

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440108

研究課題名(和文)改良型TALENを用いた高効率ゲノム編集による細胞内物質輸送制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of regulatory mechanism for intracellular transport using high efficient genome editing mediated by improved TALEN.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：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。細胞内を輸送される小胞や細胞小器官の多くは、しばしば細胞骨格上を双方向に輸送されるが、輸送方向の制御機構については未だ不明な点が多い。本研究は魚類・両生類の黒色素胞をモデルシステムとして、輸送方向の制御を説明する有力な仮説の一つである“綱引き仮説”を細胞内で検証した。また、分子モーターの活性変化を介さない、微小管表面のMAP4結合による輸送方向制御機構を明らかにした。

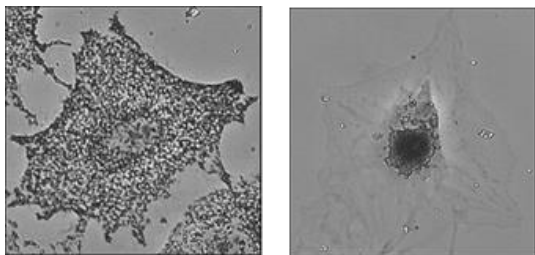
研究成果の概要(英文)：Intracellular transport is essential for numerous cellular functions. Many vesicles and organelles are transported along microtubules bidirectionally by opposing MT motors such as dynein and kinesin. However, regulatory mechanism for bidirectional movement of cargos largely remains unclear. In this study, we investigate tug-of-war theory by reconstructing tug-of-war between opposing MT motors in *Xenopus melanophore*. We also showed MAP4 mediated transport regulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：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輸送されるが、輸送方向の制御機構については未だ不明な点が多い。一般的には微小管上を輸送される小胞の進行方向は、ダイニンとキネシンの間の"綱引き"の結果決定されるとする綱引き仮説が広く受け入れられている。この仮説はすなわち小胞への分子モーターの結合数の制御を介して輸送方向を説明するモデルであるが、一方で分子モーターの運動活性の制御や、レールとなる微小管の構造や修飾状態の変化が、輸送方向の制御機構に関与する例も報告されており、決定的な結論は未だ出ていない。申請者らはこれまでに、魚類や両生類の黑色素胞を用い、黑色素顆粒(メラノソーム)の輸送制御機構の解明に取り組んできた。この細胞は環境色に応じて、細胞内のメラノソームの輸送を制御し、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ため、輸送方向の制御を研究するためのよいモデル細胞となっている(下図)。



アフリカツメガエルの黑色素胞
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。

2. 研究の目的

本研究では、両生類の黑色素胞をモデルシステムとして用い、細胞内物質輸送の輸送方向制御機構の分子的詳細を明らかにすることを目的とする。具体的には、

(1)細胞内で任意のタイミングでメラノソーム上に外来性キネシンを局在化させる実験系を構築し、分子モーター間の綱引き仮説を検証する。

(2)輸送方向制御機構における微小管結合蛋白質 MAP4 の役割を明らかにする。

(3)細胞内物質輸送の制御機構解明のための有力な分子ツールとしてゲノム編集酵素 TALEN の高活性化と、他の分子ツールへの応用を探る。

3. 研究の方法

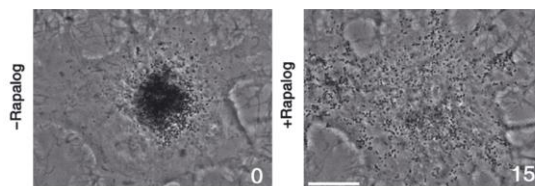
(1)ラパマイシンによってヘテロ 2 量体化することが可能なペプチドタグ(FRB、FKBP)を利用し、任意のタイミングでメラノソーム上に外来性キネシンを局在化させる実験系を構築する。外来性キネシンには FRB タグを付加し、結合相手として、メラノソーム局在シグナルを持つペプチドに FRBP を付加した融合蛋白質を黑色素胞内に共発現させる。メラノソーム局在化シグナルは、精製したメラノソームのプロテオーム解析によって最も効果的な配列を探索する。これによって、細胞内に分子モーターの"綱引き"を構築し、小胞の輸送方向制御の制御機構を解析する。

(2)リン酸化プロテオーム解析の結果、メラノソームの輸送制御に関わることが示唆された微小管結合蛋白質 MAP4 を細胞内で発現させ、メラノソーム凝集・拡散に与える影響を解析する。

(3)アミノ酸変異導入により得られた高活性型 TALE 蛋白質の解析を行う。X線小角散乱や分子動力学シミュレーション、In vitro 結合実験により、従来型と構造や DNA 結合活性の違いを明らかにする。

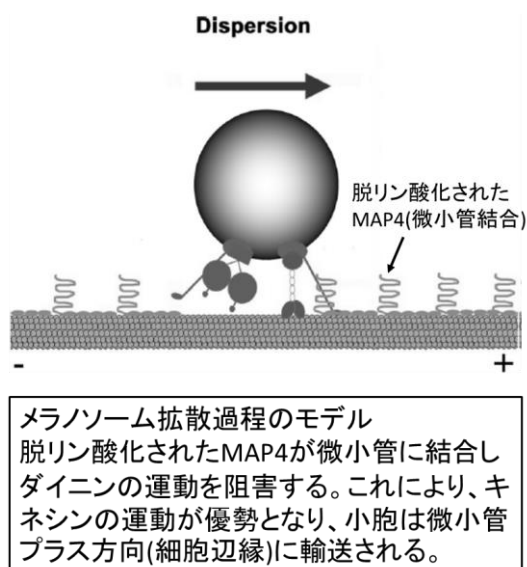
4. 研究成果

(1)ラパマイシン添加により、外来性キネシンを局在化させたメラノソームは、凝集シグナル下においても、細胞全体へ拡散することが確認された。この際、キネシンと逆の極性を持つ細胞質ダイニンによる微小管マイナス端方向の輸送は速度、移動距離ともに低下していた。細胞内においては、他の制御因子無しに、単純な分子モーター数の増減で輸送方向が制御され得ることを示した(2016 Traffic)。



