

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03659

研究課題名(和文)ミトコンドリア輸送を担うモーター分子『数』の光制御とゆらぎ検出

研究課題名(英文)Optical control of number of motor proteins transporting mitochondria investigated by fluctuation analysis

研究代表者

林 久美子(HAYASHI, Kumiko)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00585979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞小器官が分子モーターキネシンとダイニンによって輸送される。非平衡統計力学に基づく非侵襲力測定法で1つの細胞小器官を輸送する分子モーター数を計測することができる。本研究ではミトコンドリア輸送について、輸送を担う分子モーター数の増減を光操作で制御し、非侵襲力測定法で分子モーター数を検出することで、測定法の妥当性を検証することが目的であった。ミトコンドリア輸送への光操作についてはミトコンドリア特有の問題が生じたため、光操作に変わって分子モーター阻害剤を用いて人工的に分子モーターを減少させる研究を行った。人工的な操作に伴い分子モーター数が減少し、その効果を非侵襲力測定法で検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内は複雑な環境にあり、その中で機能するタンパク質の物理的性質を調べることは難しい。そのような状況の中、非侵襲力測定法は細胞内での物理計測のツールとして発展してきた。非侵襲力測定法の主なターゲットは神経細胞軸索中の細胞小器官輸送である。アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経疾患で細胞小器官輸送の欠陥が報告されている。将来、神経細胞軸索中の細胞小器官輸送の解明は神経疾患研究の発展に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Organelles are transported by motor proteins kinesin and dynein. The number of such motors can be estimated by the non-invasive force measurement method based on non-equilibrium statistical mechanics. In the research, we aim to artificially increase or decrease the number of motors by optical control, and check the validity of the non-invasive force measurement method. Because of the specific problem related to mitochondrial transport, we could not change the number of motors by optical control, we succeeded in decreasing the number by the addition of inhibitor of dynein, and checked the validity of the non-invasive force measurement method.

研究分野：生物物理学

キーワード：光操作 タンパク質分子モーター 細胞内輸送 非侵襲力測定

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞内では細胞小器官が分子モーターキネシンとダイニンによって細胞の隅々に行き渡るように輸送される（図1は神経細胞での輸送の様子）。このような物質輸送は生命の維持に重要である。分子モーターはアデノシン三リン酸（ATP）加水分解で生じる化学エネルギーから力学エネルギーに変換し、細胞内に張り巡らされた微小管上を歩いて輸送する。分子モーターキネシンとダイニンは *in vitro* の人工的な再構成系において力や速度、ATP 加水分解の反応速度などの物理量が調べられてきた。一方で、複雑な非平衡状態にある細胞内で物理計測は難しく進んでいない。私たちは細胞内で応用できる非平衡統計力学に基づく非侵襲力測定法を開発し、細胞小器官輸送を調べ、1つの細胞小器官が複数の分子モーターに輸送されていることを突き止めた。このような複数分子モーターによる協同輸送が物質の安定した輸送を実現していると考えている。なお、非侵襲力測定法は輸送される細胞小器官の非平衡ゆらぎを解析し、力情報を得る測定手法である。

近年のオプトジェネティクスの発展は目覚ましい。本研究開発の直前にあたる2015年に本研究の研究対象である細胞小器官輸送をオプトジェネティクスによる光操作で制御する論文が *Nature* 誌に掲載された[Bergeijk et al., *Nature* 2015]。これを機に、本研究として、細胞内輸送の中でもミトコンドリア輸送について輸送を担う分子モーターの分子数の増減を光スイッチタンパク質を利用して制御することを計画した。

2. 研究の目的

背景に記載したように、光操作によって、人工的に分子モーター数を増減させることが可能だと考えられる。この操作で分子モーター数を増減させ非侵襲力測定法で検出することで、非侵襲力測定法の妥当性を検証することが目的である。

3. 研究の方法

マウスから採取した海馬から神経細胞を培養する。光スイッチタンパク質はミトコンドリアの膜タンパク質と分子モーターを接着させる機能を有するようにデザインする。光スイッチタンパク質の遺伝子を神経細胞に導入する。導入後、構築した光操作用蛍光顕微鏡を用いて光操作とミトコンドリアの蛍光観察を同時に行う。光照射によって、ミトコンドリアに付着する分子モーター数を増やす。

4. 研究成果

蛍光顕微鏡を用いて、ミトコンドリアへのラベル、光スイッチタンパク質の導入の成功を確認した。光照射によってミトコンドリアに付着する分子モーター数が増加し、ミトコンドリアの輸送速度が増加する計画であったが、速度増加が確認できなかった。シンタフィリンによるミトコンドリアの固定効果等で、ミトコンドリアの輸送が十分に観察できなかった。そこで、光操作に代わって、試薬(分子モーター阻害剤)を用いて人工的に分子モーターを減少させる研究を行った。図2は非侵襲力測定法の結果である [Hasegawa et al., *Sci Rep* 2019]。人工的な操作に伴い分子モーター数が減少し、その効果を非侵襲力測定法で検出することができた。今後は、新タフィリンによる固定効果がないシナプス小胞前駆体などの輸送をターゲットに光操作による制御を目指すことで研究を継続したい。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

