		C - C	
FRET ch.	- 0.089*	YFP ch.	- 0.55*	CFP ch.	=
					cFRET

MEK1WT-m1v  
+ m1c-ERK2WT



m1v-MEKWT  
+ m1c-ERK2WT



~~MEK1-YFP  
CFP-ERK2~~

YFP-MEK1  
CFP-ERK2

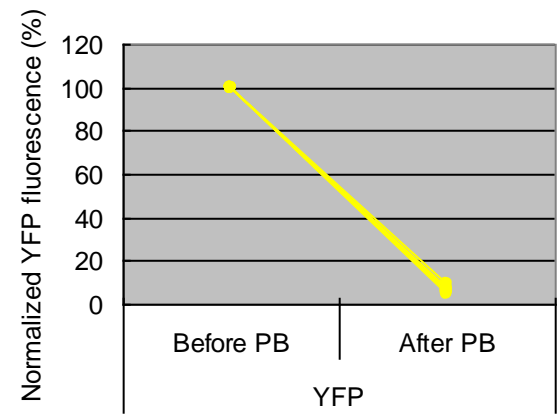
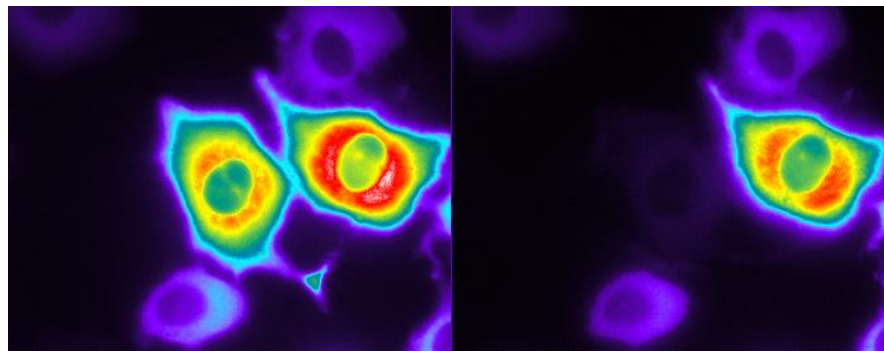
# 最大のFRET効率の算出

Epi;  
HeLa (Italy) cell

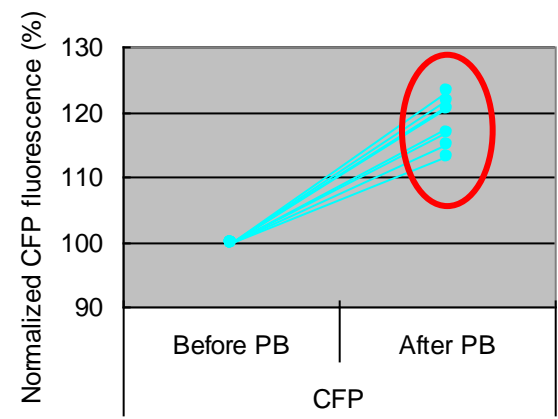
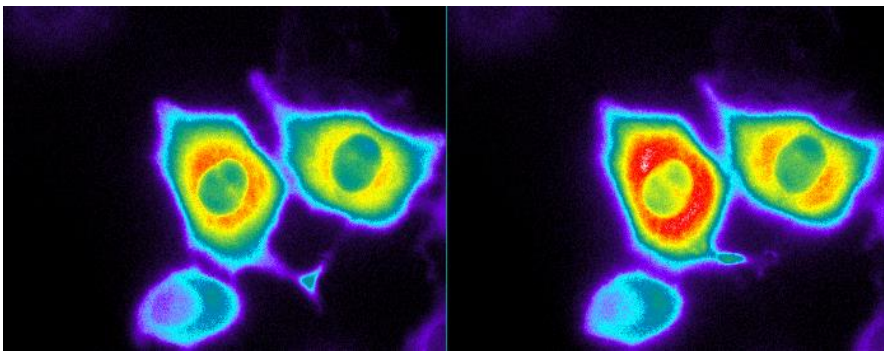
Before  
photo-bleach

After  
photo-bleach

YFP-MEK1  
(大過剰)



CFP-ERK2  
(発現量少)



FRET efficiency =  $15.6 \pm 2.6 \%$

# 実際の解析手順

1. 各細胞の  $[YFP-MEK1]_{total}$ ,  $[CFP-ERK2]_{total}$ ,  $[cFRET]$  を蛍光ビーズにより算出する。

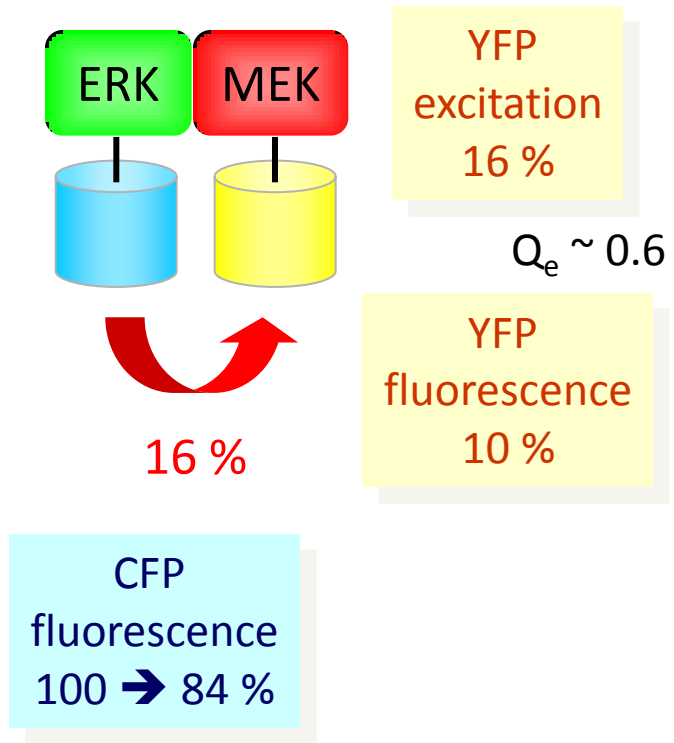
2.  $[MEK1-ERK2]$ を以下の計算式により算出

$$[MEK1-ERK2] = [cFRET] * \frac{1}{FRET_{effi.}} * \frac{1}{Q_e}$$

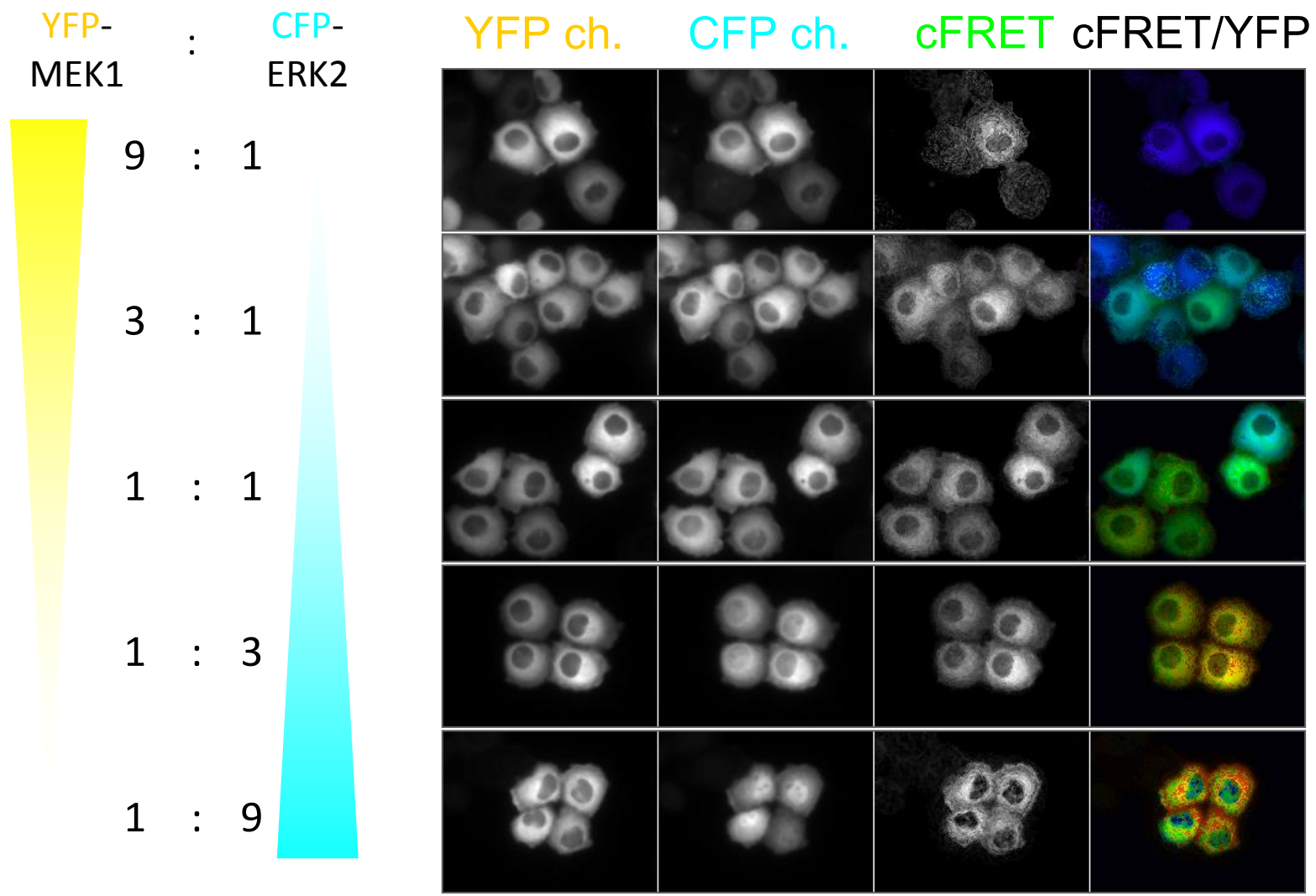
3.  $[ERK2]_{free}$ を以下の計算式により

$$[ERK2]_{free} = [ERK2]_{total} - [MEK1-ERK2]$$

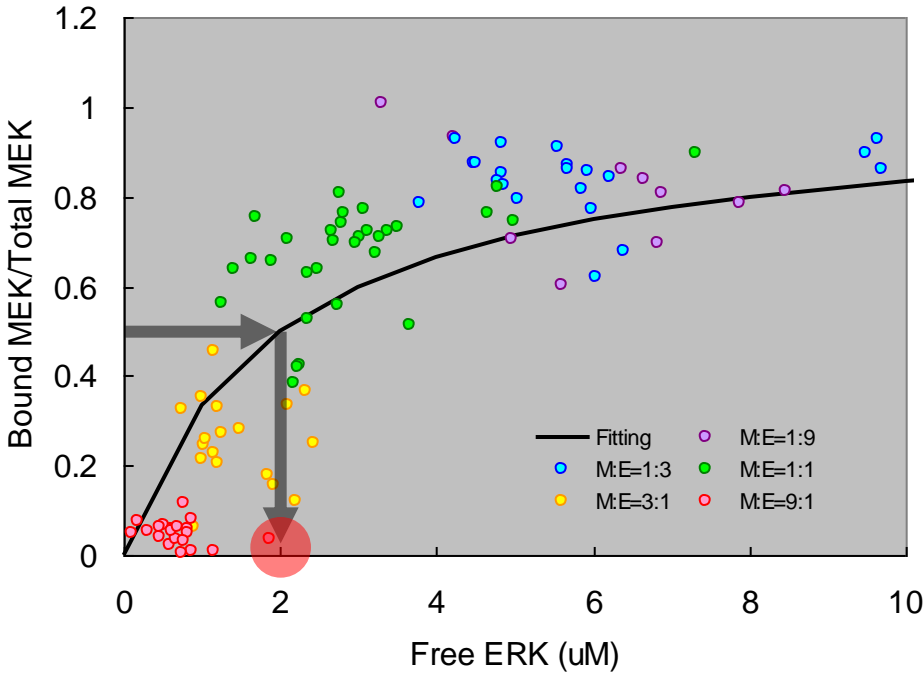
4. フィッティングによりKdを求める



# FRETによるMEK-ERK結合の可視化



# FittingによるKdの算出



$K_d = 2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$

# 蛍光相互相関分光法によるKd測定

分子間FRETでKdを測定できるが、かなりめんどくさい

→ 蛍光相関分光法 (FCS)、蛍光相互相関分光法 (FCCS)  
による細胞内Kd測定法の開発

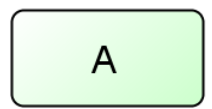


# 解離定数定量:コメント、将来展望

- In vitroはタンパク精製が面倒。In vivoは定量的に蛍光タンパク質を測定するのが面倒。  
→ FCS, FCCSで改善はされるが、網羅的にKdを測定するのは現時点では難しい。
- In vivoの場合は、細胞質での結合のみ測定可能  
→ 形質膜上の分子のKdなどの測定が今後の課題

