

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293046

研究課題名(和文) 微小管構造多型による細胞内物質輸送ナビゲーション機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for the navigation of the intracellular transport

研究代表者

岡田 康志 (Okada, Yasushi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号：50272430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内物質輸送のナビゲーション機構はこれまでほとんど判っていなかった。我々は、微小管がGTP結合状態とGDP結合状態で異なる構造をとることを示し、神経細胞軸索起始部に局在するGTP結合型微小管が軸索輸送のナビゲーションを行うという新しい概念を提唱している。本研究は、これを発展させ、以下の3つの課題を通じて細胞内物質輸送のナビゲーション機構の基本原則を解明した。

分子モーターの運動性に対する微小管の構造状態の影響の解析と、その分子機構の解明、微小管の構造状態が細胞内の位置特異的に制御される機構の解析、非神経細胞における分子モーターのナビゲーション機構の解析

研究成果の概要(英文)：The navigation mechanism for the intracellular transport has remained unclear. We are proposing a model that the conformational differences of microtubules between the GTP-bound and GDP-bound state would serve as the directional cue for kinesins that drive the intracellular transport into the neuronal axons. In this study, we have clarified the underlying mechanisms for this transport by the combination of single molecule imaging and the structural analyses.

研究分野：生物物理学、細胞生物学

キーワード：細胞内輸送 細胞極性 微小管 分子モーター キネシン

1. 研究開始当初の背景

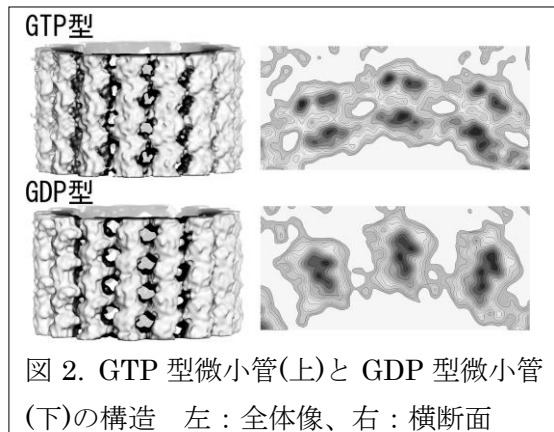
細胞内物質輸送を担う主要な分子モーターはキネシンとダイニンである。研究代表者は、神経細胞の軸索でシナプス小胞前駆体を運ぶキネシン KIF1A (Cell 1995)、神経細胞の樹状突起で多胞体を運ぶキネシン KIF2 (Neuron 1997)を発見し、一つの神経細胞の中で異なるキネシンが異なる部位で異なる荷物を運んでいることを初めて示した。その後、in vitro での一分子計測とクライオ電顕・X線結晶解析を組み合わせた KIF1A の運動機構の解明 (Science 1999; PNAS 2000; Cell 2000; Nature 2001; Nature 2003; Science 2004; Cell 2004; Nat Struct Mol Biol 2008)と平行してライブイメージングによるキネシンの細胞・個体レベルでの機能を研究してきた (J Neurosci 1995; J Cell Biol 1998; Cell 1998a; Cell 1998b; J Cell Biol 1999; Cell 2005; Nature 2005; Biophys J 2005)。一方、ダイニンについては、研究分担者の島らによるダイニン遺伝子組換え体の発現 (J Biol Chem 2004)およびダイニンモータードメインの結晶構造の解明 (Nature 2012)を契機に分子機構の理解が急速に進んでいる。しかし、これらの分子モーターが細胞の中でどのように制御されているか。特に細胞内物質輸送が正しい目的地へとナビゲートされる機構については、未だほとんど判っていない。

代表者らは、細胞内物質輸送のナビゲーション機構に関する最初の報告として、KIF5(キネシン-1)が軸索に選択的に集積することを示し (図1, J Cell Biol 2003)、その分子機構として軸索起始部に KIF5 に高親和性の微小管が存在することを示した (J Cell Biol 2011)。



更に、微小管の構造が GTP 型と GDP 型で異なること (図2)を示し、GTP 型微小管が

KIF5 高親和性微小管の実態であることを示した (J Cell Biol 2012)。



この一連の結果から、細胞内の部位特異的に構造状態の異なる微小管が局在し、分子モーターがその構造状態の違いを読み解くことで細胞内物質輸送がナビゲートされるという機構の存在が予想される。本研究では、以下の3つの課題を通じて、この予想の検証を行った。

- 1) 分子モーターの運動性に対する微小管の構造状態の影響の解析と、その分子機構の解明
- 2) 微小管の構造状態が細胞内の位置特異的に制御される機構の解析
- 3) 非神経細胞における分子モーターのナビゲーション機構の解析

2. 研究の目的

申請者らは、微小管の GTP 加水分解に伴う構造多型の空間分布が細胞内の地図となり、これを分子モーターが読み解くという全く新しい機構を提唱している。本研究では、以下の3つの課題を通じて、この仮説の検証を行った。

課題1: 分子モーターの運動性に対する微小管の構造状態の影響の解析と、その分子機構の解明

課題 2：微小管の構造状態が細胞内の位置特異的に制御される機構の解析

課題 3：非神経細胞における分子モーターのナビゲーション機構の解析

3. 研究の方法

課題 1 では、in vitro での一分子計測によって、キネシンが GTP 型微小管と GDP 型微小管を識別する動態を定量的に計測し、さらに、その際の微小管の動的構造変化を X 線線維散乱により計測した。こうして得られた微小管の動的構造変化は、一分子計測による微小管構造変化の検出および第二高調波イメージングによる光学的計測により検証を行った。さらに、クライオ電子顕微鏡法を用いた構造解析により、微小管の構造動態の構造的基盤を探索した。

