

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22520

研究課題名(和文)3次元1分子計測法による核膜孔通過の交通ルールの解明

研究課題名(英文)3D single molecule imaging for elucidating traffic rules of translocation through nuclear pore

研究代表者

毛利 一成(Mouri, Kazunari)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：00567513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに細胞運命決定における確率性の存在が、ERK核移行におけるアナログ・デジタル変換機構に由来する可能性を見出しており、このメカニズムの解明に取り組んだ。上記スイッチ機構はERK核移行の協同性に由来すると考えられ、その証明には正確な細胞内分子濃度の定量化が不可欠である。既存手法に限界が見いだされたため、簡易に精度良い計測を行うための多点FCS法の検討を進めることで、細胞小器官内外を同時に計測可能な手法を開発し、具体的な適用に至った。この実態の解明のため細胞深部の核膜における内膜・外膜での1分子計測が可能な顕微鏡を構成し、ERKが核膜上に100ミリ秒程度滞在する様子を観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞運命決定におけるERKの制御機構に異常が生じた場合、細胞はがんなどの疾患に影響を及ぼすことが知られており、非常に重要なタンパク質である。細胞内の分子の制御機構の解明には生細胞での定量化技術が不可欠であるが、これまでは高価な装置が必要であった。本研究により計測精度に問題があった簡易な装置の手法を改善することで、新たに高精度な手法の提案に至った。全反射顕微鏡は従来細胞膜の1平面のみを観察する手法であったが、本研究で核膜の内膜外膜の2平面の同時観察が実現したため、核膜孔通過のみならずエンドサイトーシスなどの局所的な3次元動態観察など、複数の用途に応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that the existence of stochasticity in cell fate decision may arise from an analog-digital switch mechanism in ERK nuclear translocation. The above switch mechanism is thought to originate from the cooperativity in ERK transports. The accurate quantification of intracellular molecular concentrations is essential to prove the mechanism. Since the limitations of existing methods were found, we developed a method that enables simultaneous measurement inside and outside of cell organelles by a multi-point FCS method which can be used for simple and accurate measurements, and could apply this method to some situations. In order to elucidate the actual ERK transport mechanism, we constructed a microscope capable of single-molecule measurement at the inner and outer nuclear membranes in the deep part of the cell, and succeeded in observing ERK staying on the nuclear membrane for about 100 milliseconds.

研究分野：細胞生物学

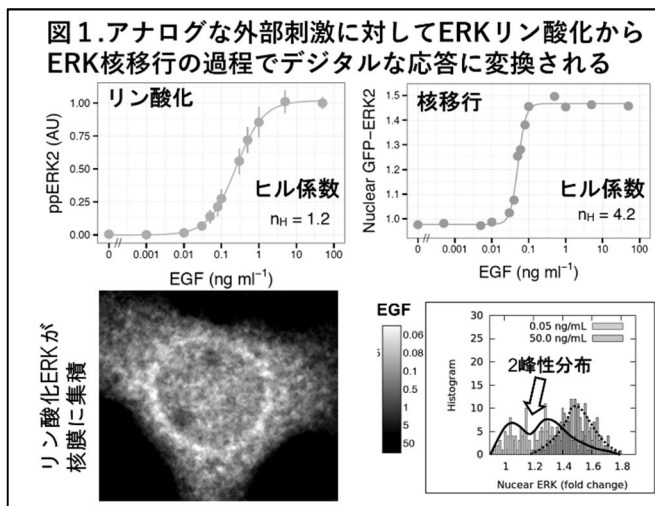
キーワード：FCS 1分子計測 ERK 核膜孔通過

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ERK の核膜孔通過の特異性：MAPK シグナル伝達において ERK の核膜孔通過は遺伝子発現誘導の律速段階であり、このプロセスの制御は運命決定に影響すると考えられる。実際に我々は運命決定における確率性の存在が(PLoS Comp Biol, 2013)、ERK 核移行におけるアナログ・デジタル変換機構に由来する可能性を見出している(図1、Nat. Commun, 2016)。

(2) 新規 FCS 法による絶対濃度の定量：このアナログ・デジタル変換において、EGF 濃度と核内の相対的 ERK 量の関係を用いたが、ERK 濃度と移行の絶対量の直接の対応が、酵素反応速度論の上では必須である。我々は共焦点顕微鏡のレゾナントスキャナで単一ラインを高速計測し、得られた画像の1画素時系列にウェーブレット変換を用いたノイズ除去法を適用することで、各画素の自己相関関数が正確に計算できる、高精度の多点 FCS を実現しつつある。これにより分子濃度・拡散係数・相互作用が推定できるようになる。この FCS と FRAP を組み合わせ、Importin では拡散による核膜孔への到達後すぐに流入する核膜孔通過現象が、ERK ではそれより移行が遅く通過の律速となる可能性が示唆されている。