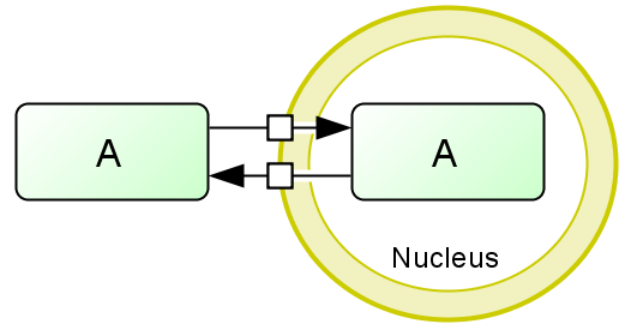
# 生化学的なパラメーター

タンパク質濃度



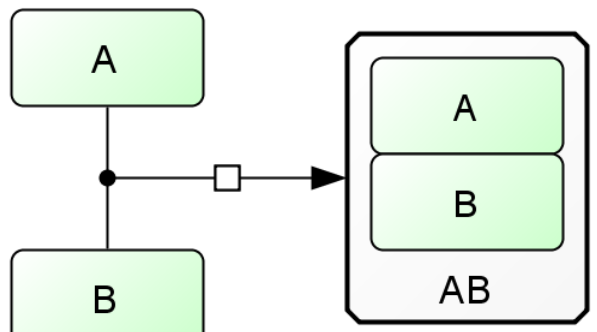
C [M]

拡散定数



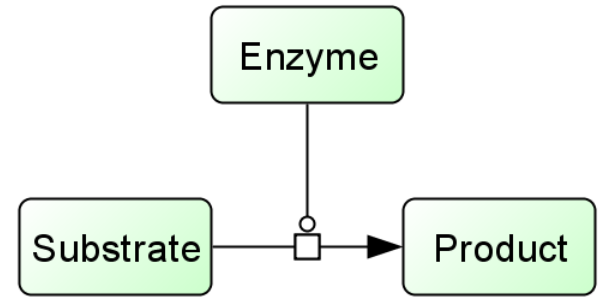
D [m<sup>2</sup>/sec]

解離定数(相互作用)



K<sub>d</sub> [M]

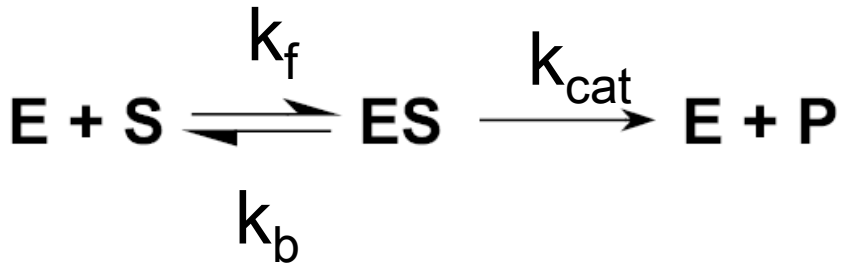
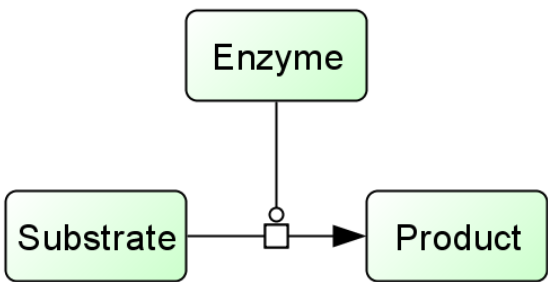
酵素反応速度定数



k<sub>cat</sub> [1/M/sec] K<sub>m</sub> [M]

# ミカエリス-メンテン

## 酵素反応速度定数

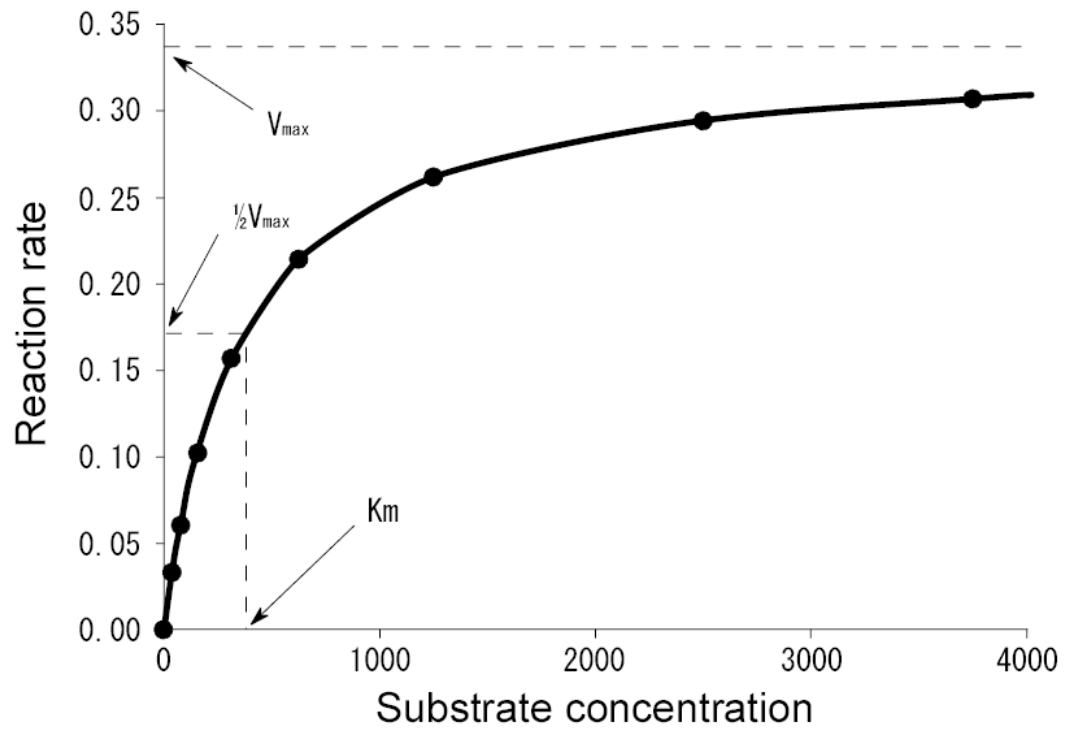


$k_{cat}$  [1/M/sec]     $K_m$  [M]

$$v = \frac{k_{cat} [E][S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{max} = k_{cat} [E]$$

$$K_m = \frac{k_b + k_{cat}}{k_f} \sim K_d$$



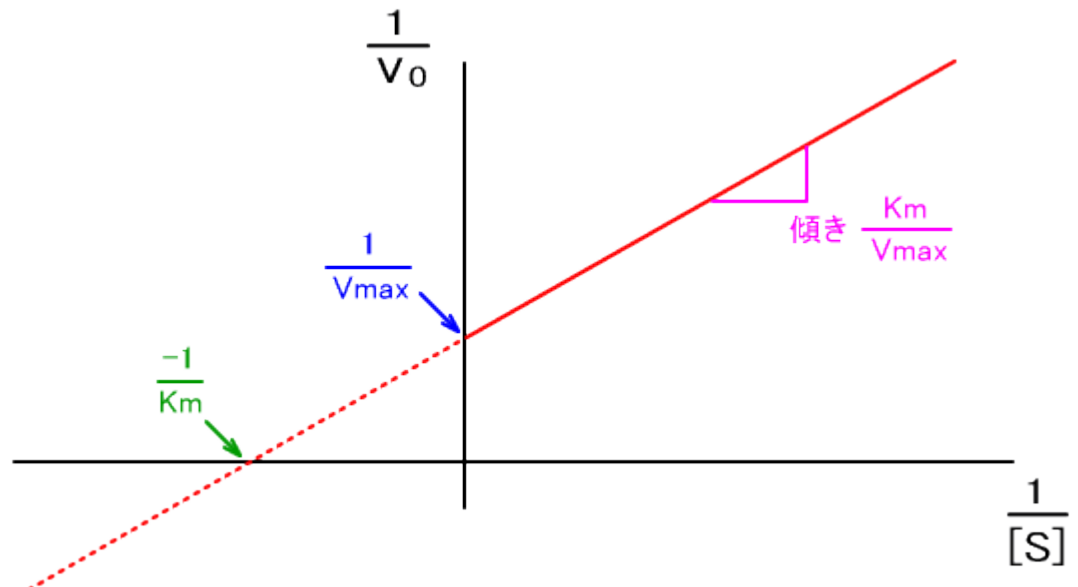
# どうやって測定するか

## In vitro

1. 酵素と基質タンパク質を精製する
2. 試験管内で反応させて、初速度を測定する
3. Lineweaver-Burke plotにより $K_m$ と $V_{max}$ を求める

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

ミカエリスメンテン式を  
線形化している



# が、しかし



## Instructions for Authors

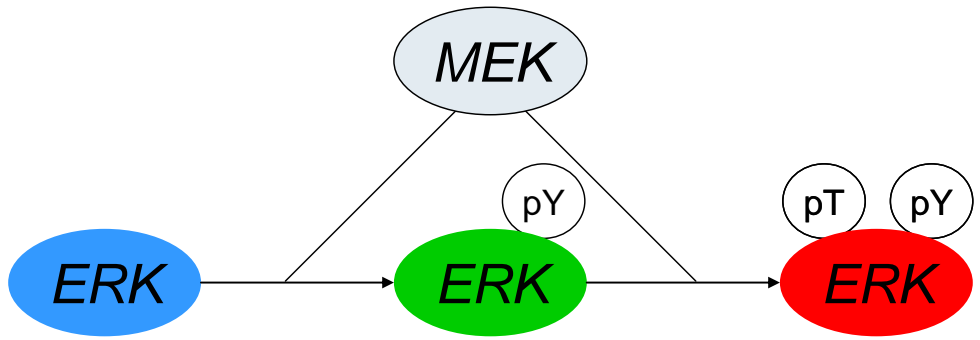
Enzyme activity (steady-state) generally should be reported in terms of  $V_{\max}$  (nmol or  $\mu\text{mol}$  product formed per amount ((enzyme)) per time) or, when possible, as  $k_{\text{cat}}$  ( $V_{\max}$  divided by molar enzyme concentration), in  $\text{min}^{-1}$  or  $\text{s}^{-1}$ .  $K_m$  units are given in molarity.

Any other units of activity (absorbance, % change) should be converted to units of molarity to express  $k_{\text{cat}}$  or  $V_{\max}$ . Values of  $k_{\text{cat}}$  ( $V_{\max}$ ) and  $K_m$  should be estimated using nonlinear fitting (and the software system cited).

Parameters should include estimates of error (*e.g.*, SE). The use of linear transformation for Michaelis-Menten parameters is recognized to be inaccurate and use of an alternate method should be justified (*e.g.*, graphical presentation of inhibition).

非線形フィッティングで求めないといけない？

# 実例: MEKによるERKリン酸化速度



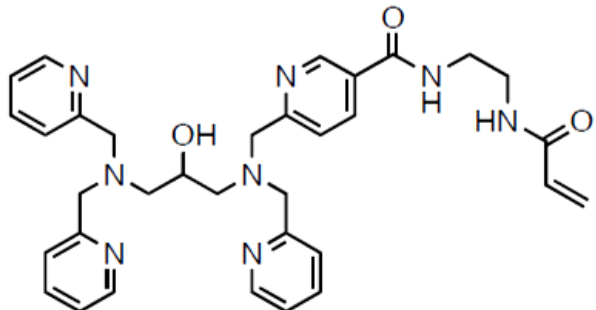
<u>Enzyme</u>	ATP
MEK1	Mg <sup>2+</sup>
<u>Substrate</u>	NaCl,
ERK2	Tris Buffer,
	etc.,,

Incubate  
→  
室温

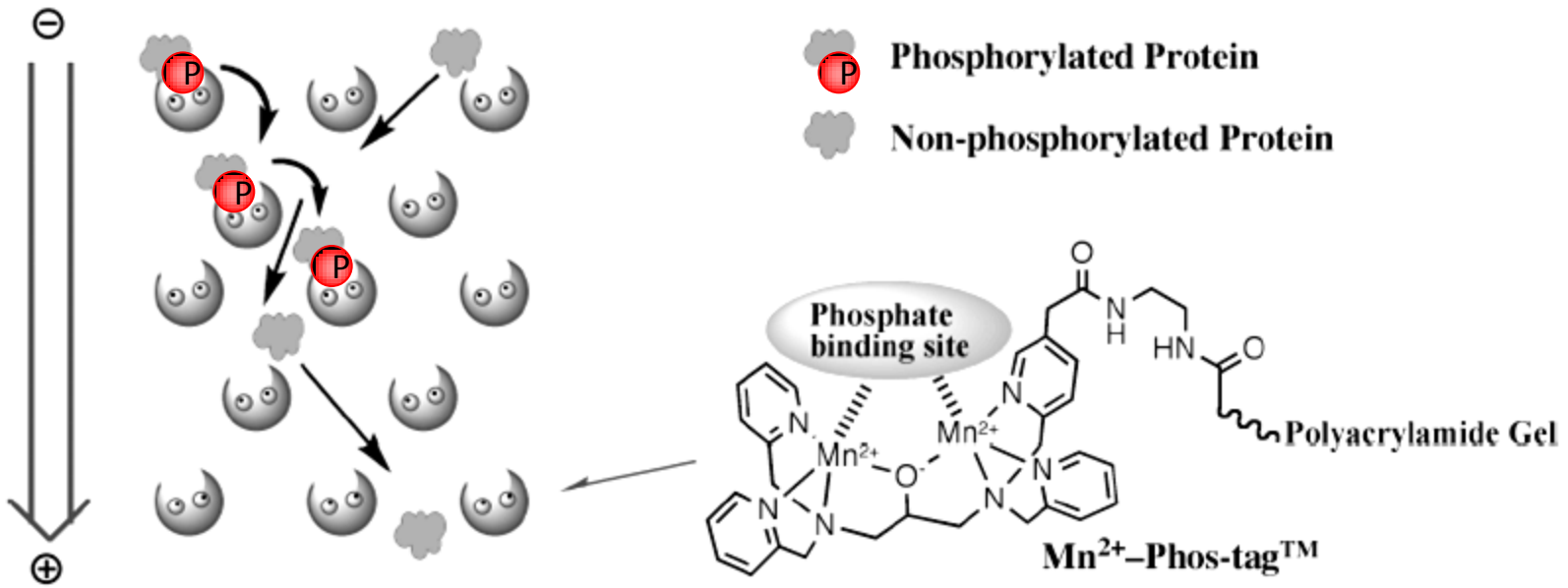
Stop kinase reaction by adding 2 x sample buffer