国内外の位置付けとインパクト：

in vitro の1分子実験では光ピンセット技術により、国内外で、分子モーターの出す力は調べられてきた [Nishiyama *et al.*, *Nat Cell Biol* 2002; Schniter *et al.*, *Nat Cell Biol* 2000; Tomishige *et al.*, *Science* 2002]。しかしながら、複雑な非平衡環境にある細胞内で侵襲的な力測定法である光ピンセットの使用は難しいため、非平衡ゆらぎを解析する本研究の非侵襲力測定法が役立つと考えられる。本研究によって、非侵襲力測定法の妥当性を高めることが出来た。

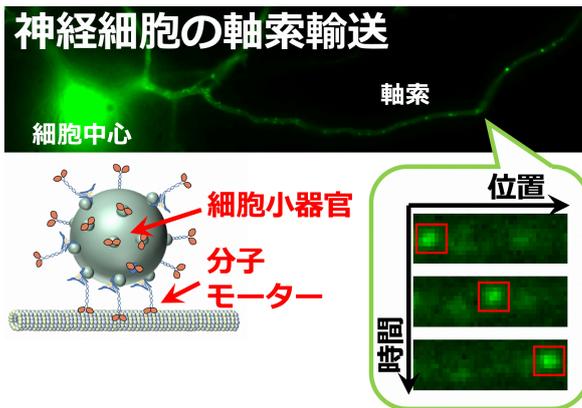


図 1：神経細胞内での細胞小器官輸送の蛍光観察

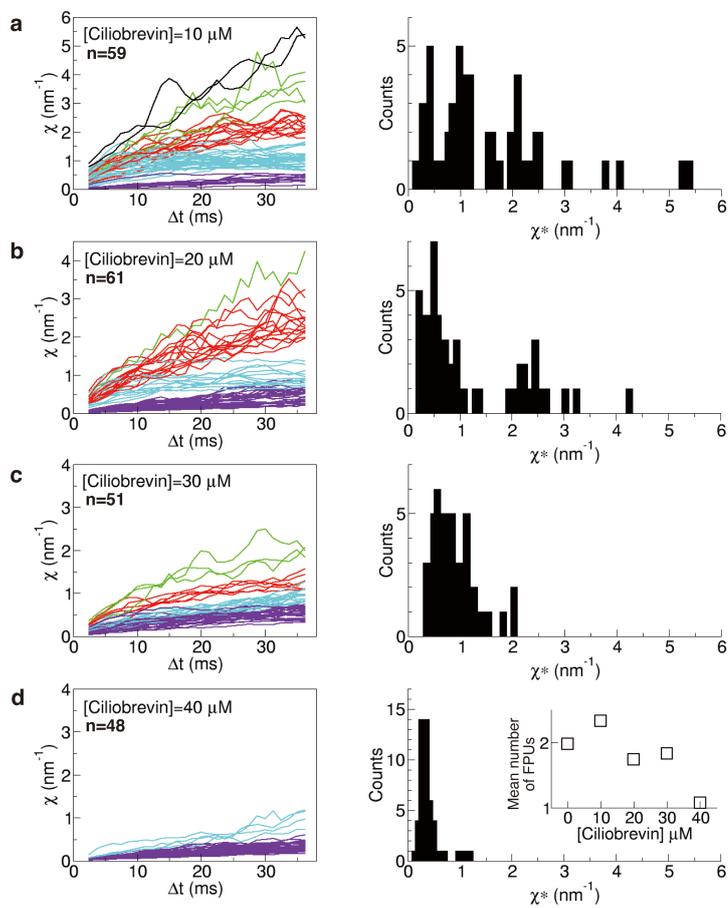


図 2：非侵襲力測定法の結果。分子モーター阻害剤の添加によりクラスター数 (=分子モーターの分子数に相当) が減少する様子が確認できる。[Hasegawa et al., Sci Rep 2019 より抜粋]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 K. Hayashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Application of the fluctuation theorem to motor proteins: from F1-ATPase to axonal cargo transport by kinesin and dynein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 1311-1321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-018-0440-5	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 -
1. 著者名 K. Hayashi, Y. Tsuchizawa, M. Iwaki and Y. Okada	4. 巻 29
2. 論文標題 Application of the fluctuation theorem for non-invasive force measurement in living neuronal axons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 3017-3025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E18-01-0022	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 -
1. 著者名 S. Hasegawa, T. Sagawa, K. Ikeda, Y. Okada, and K. Hayashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using fluctuation unit.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41458-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kumiko Hayashi, Shin Hasegawa, Takashi Sagawa, Sohei Tasaki and Shinsuke Niwa	4. 巻 20
2. 論文標題 Non-invasive force measurement reveals the number of active kinesins on a synaptic vesicle precursor in axonal transport regulated by ARL-8	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 3403-3410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CP05890J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kumiko Hayashi, Shiori Matsumoto, Miki G. Miyamoto and Shinsuke Niwa	4. 巻 11
2. 論文標題 Physical parameters describing neuronal cargo transport by kinesin UNC-104	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 471-482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-019-00548-9	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21件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 林 久美子
2. 発表標題 蛍光プローブやナノ粒子を用いたタンパク質分子モーターの1分子観察
3. 学会等名 化学工学会 第50回秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 菜里, 丹羽 伸介, 林 久美子
2. 発表標題 遺伝性痙性対麻痺を引き起こす変異型ヒトKIF1Aの神経細胞内Run-time分布
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稗田 康洋, 佐川 貴志, 千葉 杏子, 林 久美子
2. 発表標題 ゆらぎを利用した非侵襲力測定の軸索輸送動画解析への応用
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 久美子, 長谷川 慎, 佐川 貴志, 田崎 創平, 丹羽 伸介
2. 発表標題 Non-invasive force measurement reveals the number of active kinesins on a synaptic vesicle precursor regulated by ARL-8
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 久美子
2. 発表標題 複数キネシン分子モーターによる協同的なアミロイド前駆タンパク質輸送
3. 学会等名 第37回認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kumiko Hayashi