課題 2、3 では、細胞内一分子計測の高度化により、細胞内でのキネシンと微小管の結合速度係数など反応速度論係数の定量解析を実現した。これにより、in vitro での一分子計測により得られた速度論係数との定量的比較を行い、細胞内でキネシンと微小管の結合を制御する機構の探索を行った。

4. 研究成果

課題 1 では、我々のこれまでの予想通り、キネシンが GTP 型微小管に高い選好性を示すことが示された。

それだけではなく、キネシンに対する親和性が低い GDP 型微小管が、キネシンの結合により一過性に親和性が上昇するという予想外の結果が得られた。

そこで、X 線線維散乱により、キネシンの結合に伴う GDP 型微小管の構造変化を測定した結果、キネシンの結合によって微小管の構造が GDP 型から GTP 型へと協同的に変化することが確認された。

この結果を更に確認するために、一分子計測および第二高調波イメージングを用いて

光学的に微小管の構造変化を計測したところ、同様の結果が得られた。

課題 2、3 については、細胞内での一分子計測法を発展させることで、キネシンと微小管との相互作用の反応速度論係数の定量解析を実現した。その結果、細胞内には、キネシンとの親和性が異なる 4 種類の微小管が存在することが判った。これを親和性が低い微小管から順に A,B,C,D と呼ぶことにすると、in vitro での計測結果との定量的比較によって、GDP 型微小管は B 型に、GTP 型微小管は C 型に相当することが予想された。

Taxol や TSA などの薬物処理で微小管のダイナミクスや翻訳後修飾を変化させると、それに応じて A, B, C, D の各ポピュレーションの比率が変化した。このことから、細胞内での微小管の機能分化が、微小管のダイナミクスおよび翻訳後修飾と密接に関連していることが示唆された。

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 5 件)

1. Chinen T, Liu P, Shioda S, Pagel J, Cerikan B, Lin TC, Gruss O, Hayashi Y, Takeno H, Shima T, Okada Y, Hayakawa I, Hayashi Y, Kigoshi H, Usui T, Schiebel E. The γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle. Nat Commun. 2015 Oct 27;6:8722. doi: 10.1038/ncomms9722. (査読有)
2. Ohyanagi T, Shima T, Okada Y, Tsukasaki Y, Komatsuzaki A, Tsuboi S, Jin T. Compact and stable SNAP ligand-conjugated quantum dots as a fluorescent probe for single-molecule imaging of dynein motor protein. Chem

Commun (Camb). 2015 Oct
14;51(80):14836-9.
doi: 10.1039/c5cc05526a. (査読有)

3. Hayashi S, Okada Y. Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics. Mol Biol Cell. 2015 May 1;26(9):1743-51.
doi: 10.1091/mbc.E14-08-1287. (査読有)
4. Takai A, Nakano M, Saito K, Haruno R, Watanabe TM, Ohyanagi T, Jin T, Okada Y, Nagai T. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 7;112(14):4352-6.
doi:10.1073/pnas.1418468112. (査読有)
5. Chiba K, Araseki M, Nozawa K, Furukori K, Araki Y, Matsushima T, Nakaya T, Hata S, Saito Y, Uchida S, Okada Y, Nairn AC, Davis RJ, Yamamoto T, Kinjo M, Taru H, Suzuki T. Quantitative analysis of APP axonal transport in neurons: role of JIP1 in enhanced APP anterograde transport. Mol Biol Cell. 2014 Nov 5;25(22):3569-80.
doi:10.1091/mbc.E14-06-1111. (査読有)

〔学会発表〕 (計 14 件)

1. Okada Y., “Cooperative conformational changes of microtubule by kinesin as the mechanism for the spontaneous polarization of the intracellular transport in neurons.” Pacificchem 2015, Honolulu, 米国、2015年12月20日
2. 岡田康志 「一分子イメージングによる細胞質内での反応速度定数の直接計測」、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、国際会議場(兵庫県、神戸市)、2015年12月2日

3. Okada Y., “ Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics”, The 2nd East Asia Microscopy Conference, 姫路商工会議所(兵庫県姫路市), 2015年11月25日
4. 岡田康志 “Conformational switching of tubulin serves as the guidance cue for the intracellular transport by kinesin.” 第53回日本生物物理学会年会シンポジウム、金沢大学(石川県、金沢市)、2015年9月13日
5. Okada Y. “Dissecting kinesin regulation through single molecule in cellulo measurements” Janelia Conference, アシユバーン(米国)、2015年6月1-3日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 康志 (OKADA, Yasushi)
理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー
研究者番号：50272430

(2)研究分担者

高井 啓 (Takai, Akira)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス

テム研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号：60637205

島 知弘 (Shima, Tomohiro)
独立行政法人理化学研究所・生命システム
研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号：60631786 (平成 25～26 年
度)

池田 一穂 (Ikeda, Kazuho)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・研究員
研究者番号：20642565

伊藤 陽子 (Ito, Yoko)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・特別研究員
研究者番号：60584571

(3)連携研究者

()

研究者番号：