# リン酸化アイソフォームの分離



**Phos-tag™ AAL-107**  
Mol. Wt.: 595



# MEKによるin vitro ERKリン酸化

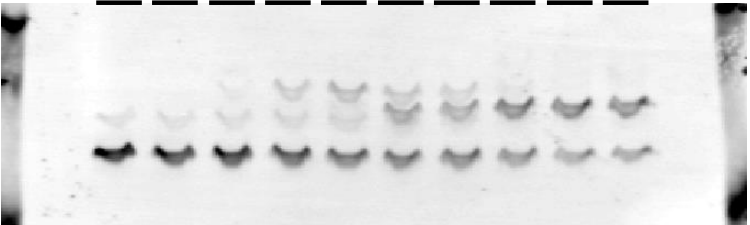
In vitro kinase reaction

GST-xERK2 K57R + 12His-Flag-xMEK1-SDSE

0 5 sec 10 sec 30 sec 1 min 3 min 5 min 10 min 30 min 60 min

KD  
120  
93  
47

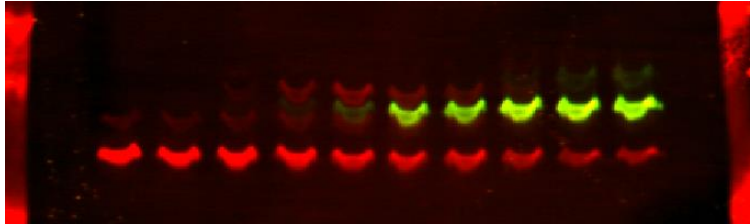
Blot:  
anti-ERK1/2



anti-pTpY-ERK1/2



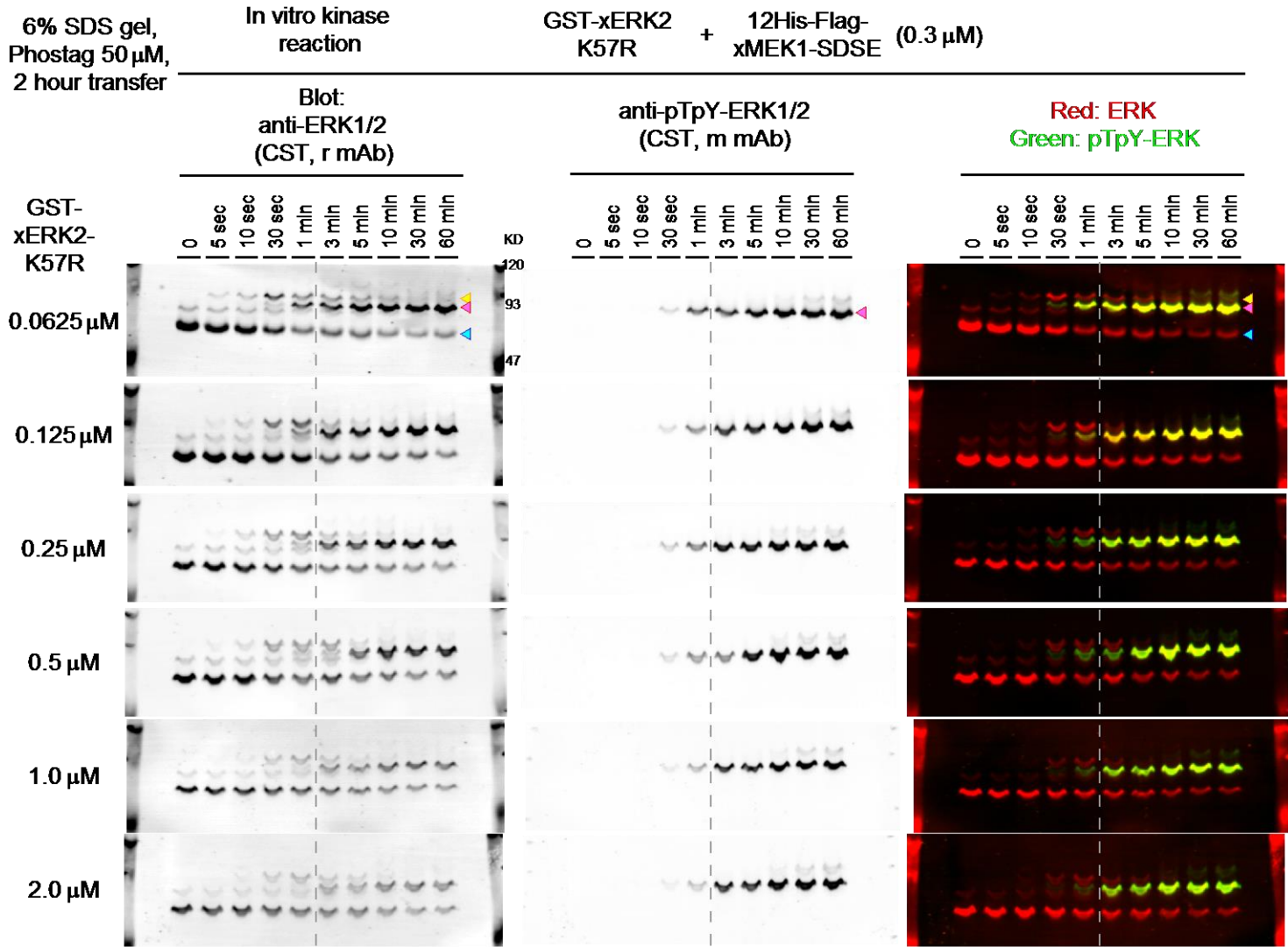
Red: ERK  
Green: pTpY-ERK



何割リン酸化が入ったか定量的に分かる

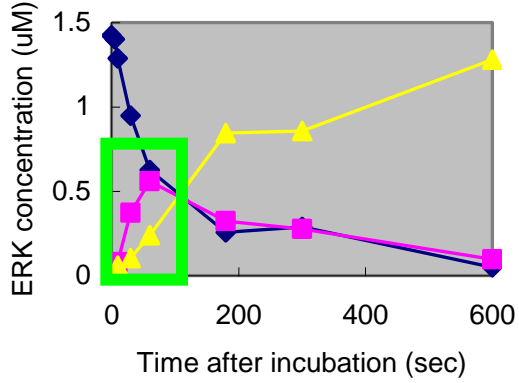


# MEKによるin vitro ERKリン酸化

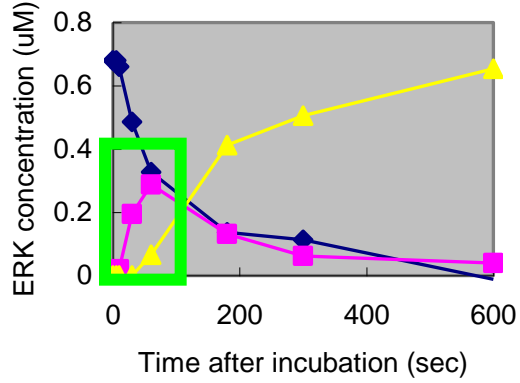


# MEKによるERKリン酸化の初速度

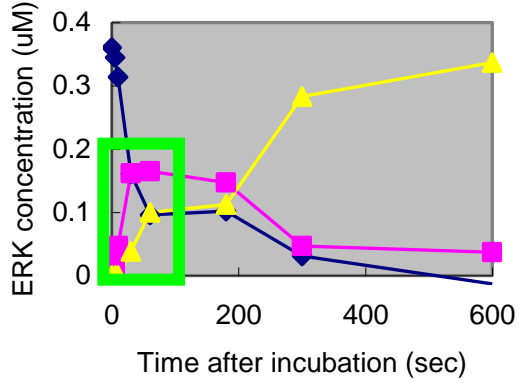
2uM



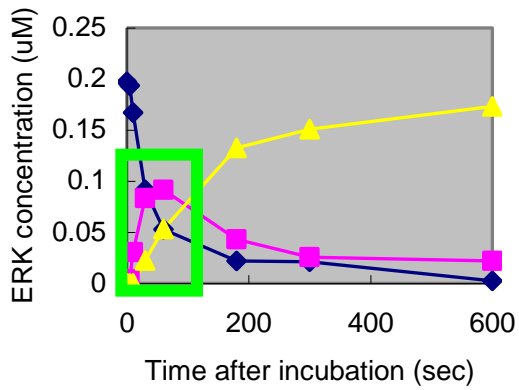
1uM



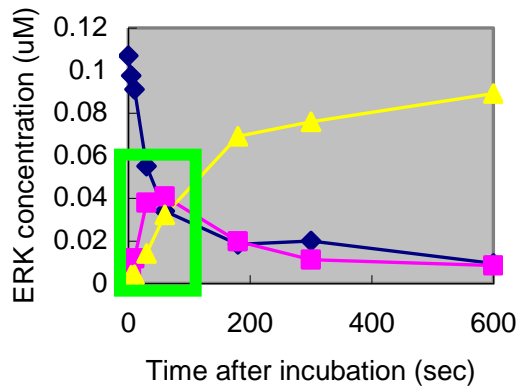
0.5uM



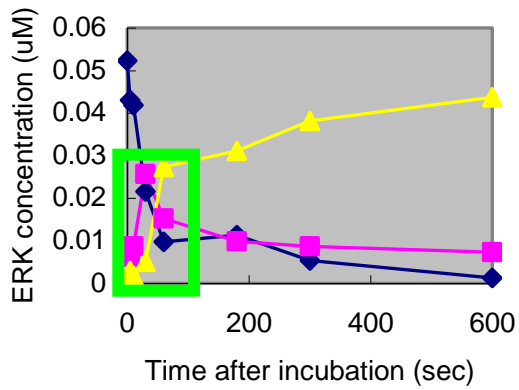
0.25uM



0.125uM



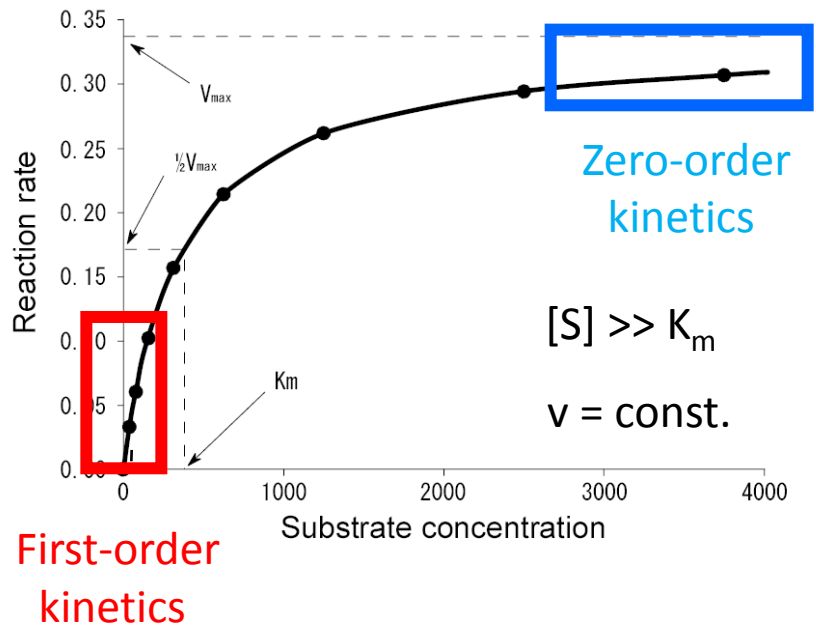
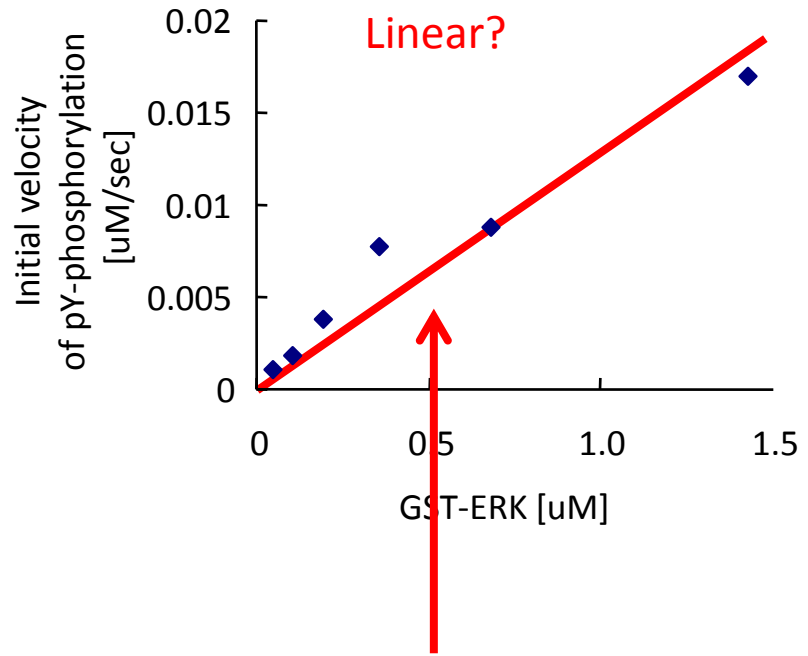
0.0625uM



# MEKによるERKリン酸化の初速度

ERKチロシンリン酸化の初速度

v / [S] カーブ



この場合、Fittingでは、信頼できる $K_m$ を求めることができない

# 数式的な解釈

## Michaelis-Menten式

$$v = \frac{k_{cat} [E][S]}{K_m + [S]}$$

$[S] \ll K_m$

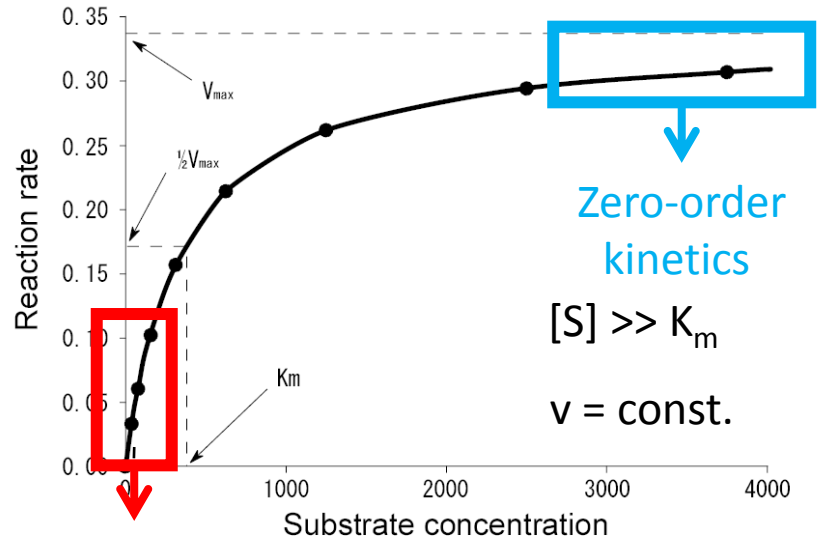
$$v \sim \frac{k_{cat}}{K_m} [E][S]$$

→ First-order kinetics

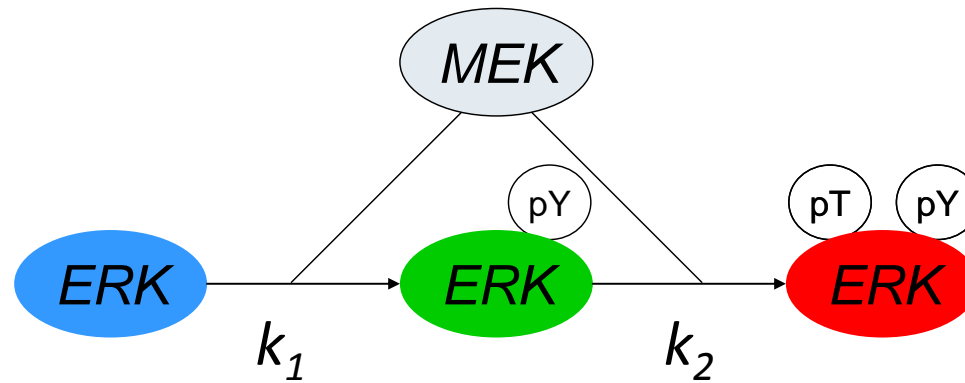
$[S] \gg K_m$

$$v \sim k_{cat} [E]$$

→ Zero-order kinetics



# 線形化した逐次反応式



$$\frac{d[ERK]}{dt} = -k_1 * [ERK]$$

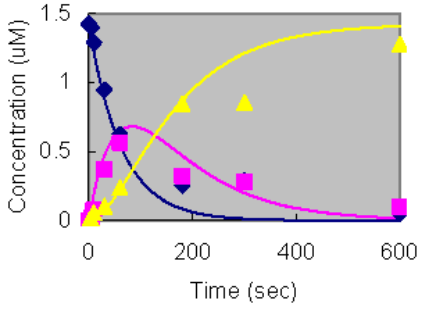
$$\frac{d[pY-ERK]}{dt} = k_1 * [ERK] - k_2 * [pY-ERK]$$

$$\frac{d[pTpY-ERK]}{dt} = k_2 * [pY-ERK]$$

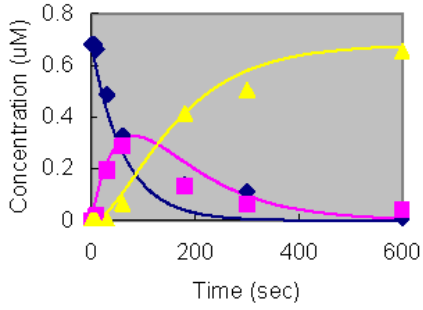
→ ちなみにこの場合は解析解が得られる

# グローバルフィッティング

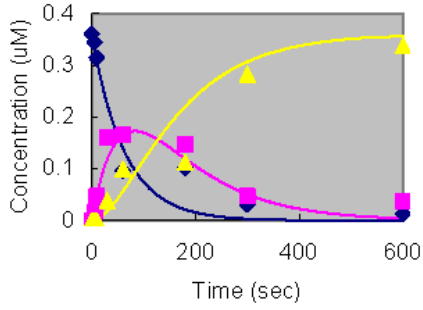
2uM



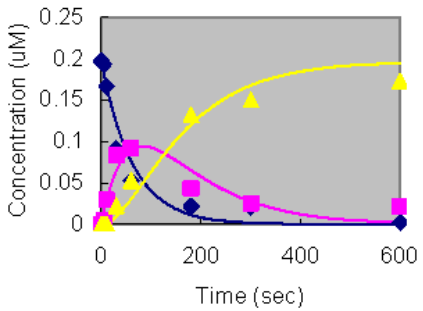
1uM



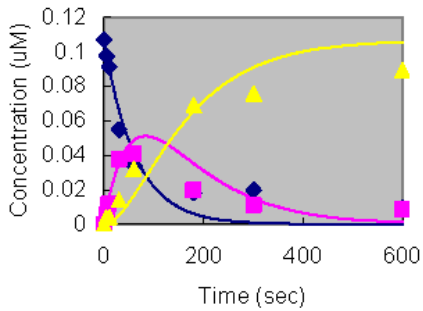
0.5uM



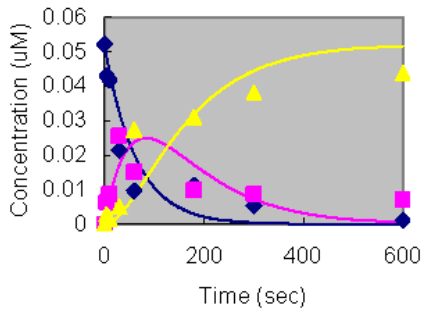
0.25uM



0.125uM



0.0625uM



## Experiments

- ERK
- pY-ERK
- ▲ pTpY-ERK

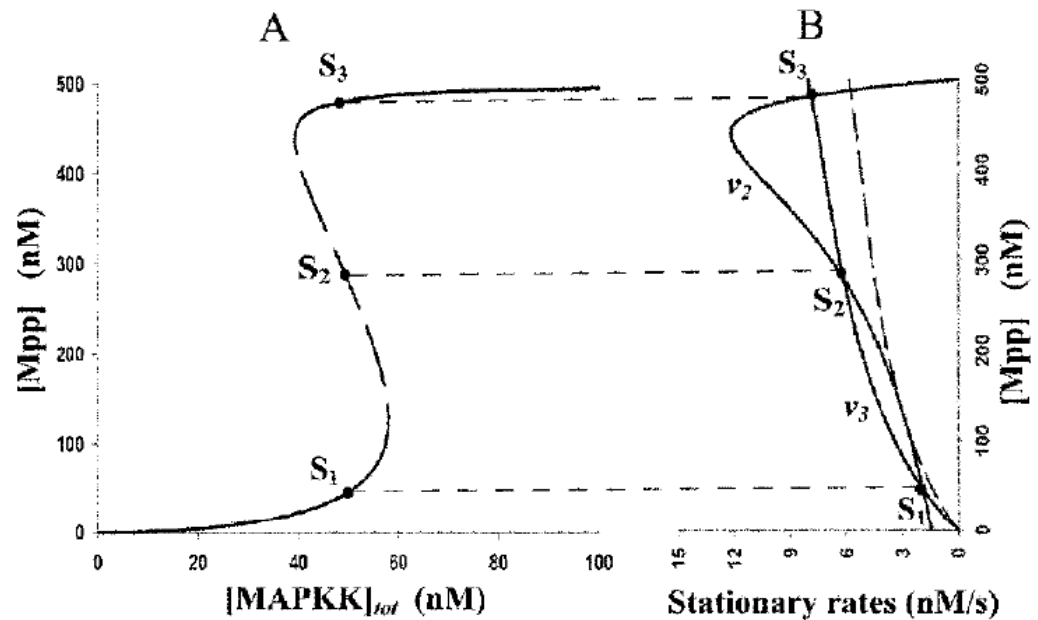
## Fitting

- ERK
- pY-ERK
- pTpY-ERK

$$k_1 = 0.016 \text{ [/sec]}$$

$$k_2 = 0.0088 \text{ [/sec]}$$

# 余談：定量してわかること



我々の結果

$$\frac{k_{cat\_1}}{K_{m\_1}} > \frac{k_{cat\_2}}{K_{m\_2}}$$

Kholodenko らの結果

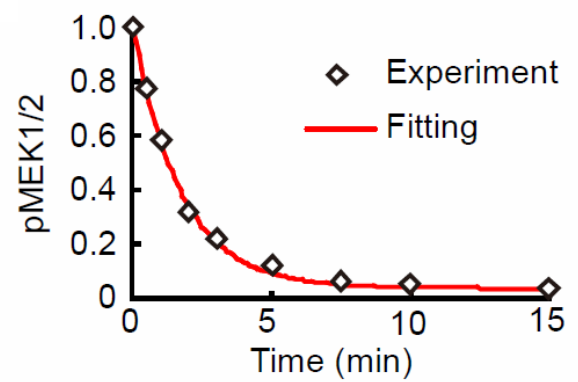
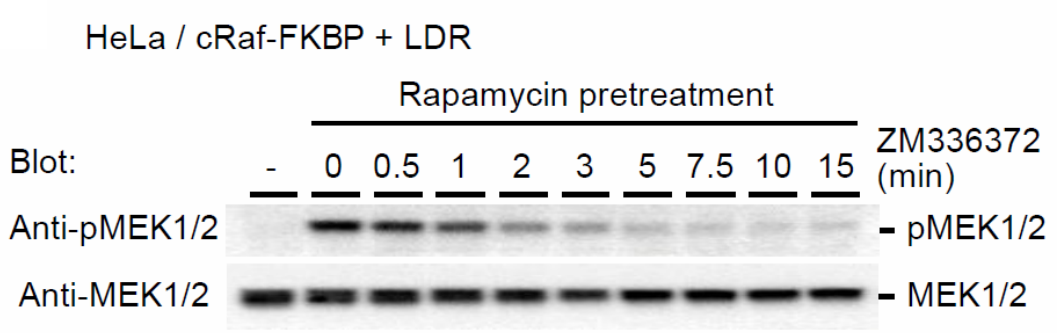
$$\frac{k_{cat\_1}}{K_{m\_1}} \ll \frac{k_{cat\_2}}{K_{m\_2}}$$

Figure 3. **Hysteresis and bistability in a dual phosphorylation cycle.** Three steady states, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, and S<sub>3</sub> (panel A), correspond (panel B) to the three intersection points of the dependencies of stationary rates of Mpp production v<sub>2</sub> and consumption v<sub>3</sub> on [Mpp]. The parameter values are as follows: K<sub>m1</sub> = 50, K<sub>m2</sub> = 500, K<sub>m3</sub> = 22, K<sub>m4</sub> = 18 (values in nM); k<sub>1</sub><sup>cat</sup> = 0.01, k<sub>2</sub><sup>cat</sup> = 15, k<sub>3</sub><sup>cat</sup> = 0.084, k<sub>4</sub><sup>cat</sup> = 0.06 (s<sup>-1</sup>); M<sub>tot</sub> = 500, [MKP3]<sub>tot</sub> = 100 (nM). (B) [MAPKK]<sub>tot</sub> = 50 nM. k<sub>3</sub><sup>cat</sup> = 0.061 s<sup>-1</sup>, dashed line.

