

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07400

研究課題名(和文)細胞内物質輸送における細胞骨格乗り換え機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of switching cytoskeletons in intracellular transport.

研究代表者

池田 一穂 (Ikeda, Kazuho)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：20642565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの細胞小器官や小胞は、微小管上とアクチン繊維上を双方向に輸送される。輸送を駆動する分子モーターの切り替えと細胞骨格の変化を伴った現象だが、制御機構の全容は明らかにされていない。本研究では、魚類・両生類のメラノソーム輸送系をモデルとして、分子モーターの局在制御と、輸送に寄与する分子モーター数の測定によりこの問題に迫った。その結果、分子モーターの実働数と小胞輸送制御機構の関連についての理解に貢献する成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内物質輸送は細胞機能を支える主要な機構の一つである。細胞内物質輸送の機能低下は多くの疾病の原因となると考えられており、例えば神経細胞では様々な神経変性疾患を引き起こす。本研究は、細胞内物質輸送の分子機構を明らかにすることを目指したもので、小胞上において実際に輸送を担う分子モーター数の測定法を確立した。これにより小胞輸送の方向や速度、レールの乗り換え機構の解明に貢献した。本成果が今後の細胞内物質輸送関連の疾患・病態の理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Intracellular vesicles and organelles are transported within a cell along both microtubules and actin filaments bidirectionally, which requires spatial-temporal regulation of cytoskeletons and switching molecular motors. However molecular basis of such regulation is poorly understood. In this study, we tried to answer this issue by accurate measuring the number of molecular motors responsible for vesicle transport and manipulating molecular motor localization using fish and frog melanophore as a model system of vesicle transport. We showed our newly developed method revealed several force producing dyneins associated each melanosome and showed cooperative movement. Our findings indicated the regulation of the number of force producing motor plays essential role in intracellular transport.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内物質輸送 メラノソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内物質輸送は、細胞や組織の多岐に渡る生命機能を支える主要な機構の一つである。細胞内を輸送される小胞や細胞小器官の多くは、異なった運動特性を持つ複数種の分子モーターにより、しばしば細胞骨格上を双方向に、更には微小管とアクチン繊維の双方の細胞骨格間を切り替えて目的地に輸送される。細胞内物質輸送においては、一般に細胞中心から辺縁に伸びる微小管は「高速道路」、細胞全体に入り組んだアクチン繊維は「一般道」のような役割を担い、例えばエンドサイトーシスの過程では、エンドソームは細胞膜付近に局在するアクチン繊維から、その輸送レールを微小管に乗り換えることで細胞中心へ高速に輸送される。このような細胞骨格の乗り換えは細胞活動に必須の機構であるが、制御機構については未だ不明な点が多い。

微小管上の輸送とアクチン繊維上の輸送は、その動力発生に寄与する分子モーター種が異なる。レールの乗り換えと同時に分子モーターのスイッチを実現する機構の基礎的知見を得るため、申請者らは *in vitro* 再構成系を用いた最小システムでの乗り換えメカニズムを解析し、カーゴに結合する分子モーターの分子数やその動力特性、細胞骨格間の立体配置の重要性を指摘した (Biophys. J. 2012)。一方、細胞内の制御機構については、魚類や両生類の黑色素細胞をモデルとした研究が盛んに行われてきた。この細胞は環境

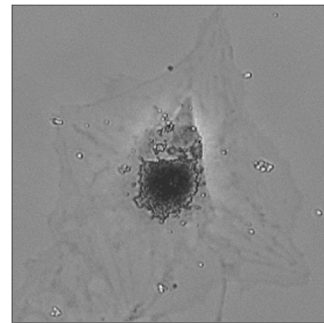
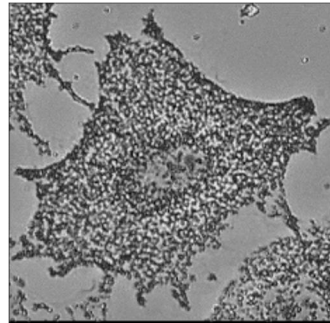