外来性キネシンをメラノソーム上に任意のタイミングで局在化させる。凝集シグナル下に拡散が誘導された。

(2)申請者らのこれまでのリン酸化プロテオーム解析によると、複数の微小管結合蛋白質がメラノソームの凝集・拡散の各過程で異なったリン酸化制御を受けていることが示されている。本研究では凝集過程で高度にリン酸化される MAP4 のメラノソーム輸送における生理的機能を解析した。過剰発現系やリン酸化を受けるアミノ酸残基に変異を導入した MAP4 を用いたメラノソーム運動解析などにより、MAP4 は拡散シグナル下では微小管に局在化し、微小管マイナス端方向への輸送を担う細胞質ダイニンの運動を阻害することが示された。一方プラス端方向の輸送を担うキネシン II の運動には影響は限定的であった。これにより、時間的に制御された微小管表面の修飾が、小胞の輸送方向の制御に関与することを明らかにした(2014. Mol. Biol. Cell.)。



(3)申請者らはこれまでに、高活性型 TALE 蛋白質の開発を行ってきたが、本研究では従来型 TALE 蛋白質と DNA 結合特性及び構造の違いを詳細に解析した。高活性型 TALE においてアミノ酸変異を導入した特定残基は、隣接するリピート間の相互作用を強化し、DNA 結合状態を安定化させることが示された。更に、TALE 蛋白質の他の分子ツールへの応用の一例として、ゲノム配列可視化プローブを構築し、各種変異型 TALE の可視化効率を検証した。その結果、可視化効率はゲノム編集における変異導入効率と必ずしも一致しなかった。効率的な分子ツール開発には各変異型 TALE の DNA 結合特性の詳細な評価が課題である。

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 2 件)

1) Rezaul, K., D.Gupta, I.Semenova, K.Ikeda, P.Kraikivski, J.Yu, A.Cowan, I.Zaliapin, and V.Rodionov. 2016 "Engineered Tug-of-War Between Kinesin and Dynein Controls Direction of Microtubule Based Transport In Vivo." *Traffic* 17(5):475-86 (査読あり) doi: 10.1111/tra.12385.

2) Semenova, I., K.Ikeda, K.Resaul, P.Kraikivski, M.Aguiar, S.Gygi, I.Zaliapin, A.Cowan, and V.Rodionov. 2014 "Regulation of microtubule-based transport by MAP4." *Mol. Biol. Cell.* 15;25(20):3119-32 (査読あり) doi: 10.1091/mbc.E14-01-0022.

[学会発表] (計 9 件)

1) 寺原陽子、池田一穂、岡田康志「高活性 TALE 蛋白質の分子動態解析」第 122 回日本解剖学会総会、長崎大学、長崎市、2017. 3. 28

2) Ikeda, K., Terahara, Y., Miyashita, N., and Okada, Y. "In vitro analysis of super-active TALE protein" ASCB annual meeting, San Francisco, CA, USA 2016. 12. 2-6

3) 池田一穂、岡田康志「Development of TALE DNA binding probes for efficient chromatin live imaging」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市 2016. 11. 30

4) Kazuho Ikeda, Yoko Terahara, Kenta Sumiyama, Naoyuki Miyashita, and Yasushi Okada "Development of super-active TALEs for efficient genome visualizing and manipulating tools" The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI, USA 2015. 12. 19

5) Yoko Terahara, Kazuho Ikeda, Kenta Sumiyama, Naoyuki Miyashita, and Yasushi Okada "In vitro analysis of super-active TALE" ASCB annual meeting, San Diego, CA, USA 2015. 12. 15

6) 池田一穂、寺原陽子、隅山健太、岡田康志 「Development and application of improved TALE protein」第53回日本生物物理学会年会、金沢大学、石川県金沢市 2015.9.13

7) 池田一穂、寺原陽子、隅山健太、岡田康志 「高活性 TALE 蛋白質の開発とゲノム配列ライブイメーシングへの応用」第67回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀、東京都江戸川区 2015.7.2

8) 池田一穂、宮下尚之 「熱安定型高活性TALENの開発」バイオスーパーコンピューティング研究会(BSCRC)「ウィンタースクール2015」休暇村伊良湖、愛知県田原市 2015.1.30-31

9) K. Ikeda, Y. Terahara, K. Sumiyama, N. Miyashita, Y. Sugita, Y. Okada "Super-active TALEN with improved stability at 37 degree Celsius enables highly efficient and homogeneous gene knockout in mammalian embryos" The 2014 ASCB/IFCB meeting, Philadelphia, PA, USA 2014.12.06-10

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

池田 一穂 (Kazuho Ikeda)
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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岡田 康志 (Yasushi Okada)
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

(4) 研究協力者

()