2. 発表標題 Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using the fluctuation theorem
3. 学会等名 Asian Biophysics Association Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shiori Matsumoto, Kyoko Chiba, Shinsuke Niwa, Kumiko Hayashi
2. 発表標題 Run-time distributions of human KIF1A mutants in hippocampal neurons in relation to hereditary spastic paraplegia
3. 学会等名 Asian Biophysics Association Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin Hasegawa, Takashi Sagawa, Kazuho Ikeda, Yasushi Okada, and Kumiko Hayashi
2. 発表標題 Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using the fluctuation theorem
3. 学会等名 Biophysical Society 63rd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林久美子
2. 発表標題 複数分子モーターによる細胞内オルガネラ輸送：モーター数を数える
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kumiko Hayashi
2. 発表標題 Non-invasive measurement of force exerted by multiple motor proteins during the axonal transport
3. 学会等名 19th IUPAB congress and 11th EBSA congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kumiko Hayashi
2. 発表標題 Non-invasive force measurement using fluctuation for organelle transport in neurons
3. 学会等名 2017 Annual meeting of the Australian Society for Biophysics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林久美子
2. 発表標題 ゆらぎを利用した低侵襲な力測定による神経細胞オルガネラ輸送の解明
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kumiko Hayashi , Shin Hasegawa, Takashi Sagawa, Sohei Tasaki and Shinsuke Niwa
2. 発表標題 Non-invasive force measurement reveals the number of active kinesins on a synaptic vesicle precursor in axonal transport regulated by ARL-8
3. 学会等名 62nd Annual meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林久美子
2. 発表標題 神経細胞軸索輸送の分子モーターカウンティング
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 菜里, 千葉 杏子, 丹羽 伸介, 林 久美子
2. 発表標題 遺伝性痙性対麻痺を引き起こす変異型ヒトKIF1Aの運動特性
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 瞭, 品川 遼太, 佐々木 一夫, 丹羽 伸介, 林 久美子
2. 発表標題 KIF1A/UNC-104によるシナプス小胞前駆体輸送の数値モデル
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林久美子
2. 発表標題 ゆらぎを利用した低侵襲な力測定による神経細胞軸索輸送の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 直井拓磨, 名木野貴美子, 佐々木一夫, 丹羽伸介, 林久美子
2. 発表標題 分子モーターの軸索輸送速度の極値統計解析
3. 学会等名 第9回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林久美子
2. 発表標題 iPSニューロンのための物理解析、物理モデルのためのiPSニューロン
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumiko Hayashi, Miki G. Miyamoto, Shinsuke Niwa
2. 発表標題 Effect of the dynein inhibitor ciliobrevin on the number of force producing units transporting synaptic cargos
3. 学会等名 Biophysical Society 64th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiori Matsumoto, Kyoko Chiba, Shinsuke Niwa, Kumiko Hayashi
2. 発表標題 Motility characteristics of human KIF1A mutants in hippocampal neurons in relation to hereditary spastic paraplegia
3. 学会等名 Biophysical Society 64th Annual Meeting (国際学会)
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
研究分担者	角田 聡 (TSUNODA Satoshi) (00598857)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・客員准教授 (13903)	
研究分担者	佐川 貴志 (SAGAWA Takashi) (80749903)	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・研究員 (82636)	