

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06748

研究課題名(和文)メラノソーム輸送速度の比較から、分子モーター細胞内運動特性の謎に迫る

研究課題名(英文) Comparison of melanosome transport kinetics to characterize molecular motor intracellular motility

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術などを用い、細胞内輸送を担う分子複合体RMU(regulated motor unit)の標的小胞上での再構築を行い、分子モーターの細胞内運動特性の解析を進めた。並行してゲノム編集技術の応用として、生細胞中でのゲノム配列可視化のための多階層プローブを開発した。また、退色に高い耐性を持つ蛍光蛋白質StayGoldを応用し、細胞小器官のラベル手法を発展させた。

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り、この機構の破綻は多くの疾病の原因となることが分かっている。本研究のキネシンの機能解析についての成果は、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事が期待される。また、本研究では、輸送の対象となる様々な細胞小器官を、退色に高い耐性を持つ蛍光蛋白質StayGoldを応用したプローブで追跡する手法を発展させた。本手法の汎用性は高く、細胞内物質輸送の理解への貢献のみならず、細胞生物学全般への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using genome editing technology and other techniques, I reconstructed the molecular complexes responsible for intracellular trafficking, RMUs (regulated motor units), on target vesicles and analyzed the intracellular motor properties of the molecular motors. In parallel, as an application of genome editing technology, we developed multilevel probes for visualization of genome DNA in living cells. We also applied StayGold, a fluorescent protein with high resistance to fading, to develop a method for labeling cell organelles.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分子モーター 細胞内物質輸送 ゲノム編集

## 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。細胞内物質輸送の動力は、運動特性の異なる多様な分子モーターが担うことが知られており、これらが微小管やアクチン繊維をレールとし、様々な分子や細胞小器官を目的地まで運搬している。分子モーターの運動特性や制御機構は、*in vitro* 及び *in vivo* (細胞内) での計測による2面的なアプローチから理解されてきたが、分子モーターの運動特性の基本要素の一つである「速さ」に関しては、キネシン、ダイニンともに *in vitro* と *in vivo* で大きく異なる例が多く、この理由については未解明である。例えば神経軸索内を輸送されるエンドソームや、黒色素胞細胞内のメラノソームは、輸送を駆動する分子モーターに対して巨大であり、さらに細胞内の分子混雑状況を加味すると、*in vitro* に比べ直感的には速度は低下するように思われるが、実際には「速い」。そしてこの細胞内における分子モーターの「速さ」は、細胞から個体発生レベルの生命機能に至るまで必須の要素であるが、これまでの分子モーターの活性化機構や協同性による効果だけでは説明できず、*in vitro* の再構築実験では、分子モーターによっては細胞内の数分の一の速度しか達成できていない。研究代表者の所属研究室の上長、岡田康志博士ら(林久美子博士(東北大)らとの共同研究)は、近年、軸索輸送時のエンドソームに掛かる力を、ゆらぎの定理を応用することで非侵襲的に測定し、*in vitro* 計測時の力と比較することによりこの問題に迫った(Sci. Rep. 2019)。その結果、細胞内の分子モーターが速い理由として、細胞内では分子のATP加水分解の反応速度が高いことを示唆する結果を報告している。しかしながら、細胞内において分子モーターの反応速度を測定するのは困難であり、分子の反応速度に影響を与える細胞内要素はまだ分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、分子モーターが、*in vitro* 再構築系に比べ細胞内で「速く」運動する機構を理解するため、異なった小胞輸送速度を示す細胞間の比較から、この違いをもたらす制御機構を明らかにすることである。研究代表者が先行研究でこれまで使用してきた黒色素胞細胞は、メラニンを含む小胞メラノソームの細胞内凝集・拡散の各輸送により、個体の体色を変化させる機能を持つ(図1)。