Nick I. Markevich, Jan B. Hoek, and Boris N. Kholodenko.  
 J. Cell Biol. 2004, 164, (3), 353

# In vivoでは？

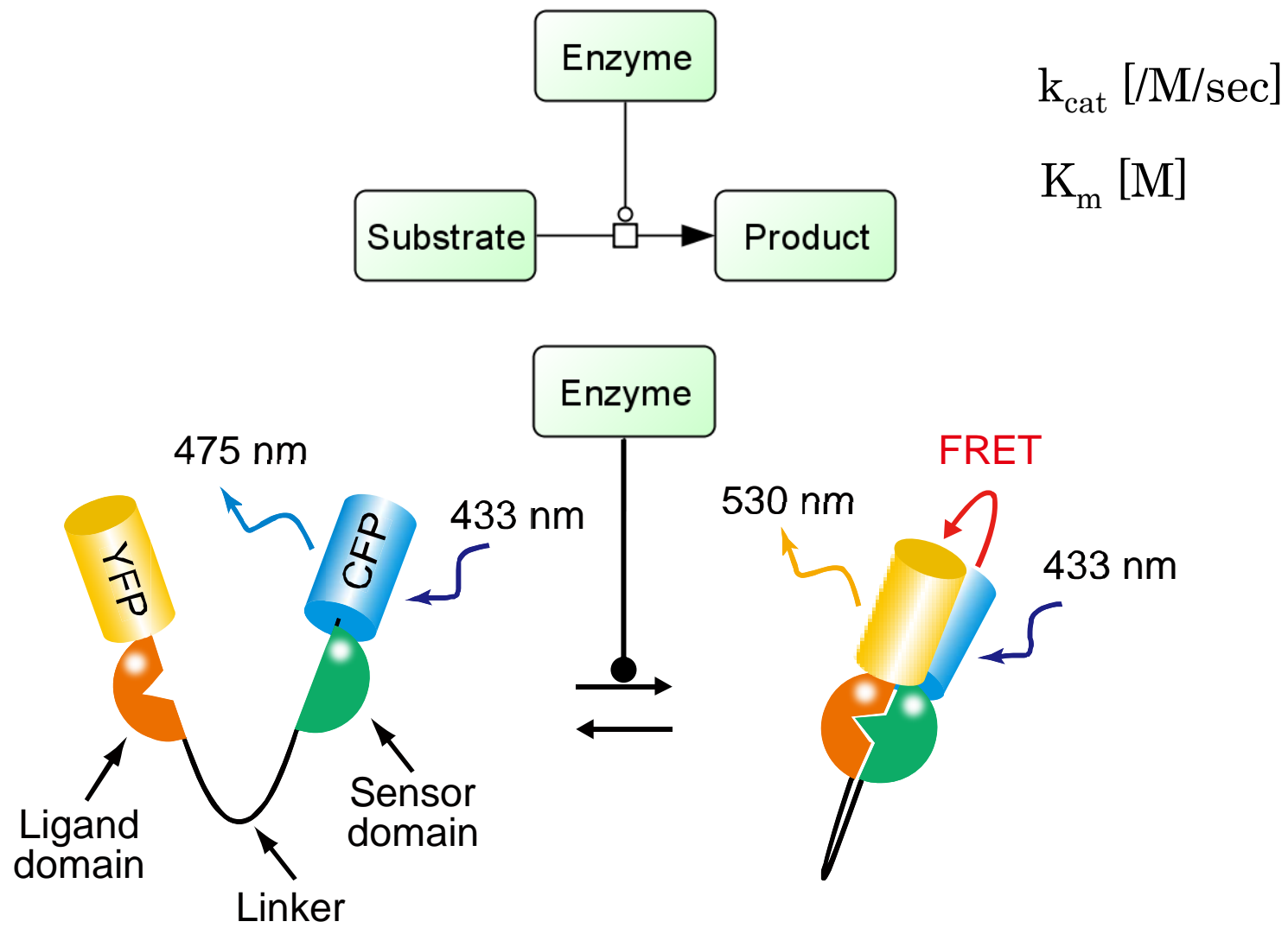
## リン酸化されているMEKの脱リン酸化速度



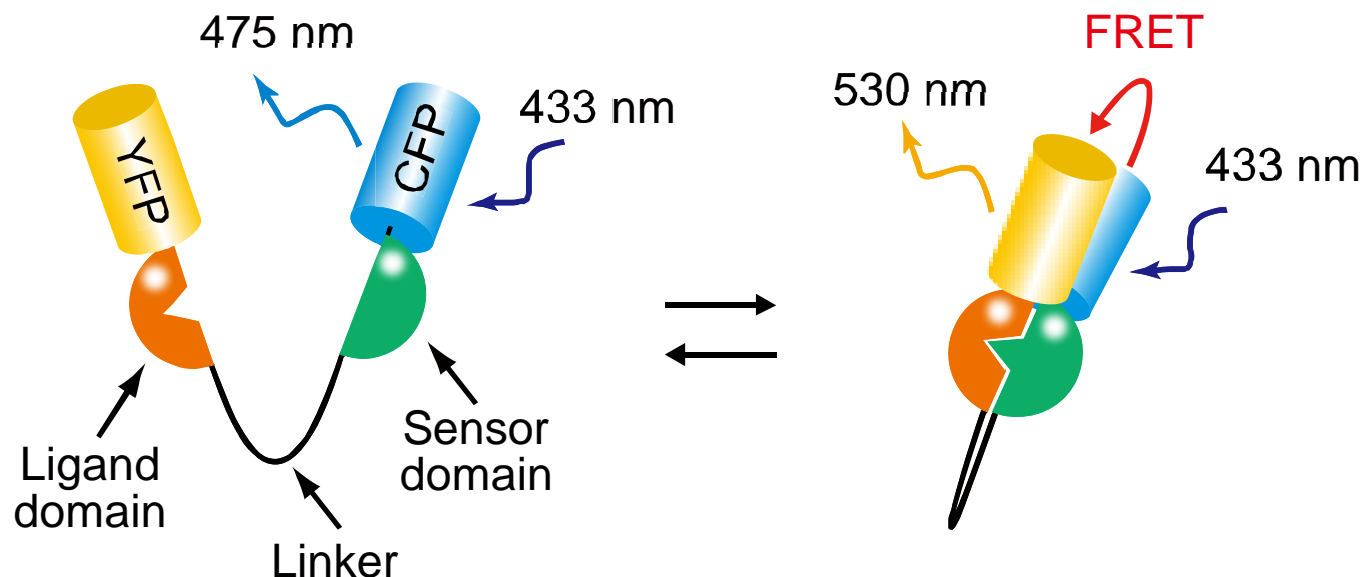
仮定1 : in vivoでは $K_m$ がSより十分大きい  
 仮定2 : 脱リン酸化酵素活性が一定



# より簡便に:FRETでできないか



# 1分子型FRETバイオセンサー



## 1分子型(分子内)FRETバイオセンサーのメリット

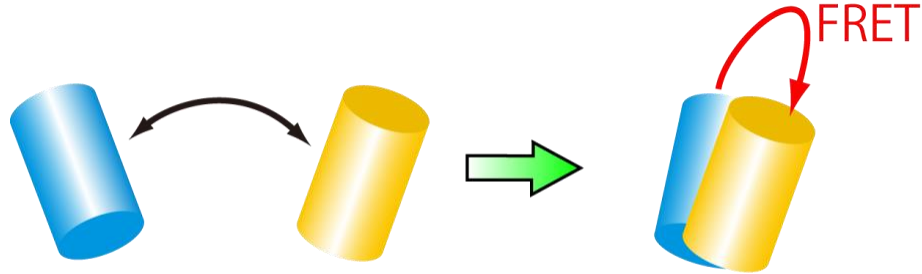
- 高感度、画像補正が必要ない、遺伝子導入が簡便

## 1分子型FRETバイオセンサーのデメリット

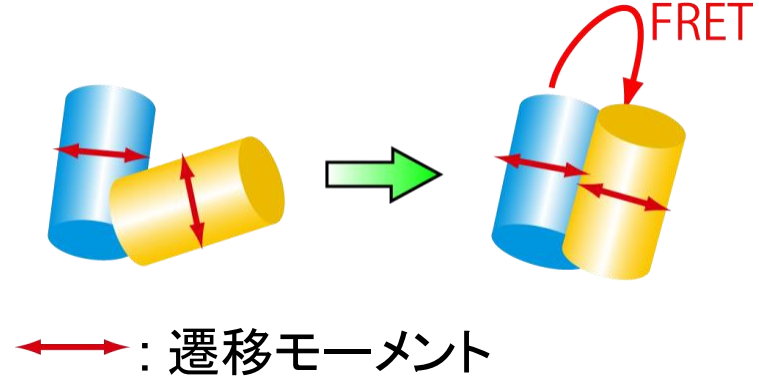
- 開発、最適化がトライアンドエラー

# FRETに寄与する因子：距離と角度

## 1. ドナーとアクセプター間の距離



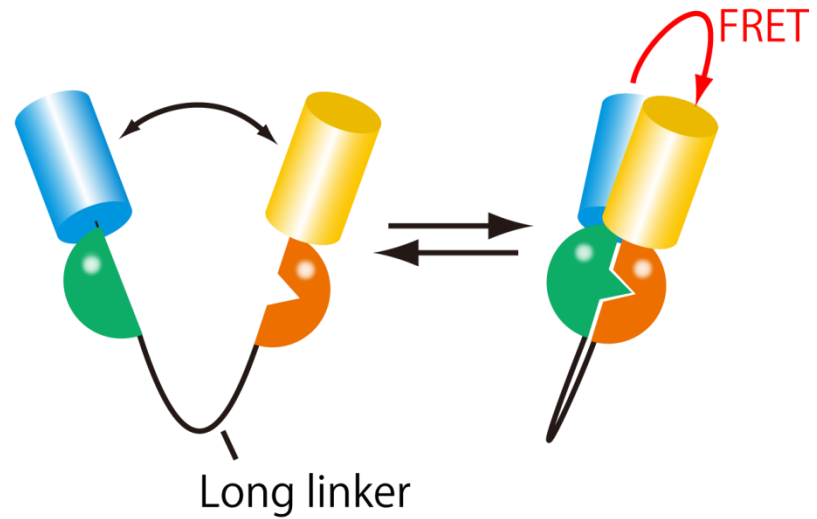
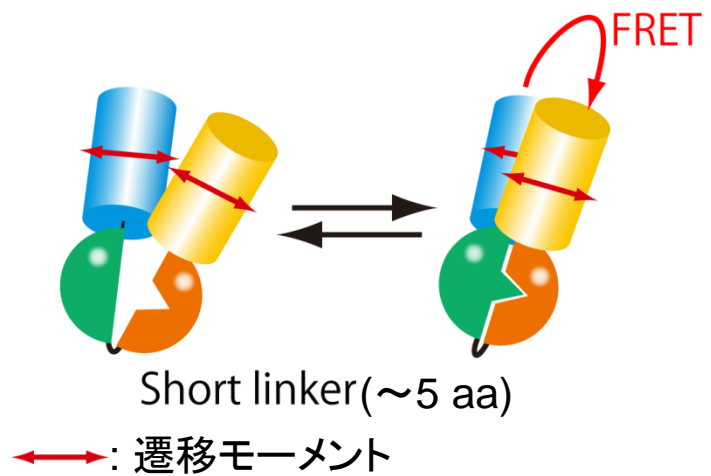
## 2. ドナーとアクセプターの角度