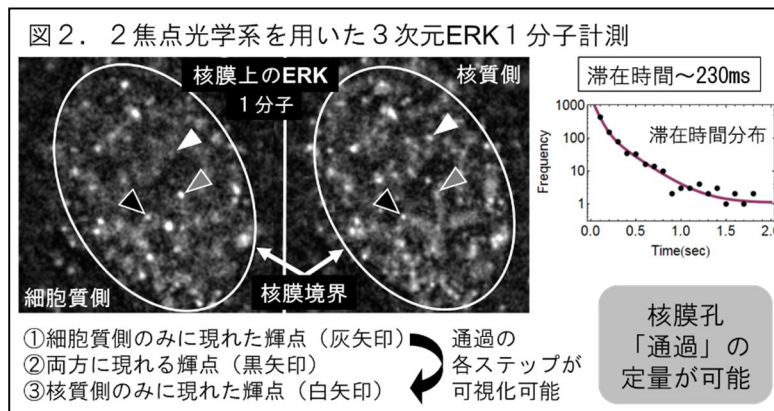
2. 研究の目的

核膜孔通過の交通ルールの解明：核膜孔複合体 (NPC) は30種類のタンパク (NUPs) からなる数百分子の複合体であり、単一細胞にわずか数千個程度しかない。この核膜孔1個を Importin や Exportin、小分子など様々なタンパクが毎秒数千個も通過し得るが、その通過調整が如何に成されるかという交通ルールは未知である。これまでに ERK による NUPs のリン酸化とそれとともに Importin の通過阻害が知られており (小迫, Nat. Struct. Biol, 2009) ERK のリン酸化を介した核膜孔の通過制御が示唆された。これらを踏まえ、ERK のリン酸化状態や通過阻害が起こる変異体による通過速度の推定により、ERK 自身の状態に依存した核移行制御機構に加え、ERK 基質のリン酸化による核移行速度を定量化することで、ERK の核移行における交通ルールを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) FCS によるキネティクスパラメータの推定：核膜孔の通過は、()細胞質から核膜への会合、()核膜孔への侵入、()核質への解離で起こり、各ステップの速度定数が通過全体に影響する。ERK 通過の協同性を検証するため、細胞質 ERK の濃度を FCS により推定する手法を構築した。本手法は様々な細胞内分子に適用可能であり、酵母のオートファゴソーム前駆体 (PAS) が液液相分離していることの証明のため細胞内の生理的条件下での液滴内外の FCS 計測を行うことにも成功している (Nature, 2020)。

(2) 核膜孔を通過する ERK の3次元1分子計測：上記現象を直接とらえるため、我々は全反射顕微鏡の斜光照明と2焦点光学系を用いて、核膜孔の細胞質・核質側を同時に1分子観察できる系を構築した(図2)。これにより ERK は核膜両面で複雑に拡散し、NPC 付近に数百ミリ秒滞在后、通過・解離が起こることが明らかになった。特に細胞内はオルガネラの影響で不均一な環境であり、拡散係数は時々刻々と変化していることが想定された。近年1分子計測に適用され多くの実績がある隠れマルコフモデルを用いることで統計解析を行い、それぞれの分子が拡散している状態を分類し、



いつどの時点でどれくらいの拡散係数で分子が運動しているのかを推定する手法を確立した。

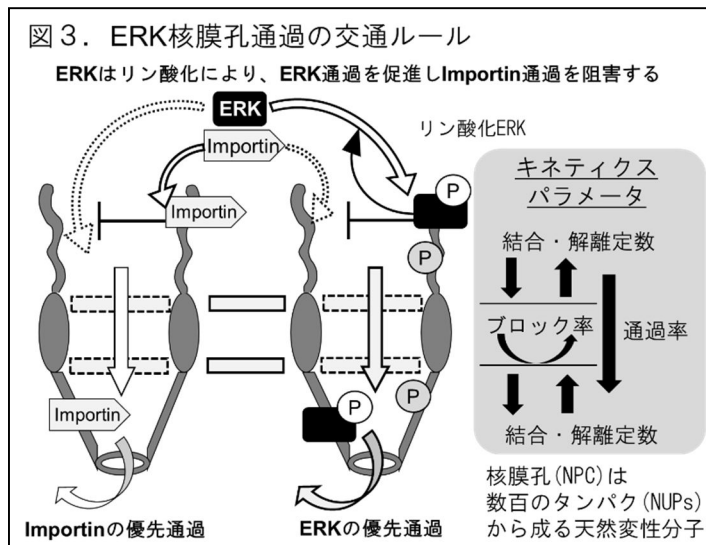
4. 研究成果

(1) 概要: ERK は細胞質内から核膜に到達し、しばらく滞在したのち核膜孔にたどり着いて核質内へと移行すると予想された。我々は細胞深部の核膜においても 1 分子計測が可能な顕微鏡を構成することで、実際に ERK が核膜孔を通過するまでに核膜上に 100 ミリ秒程度滞在する様子を観察することに成功した。これに基づき ERK 核膜孔通過の分子メカニズム解明を試みた。