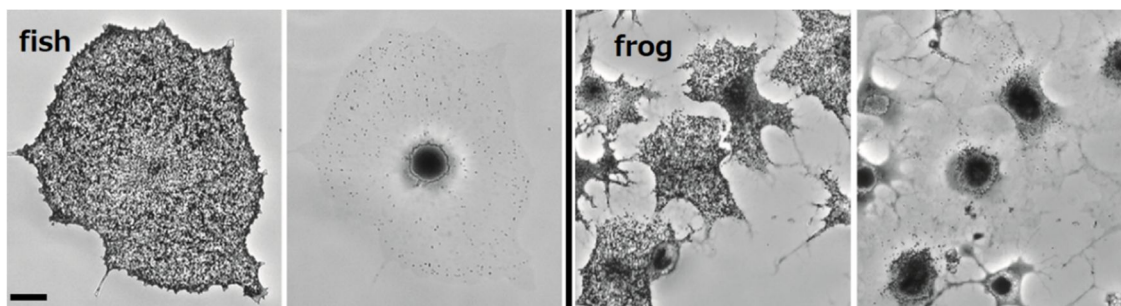
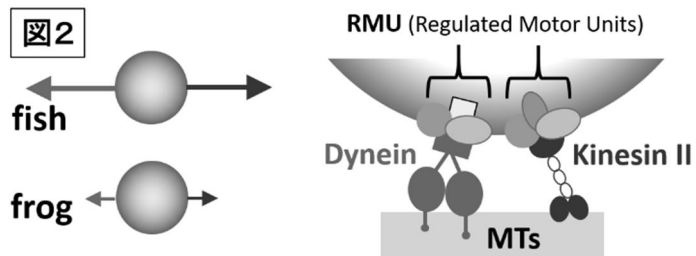


図1：魚類と両生類の黒色素胞細胞 それぞれ左がメラノソーム拡散時、右が凝集時。bar:25 $\mu$ m  
魚類と両生類の黒色素胞細胞では、メラノソーム輸送を担う主な分子群は共通していると考えられているが、細胞の大きさやホルモン刺激に対する反応速度等に差異が認められる。特に輸送速度に関しては、両生類のメラノソームの双方向の輸送は平均 0.4  $\mu$ m/sec 程度と、概ね *in vitro* で再現される速度であるのに対し、魚類のメラノソームは平均 2  $\mu$ m/sec 程度であり、更に、特に凝集の際の最高速度は 7  $\mu$ m/sec に迫る。しかしながら、このような輸送速度の違いをもたら

す要因については全く分かっていない。本課題では、両者の速度の違いがどのような機構に起因するかを解明するため、運動制御に関わるものが期待される各要素や条件を抽出し、それらの阻害及び入れ替えなどにより比較解析や再構築実験を行う。分子モーターそのものの構造の違いか、結合数制御機構や、既知の制御因子の機能の差か、または未知の細胞内制御因子の違いかを、生物物理学的手法及び分子生物学的手法で追及する。

### 3. 研究の方法

研究代表者らは、以前にメラノソーム輸送を担う微小管系モーターは、PKA、PP2A、p150などの複数の制御因子と複合体 regulated motor unit (RMU)としてメラノソーム上に局在することを示唆する結果を得ている(図2)。分子モーターに加え、これらの制御因子を魚類・両生類でそれぞれ差し替える



モーター、RMUは概ね共通しているが、速度は魚類の方が両生類より数倍から10倍も速い!

- ・分子モーター各ドメインの機能の違い
- ・分子モーターの結合数制御の違い
- ・既知の制御因子の機能の違い
- ・未知の制御因子の寄与

もしくは過剰発現させることで、メラノソームの輸送速度に与える影響を解析する。遺伝子・蛋白質の導入には、これまで実績のあるマイクロインジェクションとリポフェクションに加え、ゲノム編集技術、Tol2 やレンチウイルスなどを利用する。これにより、特に両生類のメラノソーム輸送速度を加速させ得る、魚類由来の制御因子の同定を目指す。複数のRMU要素(+分子モーター)の多重入れ替えも実施する。ここまでで何らかの手掛かりが得られれば、最小要素で構築したペルオキシソーム輸送系を用いて、その制御機構の詳細を追及する。DIC法で、任意の分子を非メラノソーム輸送制御系の小胞に局在化させることで、メラノソーム輸送に特異的な影響(凝集・拡散のシグナル応答、メラノソーム結合依存的な活性制御など)と独立した系における任意の分子の種類や数が輸送速度に与える影響を検証できる。上記実験と比較検証しつつ、両種の輸送速度制御を担う分子の責任ドメインの機能の違いと、メラノソーム輸送系特異的な制御の寄与を追及する。更に他の細胞の輸送系、特に神経細胞などを用い、ここまでで得られた知見の一般性を確認する。