図1 アフリカツメガエルの黑色素細胞
細胞内の cAMP 濃度変化がトリガーとなり、メラノソームの拡散(左)と凝集(右)が可逆的に誘導される。

色に応じて、細胞内のメラノソーム(黑色素顆粒)の輸送を制御し、これらの細胞中心への凝集と拡散によって個体表面の体色を素早く変化させる機能を持つ(図1)。申請者らは黑色素細胞を用いたこれまでの研究において、分子モーターの制御機構や、様々な制御因子の役割を報告してきた。小胞の細胞骨格乗り換えにおいては、メラノソーム上に結合する分子モーターの分子数および活性の制御に加えて、細胞骨格のダイナミクスの変化が重要な役割を持つことを見出した (Develop. Cell 2009, Mol. Boil. Cell 2011)。メラノソームの凝集過程では、細胞全体に張り巡らされたアクチン繊維上のメラノソームは微小管にその輸送レールを乗り換えるが、この過程で微小管のダイナクスは増大し、一部のメラノソームは微小管伸長先端に捕獲され微小管上の輸送が開始される(図2)。一方拡散の過程ではアクチン繊維のダイナクスがメラノソーム乗り換えに必須の機構となる。このように、細胞内物質輸送における細胞骨格の乗り換えは、輸送の駆動体とレールの協同した時空間的制御によって実現されている。

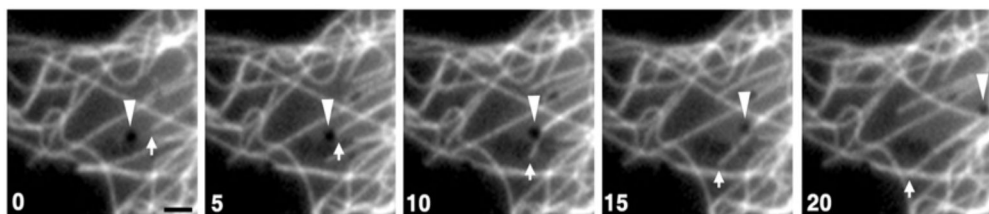


図2 メラノソーム凝集過程における微小管の役割
凝集過程では、微小管のダイナクスが増大し、伸長先端においてメラノソームを捕縛し、微小管上の輸送を開始させる。(矢印: 伸長する微小管先端、鋏: メラ

しかしながら、乗り換え制御機構の分子の詳細に関する知見は未だ乏しい。従来の過剰発現やノックダウンによる結果は、実験系によって異なっており、その解釈に混乱を来している。申請者らのこれまでの *in vitro* および *in vivo* での実験結果から、輸送に寄与する分子モーターの分子数の僅かな変化が輸送制御に大きな影響を与えることが示され、生理的条件下で高い定量性を持った計測・摂動を加えることが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、メラノソーム輸送における細胞骨格間の乗り換え過程での分子モーターの結合数と活性化制御機構を明らかにする。従来の手法では解析が困難だった分子モーターの分子数制御と活性化制御に焦点を当て、ゲノム編集を利用した内在性分子モーターの活性及び分子数操作技術と、局所詳細釣り合いに基づく揺らぎの定理を利用した小胞上の分子モーター数の直接測定技術を用い、この問題にアプローチする。さらに細胞骨格のダイナクス制御については、これまでのリン酸化プロテオーム解析に基づく制御候補因子の機能解析を行い、乗り換え制御機構の分子の詳細の解明を目指す。

3. 研究の方法

メラノソームに結合する分子モーターの分子数は、凝集・拡散の各過程で大きく変動することが示唆されているが、メラノソームの素早い輸送変化と必ずしも一致せず、分子モーターの分子数と乗り換え機構の詳細は分かっていない。申請者らは先行研究においてFRB-FKBPのパラマイシン依存性二量体化技術を利用し、細胞内でダイニンと外来性キネシンの綱引きによる輸送制御系を構築し、輸送方向制御機構の解析を行った(Traffic 2016)。そこで本研究ではこれを応用し、メラノソーム輸送を担う各分子モーターにFRB配列を挿入することによって、メラノソーム上の分子モーター数を凝集・拡散の各過程で操作する技術を確立し(図3)、各分子モーターの分子数の変化が小胞乗り換えに与える影響を解析する。小胞上の分子モーターは必ずしも動力発生に寄与しているとは限らないので、局所詳細釣り合いに基づく揺らぎの定理を利用した分子モーター数計測技術を用い、実際の運動に寄与する分子モーターの数をモニターしつつ実験を行う。FRBの結合パートナーとなるFKBP配列は、メラノソーム上に発現するメラニン合成関連遺伝子に挿入し、ラパマイシン添加により、細胞質中にプールされている分子モーターのメラノソームへの局在化を誘導する。一方、他の細胞小器官表面等に局在化を誘導することで、フリーの分子モーターのメラノソーム局在化を阻害することも期待できるので、このアプローチも検討する。これにより、分子モーターの分子数制御が各輸送過程にどのように寄与するかを突き止める。