# 距離依存型バイオセンサーの開発

旧バージョンの  
FRETバイオセンサー

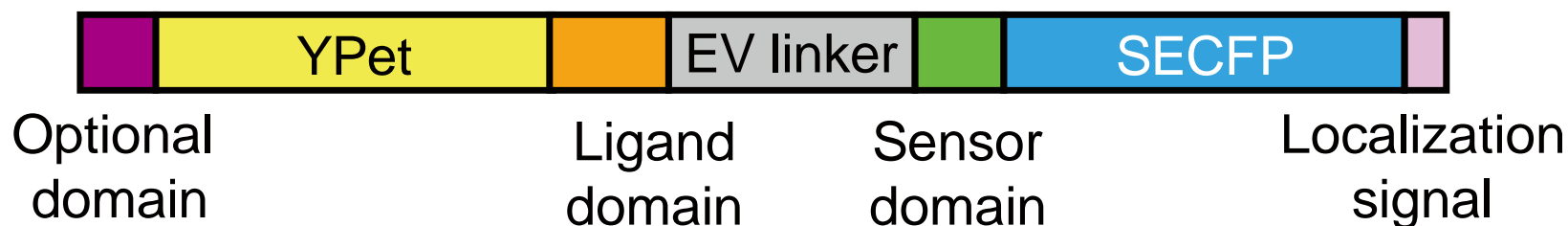
新バージョンの  
FRETバイオセンサー



戦略: 完全「距離依存」型の一分子型FRETバイオ  
センサーの作製とその最適化

# FRETバイオセンサーの合理的骨格

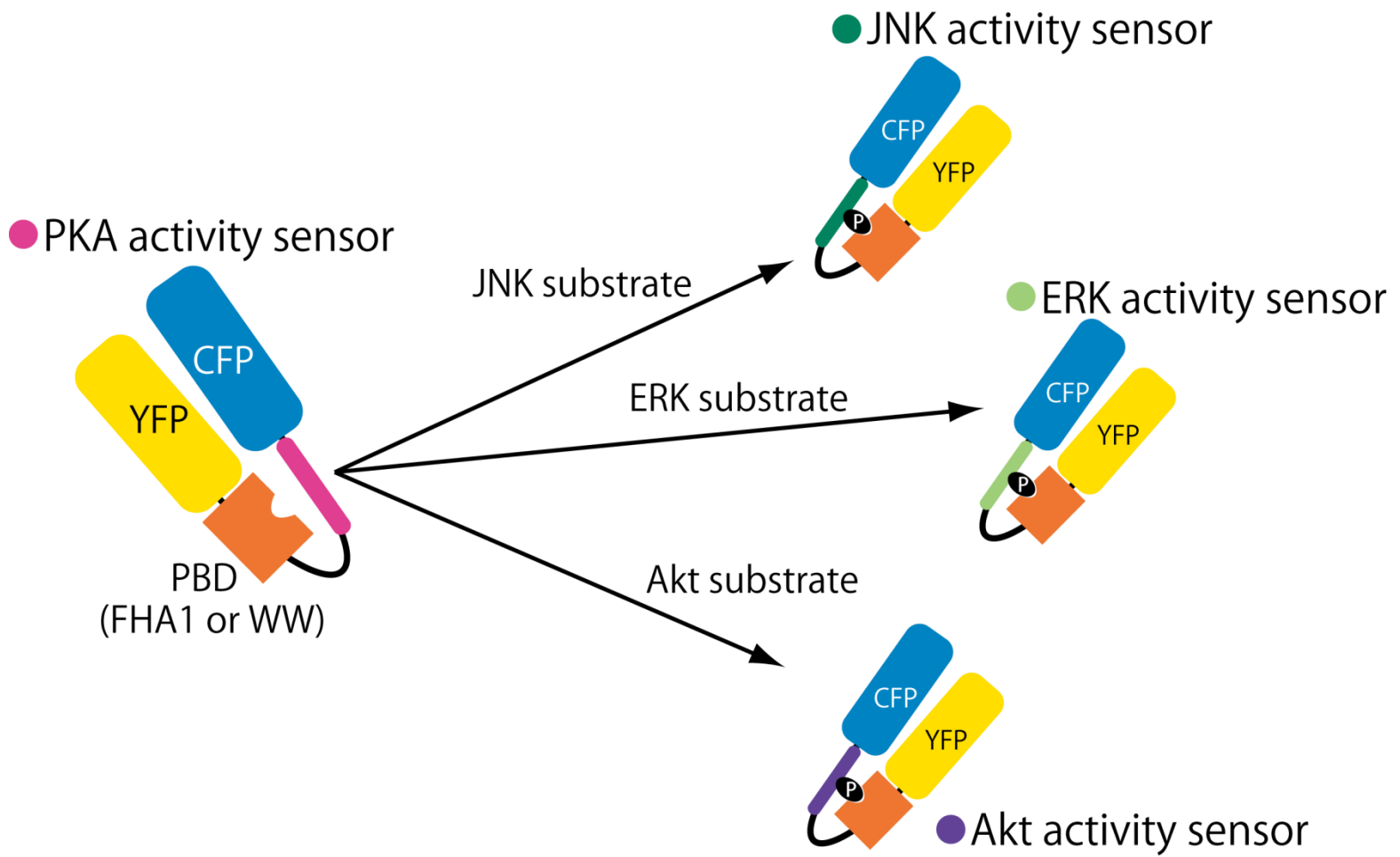
Eevee システム:



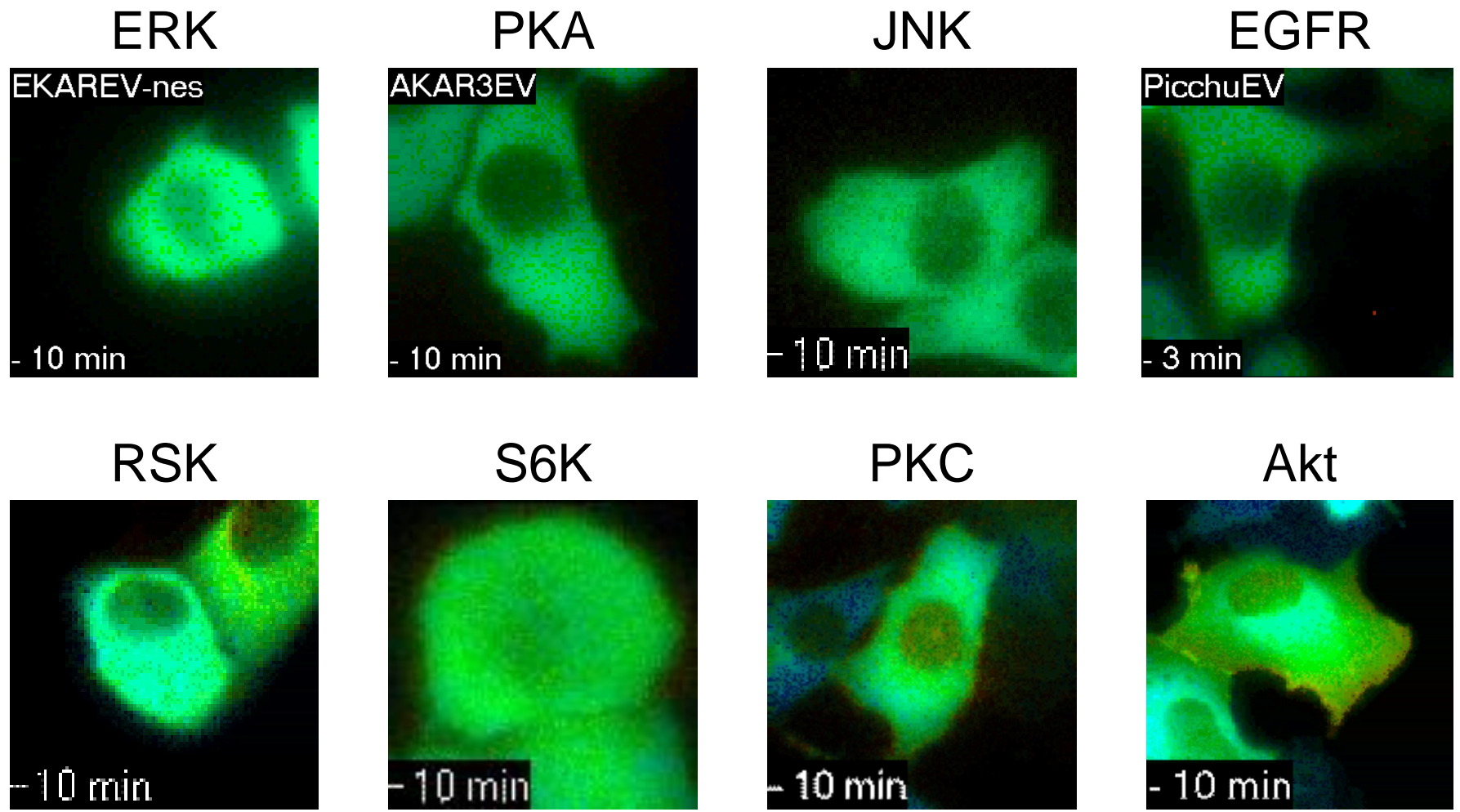
- 二量体化しやすい蛍光タンパク質ペア
- 最適なリンカー長

Extension of enhanced visualization by evading extra-FRET

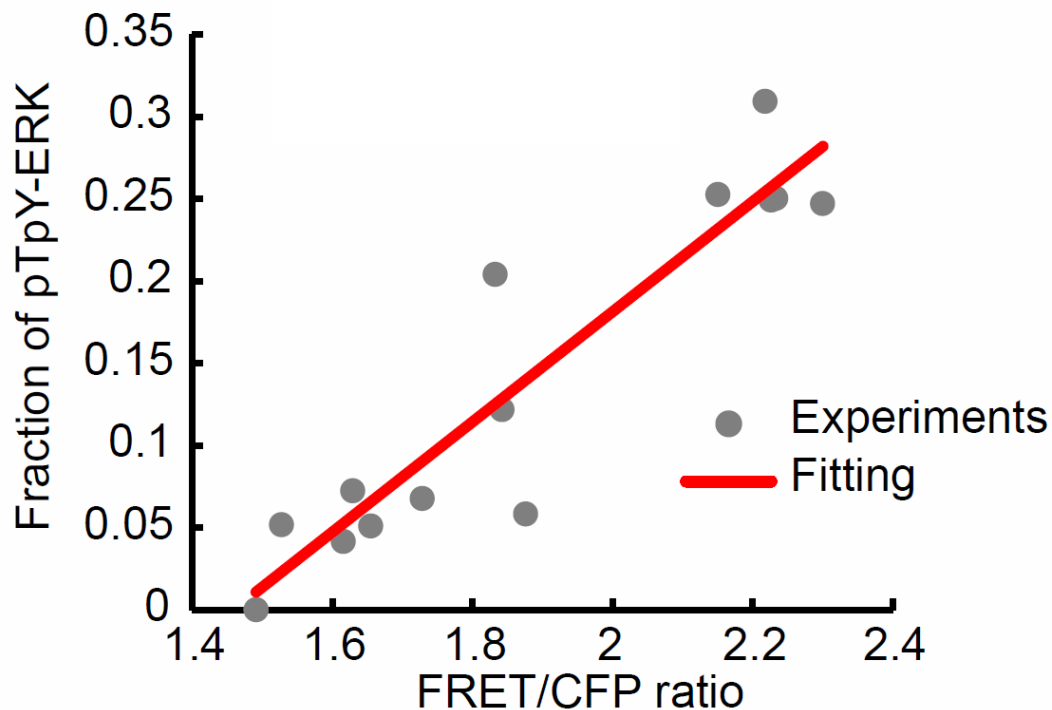
# FRETバイオセンサーの効率的な開発



# FRETバイオセンサーの効率的な開発



# FRETと内在性分子の相関





# 酵素反応:コメント、将来展望

- In vitroはタンパク精製がやはり面倒。また in vitroの条件やタンパク質の精製度とかに依存する。やはりIn vivoの測定の方が生理的だとおもわれる
- FRETでやや改善はされるが、網羅的に酵素反応速度を測定するのは現時点では難しい。リン酸化ペプチドの質量分析による絶対定量などの手法の開発が必要か。

# 今日の内容

- イントロ
- 生化学的なパラメーターの定量
  - タンパク質濃度
  - 拡散定数
  - 解離定数
  - 反応速度定数
- **その他の定量事例**

# その他の定量事例

- データのばらつき度合いを比較したい
- バラバラかクラスターかランダム分布か
- 振動系？興奮系？単なる揺らぎ？を知りたい
- 細胞運動を定量化したい

→統計の知識、時系列解析、数理生物の知識があれば定量的に示せることが多い。

→適当な統計量がなければ自分で定量用のindexを作ってしまう。

# 使えそうな統計量

平均 $\mu$ : そのまま

標準偏差 $SD = \text{分散}^{1/2}$ : データのばらつき、広がり

男性:  $60 \pm 12$  kg, 女性:  $40 \pm 10$  kg

変動係数 $CV = \mu / SD$

上のデータでは女性のほうが男性よりCVが大きい。

生物データの多くは、平均が大きくなれば標準偏差も大きくなる。

ショットノイズなら 標準偏差 = 平均 $^{1/2}$

# 使えそうな統計の知識

- フーリエ変換、自己相関
  - どちらも、時系列から周期的な信号を判定したりするのに使える

## ウィーナー・ヒンチンの定理

自己相関  $R(\tau) = \int S(f) e^{j2\pi f\tau} df$  X軸がずれ時間  $\tau$

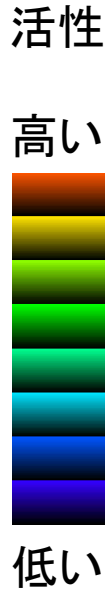
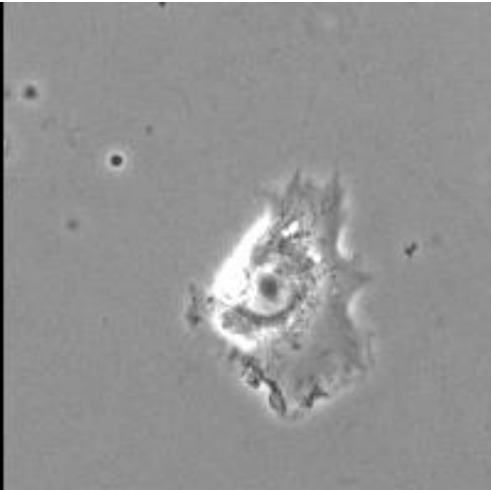
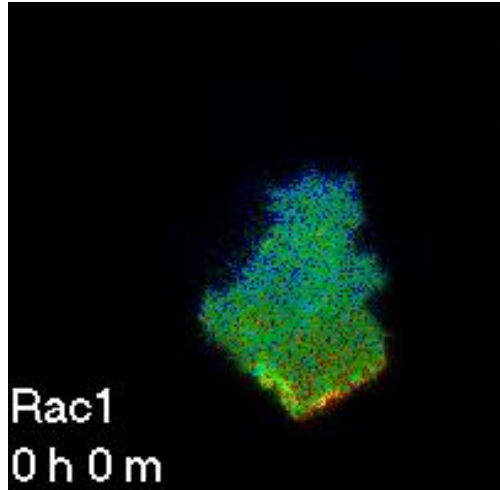
フーリエ変換  $S(f) = \int R(\tau) e^{-j2\pi f\tau} d\tau$  X軸が周波数  $f$

