

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18524

研究課題名(和文) 分子モーターの力応答を通じた協同的な輸送現象の基礎づけ

研究課題名(英文) In vitro reconstitution approach for understanding the cooperative transport by molecular motors

研究代表者

鳥澤 嵩征 (Torisawa, Takayuki)

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

研究者番号：60749406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が生命活動を維持するためには適切なタイミングおよび場所における物質輸送が不可欠であり、この輸送現象は分子モーターと呼ばれるタンパク質酵素の細胞骨格フィラメントに沿った運動によって主に担われている。本研究において、マイナス端方向への輸送に寄与しているモーターである細胞質ダイニンが持つ非対称な力学応答が活用されることによって、一次元拡散を利用した一方向性輸送が行われている可能性が初めて示された。

研究成果の概要(英文)：Intracellular transport is an essential process for living cells. In eukaryotic cells, the transport is mainly mediated by the cooperative movements of molecular motors, enzymes which convert chemical energy from ATP hydrolysis to mechanical motion, along cytoskeletal filaments, such as actin and microtubule. In this study, it is revealed that cytoplasmic dynein, which is responsible for the retrograde transport along microtubules, achieves the unidirectional transport through the rectification of one-dimensional diffusion along microtubule.

研究分野：生物物理学

キーワード：ダイニン キネシン 細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

(1) 協同現象としてみた細胞内輸送

細胞が生命活動を維持し続けるためには、オルガネラの適切な配置、外部から取り込んだ物質の輸送、また RNA の輸送など、絶え間ない細胞内輸送が重要な役割を担っている (図 1)。これらの輸送の担い手は、ATP の加水分解エネルギーを利用して細胞骨格上を運動する「分子モーター」とよばれる酵素であり、その生化学的な性質や、一分子の運動機構について活発な研究が行われてきた。

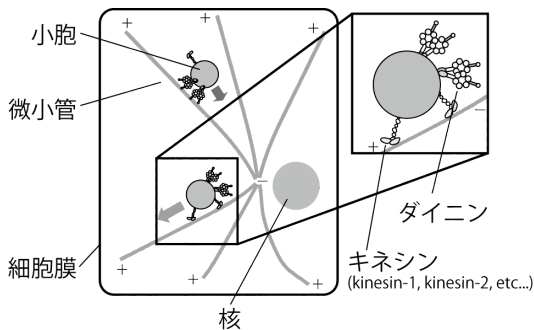


図 1. 微小管を利用した細胞内輸送の様子

一般に細胞の周縁部に向かう輸送はキネシン、中心部に向かう輸送はダイニンが担っている。図中のプラスとマイナス記号は微小管の極性を示す。

細胞内輸送においては、数個から十数個の比較的少数の分子が同時に荷物に結合して輸送を行っている。このような数のスケールは、生化学的実験が対象とするマクロな分子数と一分子の中間にあたる領域であり、マクロな現象では平均化されてしまう性質と複数分子の協同作用によって現れてくる性質が交差するミクロとマクロの中間的な階層と言える。細胞内輸送に代表される種々の細胞内現象は、この中間層において生ずるものがほとんどであり、この階層における現象の理解は、生命現象を分子レベルから理解するにあたって避けられないものである。

複数分子が協同的に働く現象の理解においては、具体的な分子数と現象の諸性質の間の定量的関係を明らかにすることが重要である。分子数を厳密に制御した系で実験を行うことを可能にする技術は、DNA オリガミを用いたものが確立されていた。これによって、作製する構造体 (DNA origami nanotube) 中に特異的に分子を結合できるオリゴ DNA を組み込み、タンパク質側にタグを付加することと組み合わせることで厳密に数を制御して分子モーターの挙動を観察することが可能となる。研究開始前年の 2014 年に代表者が発表した研究では、ダイニンが 2 分子以上集まった段階で運動が協同的に変化する様子が捉えられており、一種類のモーターだけで構成される系であっても、比較的少数個の分子数のゆらぎが運動を大きく変化させうということが示されている。このように実験的な困難が解消されつつあることで、協同現象にボトムアップ的にアプローチしやすい状況が醸成されつつあったことが研究計画の背景にあった。

(2) 複数分子の協同に重要な性質の計測

研究開始段階までの種々の研究によって、分子モーターの運動の速度や力の大きさなど、単分子のモーターの基本的な性質、また *in vitro* motility assay (ガラス表面上に固定されたモーターによるフィラメントの滑り運動を観察する手法) などによる多分子条件下での運動性質に関する知見は数多く得られていた。これら過去の知見に加えて、複数のモーターが一つの荷物を運ぶ際に重要になる「瞬間的に印加された力に対する応答の性質」について実験・解析を行うことで、分子間の協同作用の実体と性質についてさらなる知見を得ることができると期待された。

2. 研究の目的

生命現象の細胞レベルでの維持には、細胞内部で種々の物質が適切に輸送されることが必要である。この細胞内輸送においては、複数の分子モーターが協同的に働いていることが知られており、運ばれるものに応じて結合するモーターが決まっている。結合モーターの多様性は、運動に速度や方向性やその転換の頻度などのバリエーションを生み出すが、個々のモーターの性質からボトムアップ的に多様な運動が生み出される仕組みを考察した研究はまだまだ多くはない。本研究では、モーターが多分子化した際に重要な役割を果たすと考えられる瞬間的にかげられた力に対する応答の計測、その性質を組み込んだ数理モデル化を通じて、一分子の性質から細胞レベルでの輸送現象を基礎付けることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光ピンセットを用いた力学応答計測

複数のモーター分子が協同的に働く場面では、力学的な相互作用が瞬間的に働く。このような状況を再構成し、瞬間的に印加される外力がモーターの運動に関わる性質、具体的にはフィラメントとの結合強度にどのような影響を与えるかを光ピンセットを用いて調べた。

(2) 運動速度分布の分子数に対する依存性

一分子から数分子のオーダーにおけるモーターの運動速度分布群の解析・比較を行った。分子数を变化させた状況に加えて、制御タンパク質が結合することによって一分子でも一方向に運動できるようになった状態での運動も解析の対象とした。具体的には、ダイニンの制御タンパク質として知られているダイナクチン複合体とアダプタータンパク質 (Bicaudal D および Hook1) が結合した細胞質ダイニンの運動を観察・解析した。

(3) 細胞内輸送の定量的観察

分子モーターによる *in vivo* での細胞内輸送の観察を行った。対象とした細胞は、HEK293 細胞、HeLa 細胞、NIH 3T3 細胞であり、以下に述べる 2 つの方法を用いて輸送を観察した: i) Rab タンパク質ファミリーに GFP を付加することによる

観察, ii) 細胞に取り込ませた蛍光ポリスチレンビーズの観察.

#### (4) 細胞抽出液からの精製小胞の細胞外観察

(3)-ii で確立した細胞への蛍光ポリスチレンビーズ導入法を用いて, 大量培養した細胞にビーズを導入し, それを精製することによって *in vitro* での小胞の運動観察を試みた.

#### (5) 数理モデルの構築

実験で得られた知見を元に, 単分子では拡散的なモーターが複数化することによってどのように一方向性の運動を達成するのかを説明する数理モデルの構築を試みた.

### 4. 研究成果

#### (1) 分子モーターの力学応答特性

光ピンセットによって計測した細胞質ダイニン分子の微小管に対する結合の応答性から, i) ダイニンは微小管のマイナス端 (通常ダイニンの進行方向と考えられている向き) に対する力よりもプラス端方向に対する力の方がより強い結合を示す (非対称な方向依存性), ii) マイナス端およびプラス端方向のどちらの方向の力であっても, 印加される力が強い方が (実験を行った力の大きさの範囲内では) 微小管に対してより強い結合を示す, ということが明らかとなった (図 2). なお, ダイニンと逆方向への輸送を担うモーターとして, 初期エンドソーム輸送に関わると言われている KIF16B を精製して同様の観察・解析を試みたが, 微小管に対する結合頻度が低く, 統計的に十分な量の結合事象を観察することができなかった.

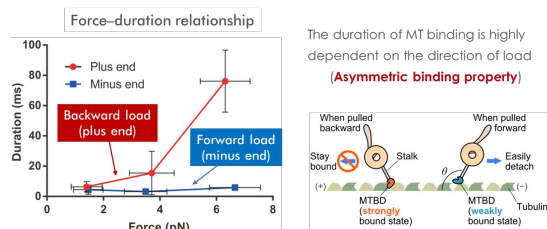


図 2. ダイニンの方向依存的な負荷応答

(左) 細胞質ダイニンの微小管に対する結合力の強さと負荷の大きさの関係を示すグラフ. 赤色で示されるデータが微小管のプラス端方向, すなわちダイニンにとっての後方に負荷がかかったときのデータであり, 青色が前方負荷存在時の結合力を示す. (右) 負荷応答計測の結果をまとめた概略図. 後方に引かれた際には微小管の上に留まるのに対して, 前方に引かれた際には容易に解離するという応答性を表す.

#### (2) 一方向性運動に対する拡散運動の寄与

細胞質ダイニンの運動に特に着目し, 一分子, 2分子, 4分子, 8分子のダイニンの運動を観察・解析し, その運動速度分布を比較した. 多分子化での輸送は DNA オリガミチューブを用いて行った. 細胞質ダイニンは単分子では微小管上を

拡散的に運動するが, DNA オリガミなどの構造体上で多分子化すると, 一方向的な運動を行うことが知られている. 分布比較の結果, 拡散的な一分子のダイニンの速度分布において認められる速い速度領域における分布の裾 (微小管上の疑似次元拡散運動によるものと考えられる) が, 一方向的な運動を行う場合においても残っていることがわかった (図 3). このことは, 拡散から一方向性へと運動のモードが大きく変わったように見える場合であっても, 拡散的な振る舞いに起因する成分が残っていることを示唆するものであった. また, この速い速度領域における分布の裾の存在および一分子の分布との一致については, 制御タンパク質が結合することで一方向性の運動が誘起された一分子の細胞質ダイニンの運動においても同様に観察された.

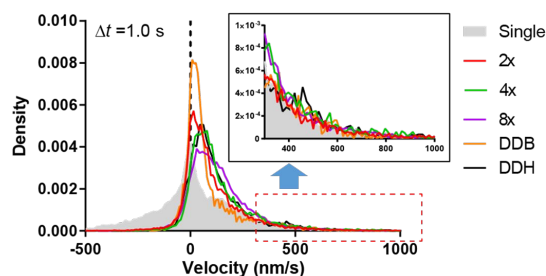


図 3. 種々の条件におけるダイニンの速度分布

各種の条件下におけるダイニンの運動速度分布. "Single" は単分子の運動, "2x", "4x", "8x" はそれぞれ DNA origami tube 上で多分子化したダイニンの運動であり, 数字は分子数を表す. "DDB" および "DDH" はダイニン, ダイナクチンとアダプタータンパク質の複合体 (ダイニン一分子でも連続的に一方向に運動できる状態) の速度分布を表し, B は BicaudalD, H は Hook1 というアダプタータンパク質を表す.

#### (3) 一方向性運動の数理モデル

負荷応答という一分子が持つ性質から多分子の一方向輸送に見られる拡散成分を説明するモデルを確立した. このモデルにおいては, 後進方向の負荷に対して働く強結合誘起という負荷応答性があれば, 拡散運動を整流することで一方向性の運動を生み出すことが出来ることが明らかとなった.

### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 1 件)

鳥澤嵩征, 古田健也, 豊島陽子. "細胞質ダイニンの運動制御機構" 生物物理 55(2), 127-132, 2015 [査読あり]

(学会発表) (計 3 件)

Takayuki Torisawa. "Diffusive Component in Directed Transportation by Cytoplasmic Dynein", 2017.10.30, International Workshop Dynein 2017, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県) [招待講演・査読なし]

鳥澤嵩征. "Diffusive Component in Directed Movements of Human Cytoplasmic

Dynein-1“ 金沢大学理工研究域公開セミナー, 2017.8.28, 金沢大学自然科学5号館 第5講義室 (石川県) [招待講演・査読なし]

Takayuki Torisawa, Ken'ya Furuta, Kazuhiro Oiwa, Hiroaki Kojima. “Diffusive Component in Directed Movements of Cytoplasmic Dynein” 第54回日本生物物理学会年会, 2016.11.2, つくば国際会議場 (茨城県) [ポスター・査読なし]

## 6. 研究組織

### 研究代表者

鳥澤 嵩征 (TORISAWA Takayuki)

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

研究者番号: 60749406