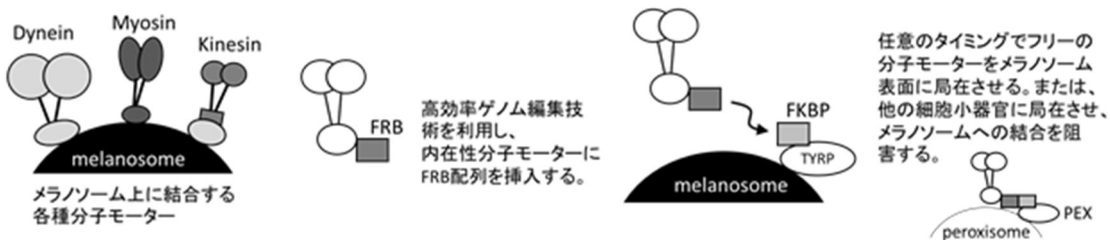


図3 ゲノム編集技術を利用した分子モーター数の操作

上記の分子モーター側の調節機構に加えて、微小管及びアクチン繊維のダイナミクス変化の制御機構の重要性を示唆する結果が得られているが、その詳細な機構は不明である。そこで、申請者らはこれまでにメラノソームの凝集・拡散の各過程におけるリン酸化プロテオームを実施し、細胞骨格ダイナミクスや修飾を制御するいくつかの候補因子を同定してきた (Mol. Biol. Cell 2014)。本研究では同様に他の制御因子の機能解析を実施し、小胞輸送制御に関わる細胞骨格のダイナミクス制御を担う分子を特定・制御機構の解明を目指す。解析にはゲノム編集による内在性遺伝子変異導入に加え、従来の生化学的解析手法、過剰発現などのアプローチを併用する。

4. 研究成果

本研究課題では黑色素細胞内のメラノソームの凝集過程における分子モーターの実働数や運動との関連を、局所詳細釣り合いに基づく揺らぎの定理を利用した分子モーター数計測技術を用い解析した(Scientific Report 2019)。メラノソームの凝集はエピネフリン添加により誘導され、メラノソーム上に結合するダイニンによる微小管上のマイナス端方向への輸送が活性化される。これによりメラノソームはアクチン繊維から微小管に輸送のレールを移し、細胞中心へ輸送される。この過程でメラノソーム上で輸送動力の発生に寄与するダイニンは、1から4分子程度であることが分かり、ダイニン分子の協同的輸送が示された(図4)。分子モーター数の変動の解析とダイニン阻害実験により、メラノソーム上で動力を発生する分子モーター数とメラノソームの速度との相関が明らかになり、小胞輸送における分子モーター数制御の重要性が指摘された。今後は同様の手法を用い、キネシンにより駆動されるメラノソームの微小管プラス端方向の輸送及び、ミオシンによるアクチン繊維上の輸送の解析を予定している。これに生化学的手法によるメラノソーム上に結合する分子モーター数の解析と合わせ、分子モーターの結合と活性化の制御機構の解明を目指す。分子モーターの局在操作については、FRB配列を挿入したダイニンサブユニットの一つBICDをメラノソーム上に局在させることで、内在性のダイニンの局在を操作し、メラノソーム拡散誘導下においても微小管プラス端への輸送を誘導できることを示した。これは細胞内の遊離したダイニン分子は、ホルモン刺激によらず一定の運動活性を持つことを示唆する。一方でキネシンのメラノソーム上への局在化では、微小管プラス端への輸送誘導は確認できなかった。これはキネシンによるメラノソーム拡散過程の寄与は、アクチン繊維上の輸送に至る一過的なものであることが関与