実験の人はこういうのが知ってるだけでよい。今はMatlabやRで簡単に計算できるし、分からなければプロ(次の演者とか)に聞けばよい

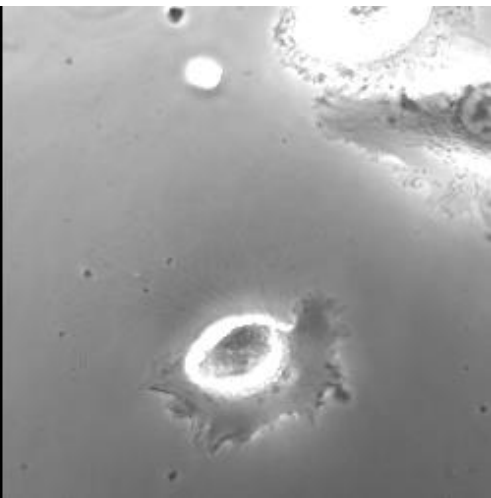
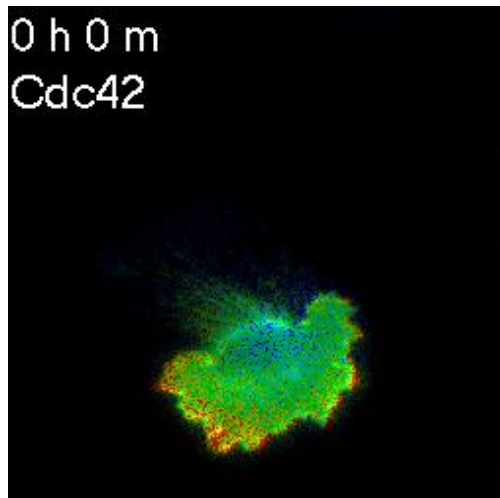
# 細胞運動関係

HT-1080 細胞

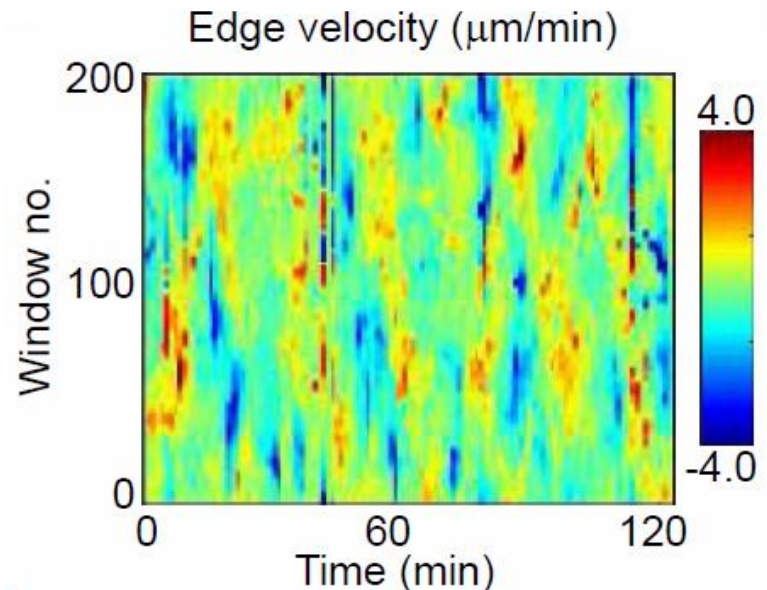
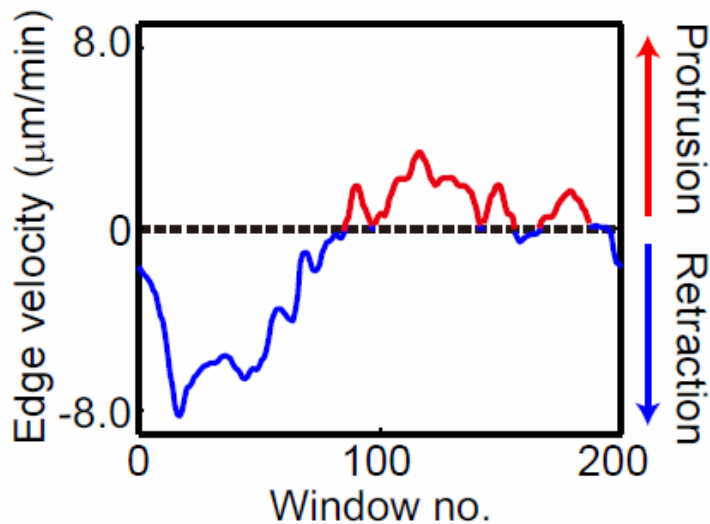
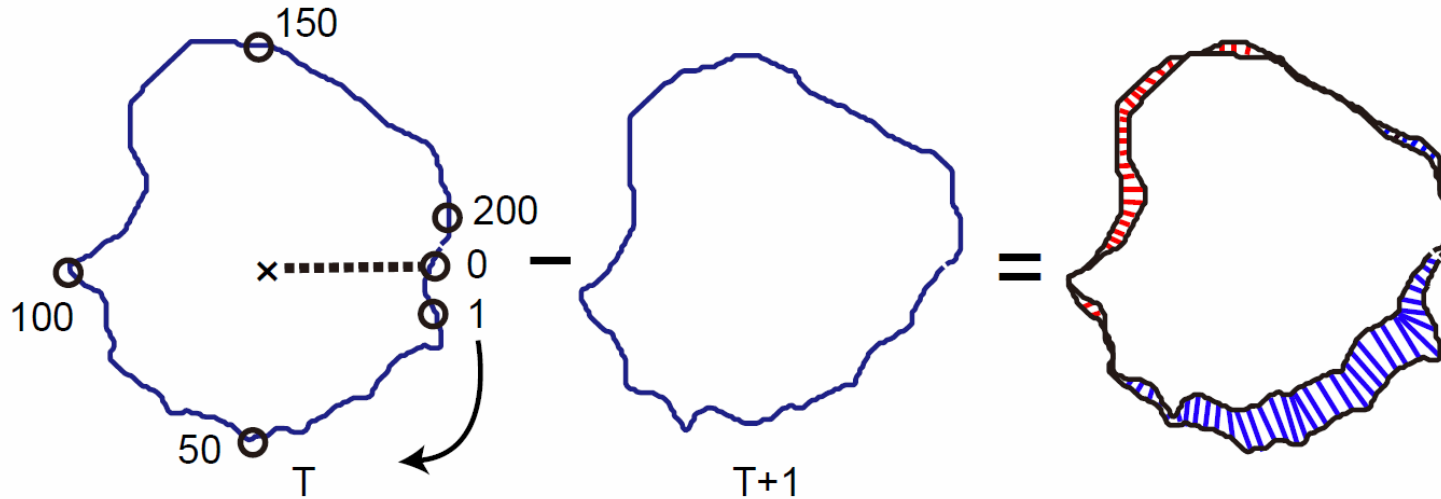
Rac1  
FRET  
イメージング



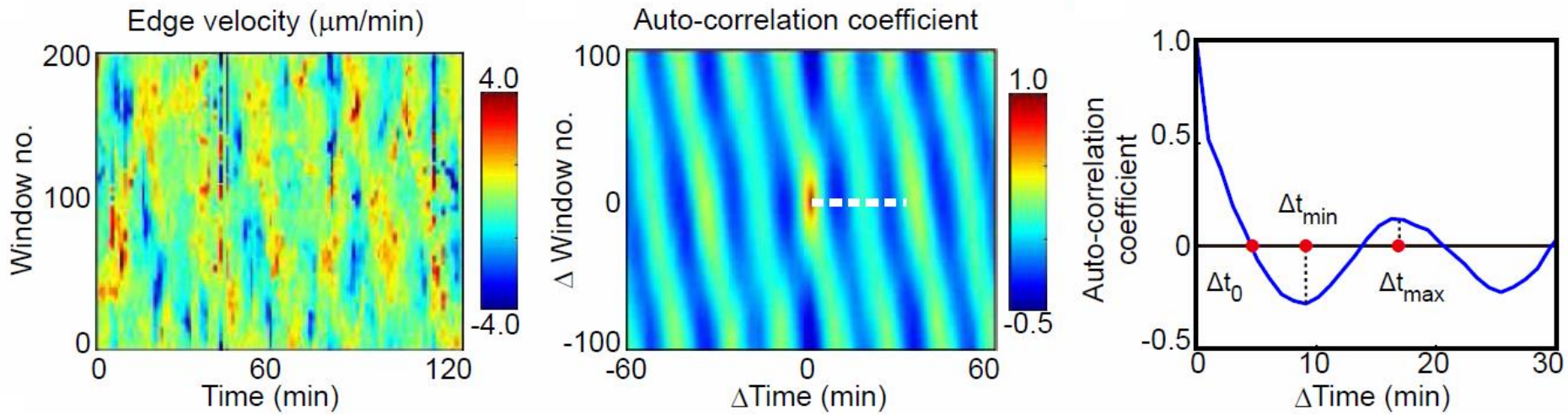
Cdc42  
FRET  
イメージング



# 細胞膜伸展速度の定量



# 自己相関関数によるパターン抽出

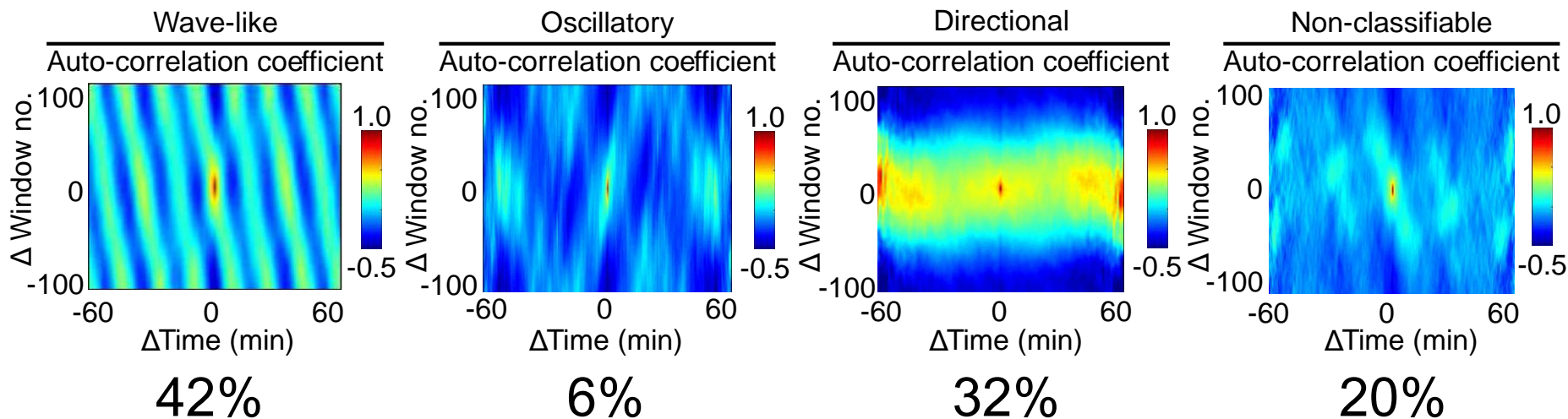
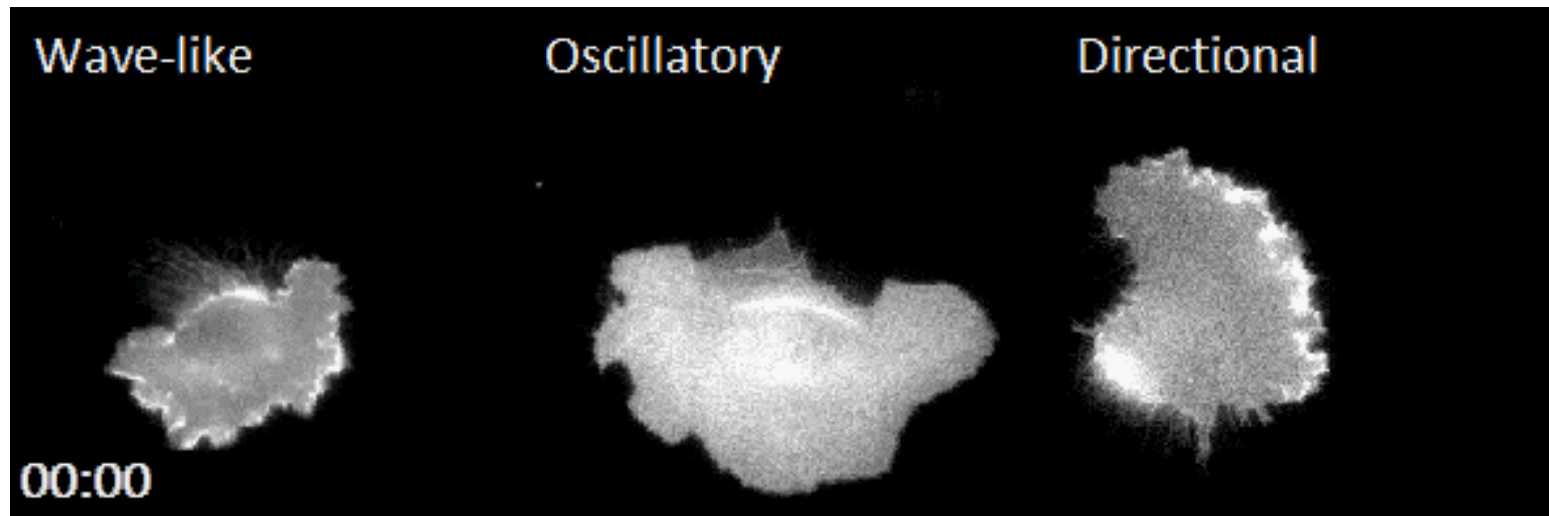


