

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82636

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19316

研究課題名(和文)細胞内の物流の謎を小胞の光操作によって解明する

研究課題名(英文)Unraveling the mysteries of intracellular logistics through optical manipulation of vesicles

研究代表者

古田 健也(Furuta, Ken'ya)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：40571831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に分子モーターを導入する方法として、エンドサイトーシスに依らず、膜融合の方法を用いて直接導入することに成功し、細胞内で分子モーターの運動を観察することに成功した。また、顕微鏡の焦点深度が薄いことを考え、細胞を高さ2-3 μm 程度まで潰すことに成功したが、さらに薄くすると細胞の挙動がおかしくなるなどの問題が生じた。このように分子モーターを導入することに成功したものの、これらの運動を細胞内で精密に定量することが困難であった。そのため、細胞内抽出液と粘性の高い人工的な溶液を用いた実験を試した結果、キネシンの運動速度に関して、従来のバッファー中での運動に比べて速くなるという興味深い結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞内に分子モーターを直接導入し、これが細胞内の微小管上を運動している様子を確認できた。また、これまで大きな謎とされてきた細胞内での分子モーターの運動と、従来のいわゆるインビトロ(試験管内)実験での運動との違いの一部が溶液の物理化学的な違いに起因する可能性が示された。これらのことは、分子モーターのメカニズムの基礎的な理解につながると同時に、分子モーターを応用する研究にとっても重要な知見となりうる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in introducing the molecular motor directly into cells using the membrane fusion method instead of endocytosis, and also succeeded in observing the movement of the molecular motor in the cells. In order to overcome the problem of the thin depth of focus of a microscope with a high-magnification objective lens, we succeeded in making the cells flatter to a height of about 2-3 μm , but further flattening caused problems such as irregular behavior of the cells. Although we succeeded in introducing molecular motors, it was difficult to precisely quantify these motions in the cells. Therefore, we conducted experiments using cell extracts and artificial solutions with high viscosity, resulting in interesting behavior of kinesin, where the speed was faster than that in the conventional buffer.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞内輸送 分子モーター 光ピンセット

1. 研究開始当初の背景

生物は、常にエネルギーを投入して物質を一方から一方へ運び続け、ランダムな状況(平衡状態、死んでいる状態)から遠い状況を保つことで、生きているという状態を維持している。これを支える細胞内の物流システムである細胞内輸送は、基本的に微小管とアクチン繊維とよばれる道路に沿って動く分子モーターが、多様な荷物を必要な時に、必要な場所に向かって一定方向に運ぶことで成り立っている、ということが教科書には書かれている。この描像は人間社会の物流システムを思い浮かべれば容易に理解できる。しかし、実際に顕微鏡で観察してみると、荷物である小胞は細胞内を縦横無尽に動き回っており、教科書に書かれているような、ある場所からある場所への整然とした輸送には全く見えないことに驚かされる。このことは研究者の間では良く知られているが(例えば Brangwynne, Trends in Cell Biol 2009)、なぜ細胞内輸送がこのように一見無駄な動きを繰り返しているのか、輸送効率がどうなっているかについて、実験データに基づいた定量的な議論は出来ていない。したがって、輸送の開始や停止などの制御機構については分子・細胞生物学によって明確な経路として表現されているにもかかわらず、肝心の輸送の方が全く制御されているように見えない、という矛盾が提示されたままであると言える。

2. 研究の目的

本研究計画は、光ピンセットや磁気によって細胞内の小胞を細胞内の一区画に集め、ここからスタートした多数の小胞の動きを各々トラッキングして輸送効率を定量するというシンプルな方法によって、なぜ細胞内輸送がデタラメな動きをしているように見えるのか、他の輸送方法、例えば完全な定方向輸送や、その逆に単純拡散による受動輸送と比較して効率はどうなっているのか、という疑問に答えることを目的とした。また、小胞輸送を担うキネシン、ダイニンは微小管上でお互いに反対向きに輸送を行う。行ったり来たりとデタラメな動きに見える小胞輸送が、これらのモーターが綱引きを行っているために起きているのか、それとも片方だけが活性化され、もう片方が不活化されるような制御が頻りに切り替えられているのか、という点や、細胞内と細胞外で輸送速度が数倍も違う点など、基本的で未解明の問題にも取り組む。

3. 研究の方法

細胞内の小胞を光ピンセットによって捕捉するか、または小胞内に導入した磁気ビーズを磁石によって細胞内で捕捉し、細胞内の一区画に集めてから、一斉に小胞が輸送される様子を顕微鏡で観察する。細胞内にはさまざまなタイプの輸送小胞があるが、本計画では出来るだけ初期条件を合わせるため、細胞外から細胞内に物質を取り入れて輸送するための小胞である初期エンドソームに焦点を絞る。本計画では、このような操作を同じ細胞で繰り返したり、数多くの細胞で行うことで細胞状態のバリエーションによる影響もみる。初期エンドソームのリアルタイム観察には幾つかの方法を検討している。一つは、初期エンドソームマーカーとして知られる Rab5a タンパク質を蛍光ラベルすることでトラッキングする方法で、すでに 研究代表者は HEK293、HeLa 等で観察に成功している。もう一つは、100 nm 以下の蛍光ポリスチレンビーズを細胞内に導入する方法で、これについても研究代表者は温度差を用いる独自の方法で実現している。

細胞内輸送を観察する上で問題となるのは、細胞が三次元的な形をしているため、焦点深度が浅い通常の顕微鏡観察では三次元の動きが正確に追えない点である。本計画では、繊維芽細胞のような接着性の強い細胞株を用い、ディッシュのコートニングを工夫して細胞ができるだけ薄く二次元的に接着するようにする。細胞を薄くしてもどうしても数十 μm の高さが出てしまう問題については、顕微鏡から出る小胞の蛍光像を二つの光路に分け、一方の光路だけにレンズを入

れて焦点距離をずらした二つの像をカメラに投影して、コンピュータ上で三次元的な小胞の軌跡を追跡することで解決できる。

トラッキングしたデータから直接得られる情報は、簡単に言えば配置した小胞が、ある時間が経ったときに中心に偏っているか、あるいは周辺に偏っているか、また、経時的にどのような軌跡を経て最終的な分布を作っているか、などである。輸送効率の計測方法は、例えば、輸送される場所を指定することが知られているマーカーを小胞に付け、これらの小胞をある区画に集めて小胞輸送がスタートしてから一定時間内に目標区画まで移動した小胞の数を数え、輸送された小胞の比を求めることによる。完全な定方向輸送や単純拡散による輸送効率との比較は、細胞内で小胞に掛かる粘性などの物理パラメータを求めた上で、粗視化されたモンテカルロシミュレーションで得られたデータを使って行う。

また、エンドソームにはダイニンとキネシンの両方が結合して綱引きをしていると考えられている。本計画では、細胞内に導入したビーズを光ピンセットによって細胞外に取り出して、そのまま細胞外に固定しておいた微小管上で高精度計測を行うという全く新しい試みを行う。細胞内から小胞を取り出す際には、強い可視光レーザーを当てて細胞膜を破壊し、かつ細胞の内容物が計測区域に混入しないように水性二相分離系などを用いて障壁を作る。この方法によって、これまで全くの謎であった輸送速度が細胞内と細胞外で常に数倍も違う問題や、綱引きによる往復運動の機構の解明などの問題に取り組む。

4. 研究成果

本研究計画は、細胞内と細胞外で分子モーターによる輸送の違いを定量することによって、細胞内と細胞外で運動速度が数倍も違うことや、デタラメな動きに見える小胞輸送がモーターの綱引きに依るのかなど謎を解明することを目的としている。

当初の計画通り、細胞内に分子モーター-ポリスチレンビーズ複合体を導入することに成功した。ただしその後、計画を一部変更し、エンドサイトーシスに依らず、膜融合の方法を用いて直接細胞内に導入することに成功した。膜融合を用いた理由は、エンドサイトーシスに依ってビーズを導入すると、観察しているビーズの輸送がどんな種類・数の分子モーターによって運ばれているかを特定できない、というデメリットがあるためである。つまり、平均的な個数や種類の情報は生化学的な実験で得られるが、観察している個々のビーズに関する情報が得られないということである。その結果、全反射蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内で分子モーターの運動を観察することに成功した。また、顕微鏡の焦点深度が薄いことを考え、細胞の高さを抑えるために、できるだけ細胞を薄く延ばすため、0.8%アガロースを乗せて細胞を潰す工夫を行い、高さ2-3 μ m程度まで潰すことができ、複合体の運動を観察することにも成功した。ただしこれ以上潰すと細胞の挙動がおかしくなったり細胞が死んでしまったりなどの問題が生じた。

このように、膜融合を用いて直接複合体を導入することに成功したものの、焦点深度の問題や、細胞が不規則に大きく動いてしまうこと、アガロースを通じた溶液の乾燥などが原因で、これらの運動を細胞内で精密に定量することが困難であった。そのため、並行してこれらの定量方法の検討は進めながらも、令和元年度に、細胞内抽出液と粘性の高い人工的な溶液を用いた実験を試した結果、キネシンの運動速度に関して、従来の希薄なバッファ中での運動に比べて速度が速くなるという興味深い結果が得られた。現在さらに再現性や条件のスクリーニングなどの詰めの実験を行い、どのような要因でこの現象が起きているのかの解明を急いでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田 桂太郎, 佐川 美咲, 小嶋 寛明, 古田 健也
2. 発表標題 Increasing speed of single-molecule kinesin movement in vitro
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------