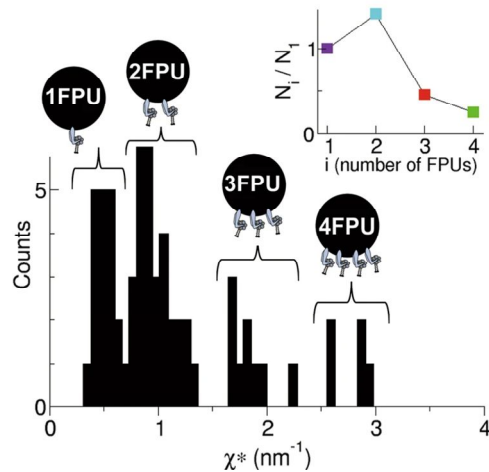


図4 メラノソーム凝集過程における動力発生に寄与するダイニン分子数(FPU)

している可能性があるが、ダイニンとは異なるモーター活性の制御機構が示唆された。また、ホルモン刺激下流の既知の制御因子(KPA や CK1)を分子モーターと同時に小胞上に局在化させ、制御系を含めたメラノソーム輸送モデルをペルオキシソーム上で再構築するアプローチも実施した(図5)。一部の制御因子の効果は認められたが、未知の制御因子の存在も示唆された。本研究課題ではこれらに加え、実施計画外の試みとして、魚類の黑色素胞細胞の不死化のためのいくつかの操作を実施した。2種類の遺伝子を導入したところ、表皮細胞の分裂は確認されたが、十分なメラノソームを含む黑色素胞細胞の株化には至っていない。黑色素胞細胞の不死化は、遺伝子操作を含む研究遂行において大きな利点があるため、引き続き挑戦する。本課題では、細胞内物質輸送における実効分子モーター数の制御機構について大きな成果が得られた。今後は本研究で利用した分子モーター数の計測手法と操作技術の応用により、本課題の成果がメラノソーム輸送のみならず、多様な系における輸送方向と細胞骨格乗り換え機構の解明に発展することが期待される。

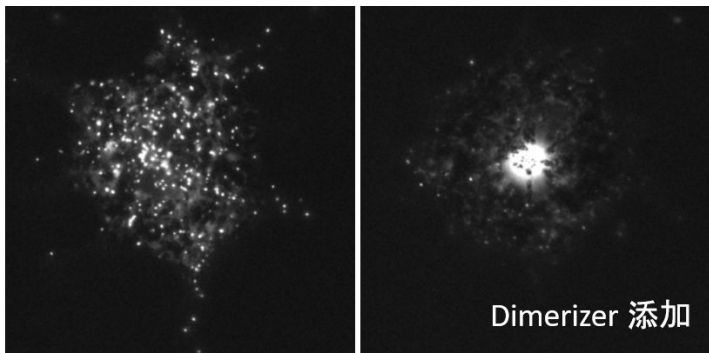


図5 CID法の応用によるペルオキシソームへのダイニン局在化
ペルオキシソームは細胞中心へと輸送される。

<引用文献>

S.Hasegawa, et al. 2019. Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using fluctuation unit . Sci Rep. 25;9(1):5099

H.W.Schroeder, et al. 2012. Force-dependent detachment of kinesin-2 biases track switching at cytoskeletal filament intersections. Biophys. J. 103:48-58

A.J.Lomakin, et al. 2011. Stimulation of the CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules through fine-tuning of microtubule assembly dynamics. Mol. Biol. Cell. 22:4029-4037

I.Semenova, et al. 2014. Regulation of microtubule-based transport by MAP4. Mol. Biol. Cell. 15;25(20):3119-32

K.Rezaul, et al. 2016. Engineered Tug-of-War Between Kinesin and Dynein Controls Direction of Microtubule Based Transport in vivo. Traffic 17(5):475-86

A.J. Lomakin et al. 2009. CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport. Dev Cell. 17(3):323-33

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasegawa Shin, Sagawa Takashi, Ikeda Kazuho, Okada Yasushi, Hayashi Kumiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using fluctuation unit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5099-5108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41458-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田一穂
2. 発表標題 ゲノム配列認識プローブの一分子解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Ikeda, Y. Terahara, Y. Okada
2. 発表標題 A simple and accurate construction of TALEs and its applications
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Ikeda, Y. Terahara, Y. Okada
2. 発表標題 A simple and accurate construction of TALEs and its applications
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田一穂、寺原陽子、岡田康志
2. 発表標題 TALE蛋白質の新規構築法と応用
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡田 康志 (Okada Yasushi) (50272430)	国立研国立研究開発法人理化学研究所開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	