$$ACF(\Delta x, \Delta t) = \frac{\langle \delta F(x, t) \rangle \langle \delta F(x + \Delta x, t + \Delta t) \rangle}{\langle \delta F(x, t) \rangle^2}$$

$$\delta F(x, t) \equiv F(x, t) - \langle F(x, t) \rangle \quad \langle F(x, t) \rangle \equiv \text{平均値}$$



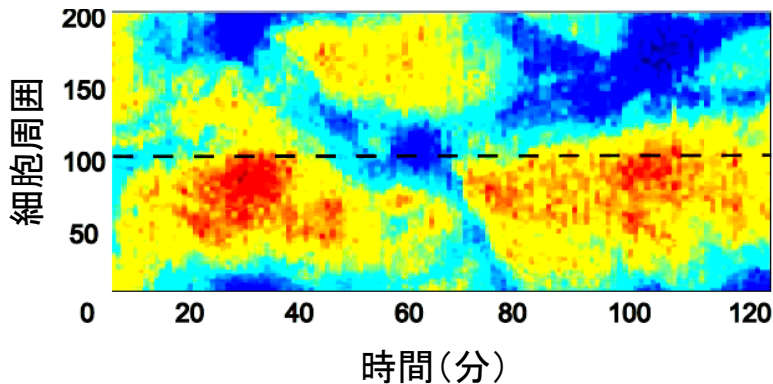
# 自己相関関数によるパターン抽出



# 相互相関関数による相関解析

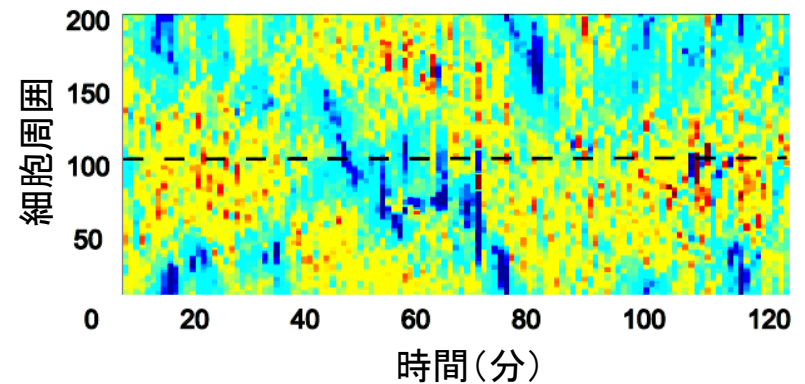
Rac1の分子活性

関数  $F(x,t)$



細胞膜の伸展速度

関数  $G(x,t+\Delta t)$



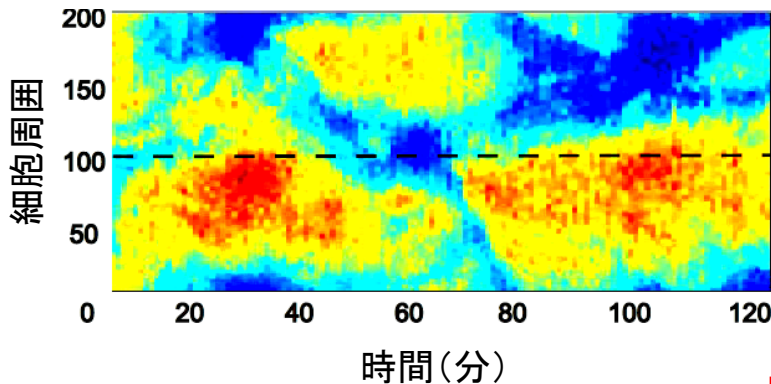
$$CCF(\Delta x, \Delta t) = \frac{\langle \delta F(x, t) \rangle \langle \delta G(x + \Delta x, t + \Delta t) \rangle}{\langle \delta F(x, t)^2 \rangle^{\frac{1}{2}} \langle \delta G(x, t)^2 \rangle^{\frac{1}{2}}}$$

$$\delta F(x, t) \equiv F(x, t) - \langle F(x, t) \rangle \quad \langle F(x, t) \rangle \equiv \text{平均値}$$

# 相互相関関数による相関解析

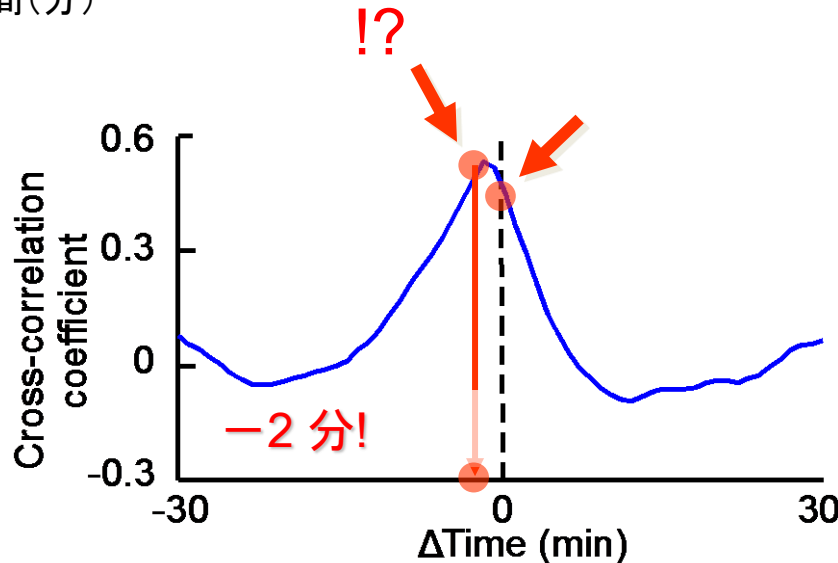
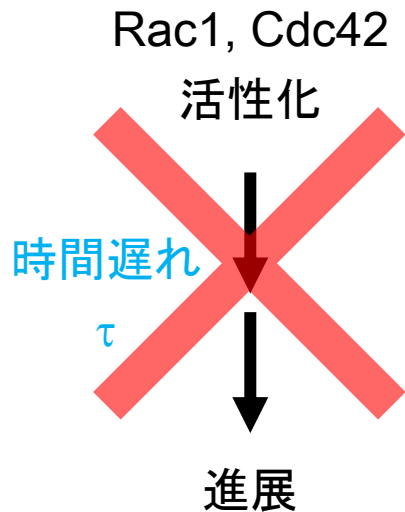
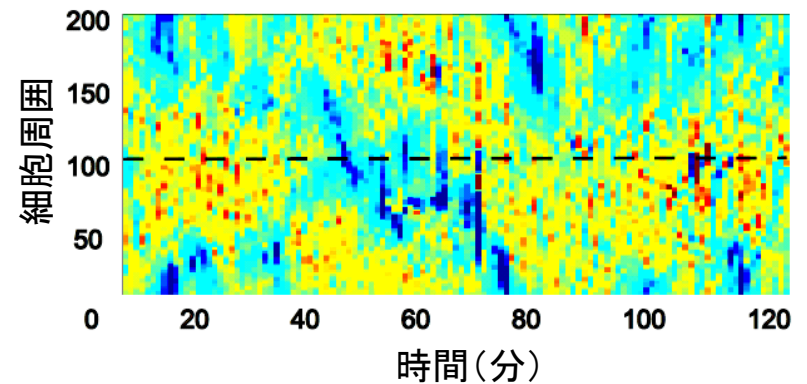
Rac1の分子活性

関数  $F(x,t)$

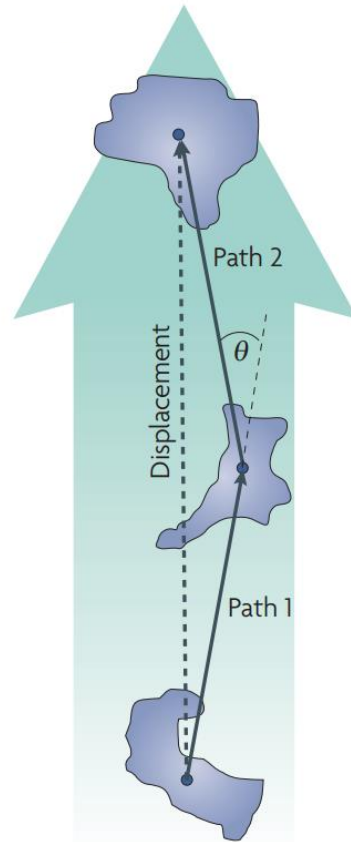
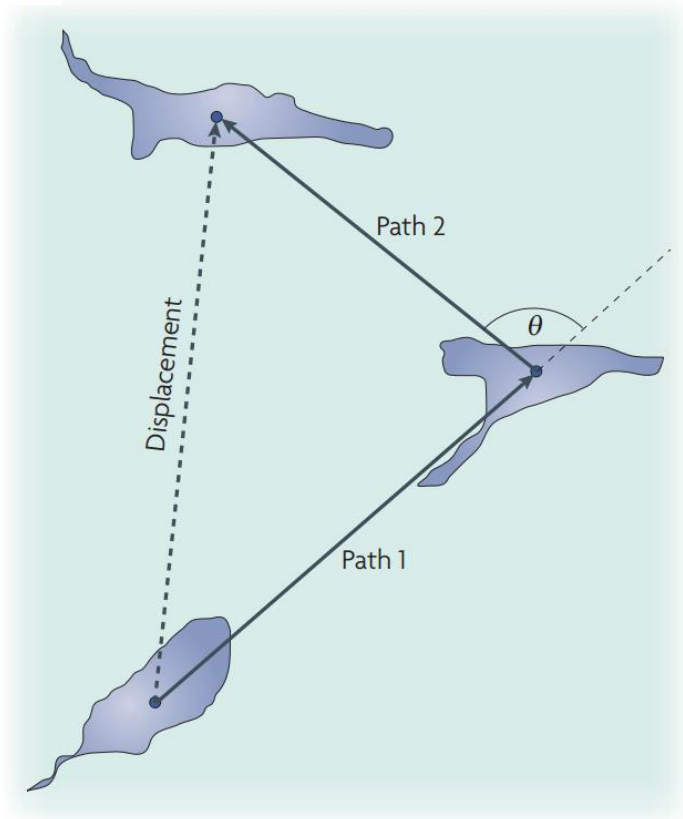


細胞膜の伸展速度

関数  $G(x,t+\Delta t)$



# 自分でindexをつくる



Velocity

$$v = \frac{\text{total migration path}}{\text{time}}$$

どれだけはやく動いたか

Directionality

$$d = \frac{\text{displacement}}{\text{total migration path}}$$

どれだけまっすぐ進んだか

# 最後に: 困ったときにはこの人に聞け

## ウェット

- イメージング: 笠井さん、新井さん、奥さん、鈴木団さん
- 細胞生物、生化学: 日比野さん、松林さん、広井さん、青木
- 発生、モデル生物: 藤森さん、杉村さん、木村暁さん、鈴木誉保さん、澤井さん
- 神経: 寺前さん
- 合成生物, MEMS: 戎家さん、前多さん、木村啓志さん

## ドライ

- 統計・数理生物: 大羽さん、石原さん、小林さん、高木さん
- 画像解析: 内田さん、塚田さん、尾崎さん
- バイオインフォ: 二階堂さん、入江さん
- 計算科学: 舟橋さん

おつかれさまでした