(2) ERK 核移行の特徴: ERK は MEK によりリン酸化される基質であると同時に、核質内タンパクの多くをリン酸化する酵素としても働く。このとき (a) ERK 自身のリン酸化状態と、(b) 基質リン酸化能が核膜孔通過にどのように影響するのかは不明である。前者 (a) の解明のため、ERK 表面のアミノ酸に変異を入れ、核移行を定量化した。この結果 ERK リン酸化部位周辺の疎水性残基や、DNA 結合に関与する正電荷部位を変異させたとき核質への移行が阻害された。疎水性残基に電荷を持たせると細胞質への排出が促進された。この結果、ERK 表面の疎水性残基と結合対象の相互作用が移行と排出に関わることが示唆された。後者 (b) の解明のためには、ERK 上流のシグナル伝達経路に依存しにくい実験系の構築が必要となった。このため、MEK のリン酸化酵素 Raf にエストロゲン受容体部位を融合し、人工的に MEK リン酸化が誘導可能な実験系を細胞内に構築した。これに阻害剤を組み合わせることで、ERK の常時リン酸化状態、MEK 阻害剤による ERK のリン酸化阻害状態、ERK 阻害剤による ERK 基質のリン酸化阻害状態の 3 種の条件で核移行実験を行った。このとき核移行速度と分子濃度の関係性から、協同性の有無が推定できる。この結果、ERK の協同的な輸送には ERK 自身のリン酸化と基質のリン酸化の両方の機能と疎水性相互作用が必須であることが示唆された。

(3) 国内外における位置づけとインパクト: 本研究を遂行するにあたり、細胞内タンパク質濃度や拡散係数の正確な定量化が必要となった。これを実現するための既存手法である、共焦点顕微鏡を用いた FCS や、FCS を画像解析により実現する RICS は、高価な装置の必要性や褪色の影響、細胞内部の構造に依存した不正確さなどがあり、そのまま適用することが困難であった。このためより簡易に精度良い計測を行うため、多点 FCS 法の検討を進めることで、細胞小器官内外を同時に計測可能な手法が開発でき、具体的な適用に至った (Nature, 2020)。ERK 核膜孔通過は細胞運命決定に関わる重要な現象であるが、核膜孔周辺におけるそのスイッチ機構解明は、定量化技術の限界により困難であった。本研究により ERK 自身のリン酸化や構造変化のほかに、核膜孔などの基質リン酸化が、スイッチとして必要であることが明らかとなった。スイッチ機構の証明には、ERK 核移行の協同性を定量的に示すことで初めてわかることであり、本研究で得られた技術は様々な研究に応用できると期待される。

(4) 今後の展望: ERK の核膜孔通過の協同性は、ERK 濃度に対する通過速度の依存性が、線形な状態から非線形な状態に変化することを意味している。より詳細な現象の理解のために、全反射顕微鏡による 1 分子計測も進めており、実際に ERK が核膜上を拡散する様子が観察されている。この動態は非常に複雑なため、定量化のための手法の開発が必要であり、隠れマルコフモデルを用いた拡散係数の推定を行っている。これによりさらに詳細なキネティクスが期待できる (図 3)。



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 Fujioka Yuko, Alam Jahangir Md., Noshiro Daisuke, Mouri Kazunari, Ando Toshio, Okada Yasushi, May Alexander I., Knorr Roland L., Suzuki Kuninori, Ohsumi Yoshinori, Noda Nobuo N.	4. 巻 578
2. 論文標題 Phase separation organizes the site of autophagosome formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 301 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-1977-6	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 毛利 一成
2. 発表標題 走査型共焦点顕微鏡による1分子計測法とその応用
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛利 一成
2. 発表標題 分子モーター1分子動態追跡を目指したRevFCSの開発と応用
3. 学会等名 第10回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mouri Kazunari, Okada Yasushi
2. 発表標題 Single particle motions of axonal proteins captured by a confocal laser scanning microscopy
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛利 一成、岡田 康志
2. 発表標題 A new FCS method for characterizing protein functions in living cells using a confocal laser scanning microscopy
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛利 一成、岡田 康志
2. 発表標題 共焦点レーザー走査型顕微鏡で捉えた軸索タンパクのブラウン運動
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会 年会
4. 発表年 2019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