### 4. 研究成果

標的細胞へ分子モーターを含む輸送制御関連遺伝子(RMU(regulated motor unit))の導入実験を実施した。過剰発現に加え、遺伝子導入にはTol2やレンチウイルスを利用した実験系と、ゲノム編集酵素による手法を用いた。RMUの導入により標的小胞の細胞内輸送は認められたが、PKAなど制御因子の寄与は認められず、機能的なRMUの遺伝子導入による再構築には構成系の再考が求められた。速度制御についての解析は現在も継続している。一方で上記と並行し、本研究では、TALENやCas9酵素を用いたゲノム編集の効率向上を目的とし、ゲノム編集酵素のアミノ酸配列の改変や、gRNAの配列の最適化を試みた結果、標的DNA配列に対する結合能を高める有効な配列を見出した。酵素の活性は、酵素のDNA結合ドメインに蛍光分子を加えたプローブを構築し、核内での標的配列へのラベル効率から評価する手法も採用した。この過程で、ゲノム編集酵素を応用したゲノムDNAの可視化プローブの開発へ研究が波及したが、その結果、任意のゲノム配列を効率的に可視化するプローブや、モチーフを標的とするプローブの開発に成功した。また、研究代表者の所属する研究室で開発されたクロマチン全体の挙動を追跡できるプローブの改変

型も開発した。核内ゲノム DNA の動態を生きた細胞で解析する手法は、現状では限定的であるが、本研究では、ゲノム構造の動態制御の研究などの他分野への発展に貢献することが期待される成果が得られた。また、細胞内小器官の輸送動態を高精度に追求する手法として、理研宮脇研究室と当研究室で応用開発を進めている StayGold の単量体変異型(Hirano et al. Nat Biotechnol. 2022)を、様々な局在化タグと融合させた蛍光プローブを構築し、それらの有用性を確認した。STED 超解像顕微鏡による観察では、長時間の励起光及びSTED 光に高い耐性を持ち、生きた細胞における標的分子の長時間の高解像度観察が可能であることが示された。さらに本研究では、福島県立医大佐事博士らとの共同研究として、キネシン 3 ファミリーの 1 種である KIF1C のがん細胞中での invadopodia 形成・伸長における挙動と制御機構を追求した(Saji et al. J Biol Chem. 2022)。共同研究では KIF1C は c-Src によるリン酸化を受けて MT 結合能が活性化されることが示された。メラノソーム輸送においては、キネシン 2 の 1 種である KIF3 がメラノソーム拡散時の初期過程で一過的に活性化することが分かっており、これまでに一部のチロシン残基のリン酸化が重要であることを示唆する結果を得ている。今後は上記で得た知見を参考に、KIF3 の運動特性を制御する機構にも着目したい。

#### <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

M. Hirano, et al. 2022. A highly photostable and bright green fluorescent protein. Nat Biotechnol. 40(7):1132

T. Saji et al. 2022. c-Src-mediated phosphorylation and activation of kinesin KIF1C promotes elongation of invadopodia in cancer cells. J Biol Chem. 298(7):102090

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 0件）

1. 著者名 Saji Takeshi, Nishita Michiru, Ikeda Kazuho, Endo Mitsuharu, Okada Yasushi, Minami Yasuhiro	4. 巻 298
2. 論文標題 c-Src-mediated phosphorylation and activation of kinesin KIF1C promotes elongation of invadopodia in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102090 ~ 102090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件）

1. 発表者名 池田一穂
2. 発表標題 ゲノム構造のライブイメージングのための多階層プローブの開発
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yunfei Zhang
2. 発表標題 Application of the Monomeric Photostable Fluorescent Protein mStayGold in Live Cell Imaging, Long-time Time-lapse Dynamic Analysis, and Super-resolution Imaging
3. 学会等名 Cell Bio 2023- An ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田一穂、岡田康志
2. 発表標題 ゲノム可視化プローブの開発
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田一穂、岡田康志
2. 発表標題 ゲノム配列特異的結合プローブの結合動態解析と改良
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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