

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20770116
 研究課題名 (和文) ナノ粒子3次元追跡法を用いたモーター分子による細胞内輸送の制御機構の解明
 研究課題名 (英文) Study of regulatory mechanism of intracellular vesicle transport by motor proteins using 3-dimensional tracking of nano-particle.
 研究代表者
 神原 文敏 (Takatoshi Kambara)
 東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員
 研究者番号：40451637

研究成果の概要 (和文)：モータータンパク質はオルガネラや小胞等を、その目的地まで輸送している。本研究は、モータータンパク質による輸送機構を詳細に解析するためのシステムの構築を目的としている。モータータンパク質の組み換え体を作成し、蛍光ナノ粒子結合させ、それらをセミインタクト細胞（細胞膜に穴をあけることで細胞骨格を保ったまま細胞内の溶液が置換可能になった細胞）内に導入した。モーター分子を結合させた蛍光ナノ粒子が移動する詳細を3次的に高時空間分解能で追跡することができるシステムを構築した。

研究成果の概要 (英文)：Motor proteins play an important role in transporting organelles and vesicles to the destination. The goal of this project is to construct new system to understand the regulatory mechanism of motor-based intracellular transport. I purified recombinant motor proteins, and could obtain fluorescent nano-particles attached to these proteins. The nano-particles were induced to semi-intact cells, and I could successfully track the 3-dimensional movement of these in high spatiotemporal resolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：モータータンパク質、細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景
 モータータンパク質はタンパク質・オルガネ

ラ・小胞等を機能すべき目的地に向かって輸送する。そのため細胞内輸送は細胞の構築・

維持・調節を理解する上で非常に重要である。近年の顕微鏡技術の進歩により、細胞内輸送を担うモータータンパク質一分子の生化学的・生物物理学的特性が非常に詳細に研究されてきた。しかしながら、細胞内輸送には多数のタンパク質が関与するために、タンパク質個々の機能解明だけでは細胞機能を理解する事は困難である。その一方で、細胞生物学的手法により生細胞におけるモータータンパク質の局在や小胞輸送の制御機構を調べる研究が進歩してきたが、細胞内の様々な未知の要因のため、生細胞を用いるだけでは細胞の制御機構の詳細を解明する事は非常に困難である。そこで、タンパク質レベルと細胞レベルの知見をつなぐ事ができる新しい実験系を構築することができれば、これらの研究は急速に進展すると期待される。

2. 研究の目的

本研究では(1)モータータンパク質を生化学的に解析する技術を基に、(2)光学顕微鏡による一分子可視化解析・細胞内ナノ粒子3次元追跡法の技術と(3)細胞質の条件を置換する事が可能なセミインタクト細胞系を組み合わせる事で、細胞内タンパク質機能解析のための新しい実験系を構築する。この新規のシステムを用いて、細胞内輸送にかかわるタンパク質分子、特にミオシン・キネシン・ダイニンといった異なるモータータンパク質の機能と細胞の制御機能とを関連づけて理解する。

3. 研究の方法

- (1) ヒト由来のモータータンパク質(ミオシン・キネシン・ダイニン)を、バキュロウイルス発現系を用いて、昆虫細胞により発現させ、精製する。
- (2) 発現・精製したモータータンパク質とナノ粒子をビオチン-アビジン結合を用いて結合させる。
- (3) ヒト乳がん細胞(KPL4)をセミインタクト化させ、モータータンパク質を結合したナノ粒子を導入する。
- (4) セミインタクト-KPL4細胞における粒子の移動を2焦点解析法を用いて3次元的に高時空間分解能で追跡する。

4. 研究成果

(1) ヒト細胞質ダイニン発現・精製。ミオシン(ミオシン5)・キネシン(KIF5a)の発現・精製は確立されている一方、現在のところ、組み替えダイニンは細胞性粘菌ダイニン及び酵母ダイニンでのみ発現可能である。これらのダイニンはヒトダイニンと、その制御機構において異なる事が考えられるため、ヒト細胞質ダイニンの発現・精製を、バキュロウイルス発現系を用いて試みた。このダイニ

ンには精製を簡便にするためにFLAG-tagの配列を、アビジン化ナノ粒子と結合させるためにビオチン化配列を導入した。Fig. 1.に示すようにヒト細胞質ダイニンの発現に成功し、FLAG-tagアフィニティ・クロマトグラフィにより非常に純度の高いダイニンを得る事ができた(Fig. 1, lane4)。

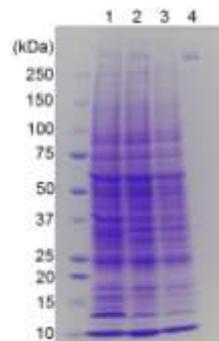


Fig. 1 ヒト細胞質ダイニンの発現と精製過程。1. Total Homogenate, 2. Supernatant of lysate, 3. Flow through fraction, 4. Elution.

これらの組み替えヒトダイニンの活性を *in vitro* 運動アッセイにより調べたところ、およそ $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ の速度を示した。この値はブタ脳より精製したダイニンの速度とほぼ同じであり、活性のある組み替えダイニンを精製する事に成功した。活性を示す組み換えヒト細胞質ダイニンの発現・精製は現在報告がなく、この成果は本研究だけでなく、ミオシン・キネシンの組み換え体に見られるように、従来の生化学的・生物物理学的手法によるダイニンそのものの運動活性の研究の飛躍的な進展につながる事が期待される。

(2) インタクト細胞内のナノ粒子3次元追跡。得られた組み替えモータータンパク質にはビオチン化配列が挿入されているため、アビジン化粒子と結合する事ができる。このモータータンパク質を結合させたナノ粒子をセミインタクト細胞とインキュベートする事により、導入した。ここで用いたセミインタクト細胞は、GFP-チューブリンが安定発現されているものを用いたため、微小管上を移動している粒子とフリーの粒子を区別する事ができる。セミインタクト細胞内における粒子の移動を2焦点解析法により3次元的に一分子追跡を行った。キネシン-粒子はほとんど($>95\%$)が2次元的に動き、微小管間の乗り換えは観測できたものの、3次元的な動きは非常にまれであった。これはおそらく、キネシン-粒子には目的地に行くためのシグナルがないために原則的にはランダムに分布し、細

胞内ではレールとなる微小管の体積に比例して存在するからと考えている。使用した培養細胞はディッシュで培養した際に薄く広がるために、Z 軸方向への細胞の体積がそもそも少ない。つまり、扁平な細胞内でのキネシン・ビーズは、高密度の微小管が局在する細胞下部に分布する確率が高くなると考えられるため、Z 軸方向への移動が観察されにくいと考えられる。一方、非常にまれに起こる3次元的な追跡も成功しているため、今後は、これらの事を克服するためのモデル細胞の選定・作成を検討し、このシステムを用いてモータータンパク質による細胞内輸送の詳細を解明したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神原 丈敏 (Taketoshi Kambara)

東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員

研究者番号 : 40451637

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし