

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19509

研究課題名(和文) 蛍光ナノ粒子を用いた細胞内人工複合体構築と細胞機能制御への挑戦

研究課題名(英文) Attempts for generating intracellular artificial protein complexes and modulating cellular functions with fluorescent nanoparticles

研究代表者

畠山 裕康 (Hatakeyama, Hiroyasu)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00619067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光ナノ粒子である量子ドットを核として複数の異なるタンパク質を集積させた人工複合体を細胞内において構築できるナノ材料を創成し、これを用いた細胞機能制御の可能性を探索することを目的とした。そのために、これまでに独自に開拓してきた手法を応用したナノ材料の構築と細胞内における一分子挙動の計測を行った。その結果、特定の条件下では研究開始時に目標とした細胞機能制御が可能となる可能性を示唆したものの、一般的な手法として確立することは困難であった。今後最適化を図る必要性があるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来の手法は細胞レベルにおける比較的多数の分子群を対象とした細胞機能制御技術に対し、分子・超分子複合体レベルにおける比較的少数の分子群を対象とした技術を提供することを目的として開始した。残念ながら一般的な手法としての展開には至らなかったが、特定の条件下では目的を達成することに成功し、将来の展開に向けた可能性として提示することはできた点において一定の成果は得られたものと考えられる。さらに研究を展開することによって、細胞機能の計測と制御のための新規技術の提示に向けた最適化を行う必要性があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was that to develop a Quantum dot-based nano-material which can establish artificial protein complexes within a cell and to modulate cellular functions with the nano-material. To achieve this, we attempted to generate such nano-materials by applying our approaches, which had previously developed, and measure intracellular single molecule behavior of the Quantum dots. Although we succeeded in modulation of cellular functions with such nano-materials under a certain condition, it was hard to establish as a general method. Further optimization must be necessary for achieving the aim.

研究分野：細胞生理学

キーワード：量子ドット

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

報告者らは本研究開始時点までに、きわめて安定で明るい蛍光ナノ粒子である量子ドットを用いて、細胞内部で起こるタンパク質の一分子挙動を高精度にナノ計測できる独自の手法を複数開拓していた(図1)。そして、特にインスリンや運動に依存した血糖降下作用を直接担う糖輸送担体 GLUT4 の細胞内輸送制御システムに注目した研究を進め、従来の手法では見出すことのできなかった多数の知見を得ることに成功していた。特に、GLUT4 輸送全体を理解する上で鍵となる制御過程の同定に成功し、そのひとつであるエンドソームからトランスゴルジ網への逆行性輸送の破綻が2型糖尿病に特徴的なインスリン抵抗性の発症に深く関与することを見出した。この過程は GLUT4 のみでは完遂されず、Vps10p ファミリーソーティングレセプターである sortilin やレトロマー複合体、アクチン重合、モータータンパク質、繫留タンパク質、リン脂質二重膜など、非常に多岐にわたる分子群が一過的に構成する複合体(超分子複合体)による局所的な制御が極めて重要である。このような超分子複合体の挙動と機能についてより明確にすることができれば GLUT4 輸送制御様式とその破綻によるインスリン抵抗性の発症機序についてより詳細な知見を得ることができると期待されるが、このような解析は一般に困難である。一方で報告者らは、タグタンパク質とエレクトロポレーション法を組み合わせることによって、極めて容易に効率よく細胞内の任意の分子を量子ドット標識できる画期的手法を開拓していた。この手法を応用し、表面に複数種の低分子リガンドを多数持つ量子ドットを作製することによって、量子ドットを核として異なる複数のタンパク質を集積させた人工複合体を構築できる可能性を着想した(図2)。細胞内においてこのような人工複合体を構築することができれば、それは GLUT4 輸送を制御する超分子複合体の機能をより詳細に解析するための最適なツールとなり得るのではないかと考え、本研究構想に至った。

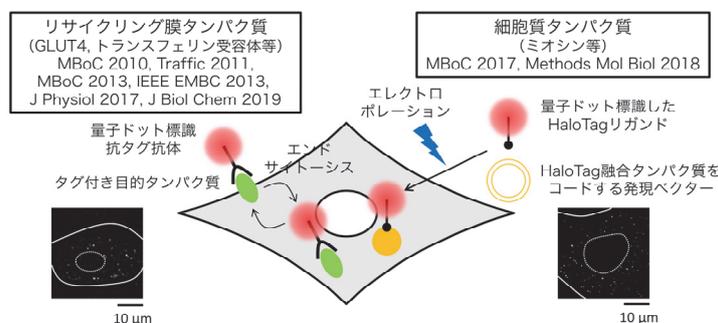


図1 研究開始時点までに開拓していた細胞内への量子ドット導入法

申請者らは本研究開始時点までに、細胞膜透過能と目的分子との特異的結合能を持たない量子ドットへの工夫により、容易かつ低毒性に細胞内分子を標識できる複数の手法を開拓していた。リサイクリング膜タンパク質を標識できる手法(左)では特にインスリン応答性糖輸送担体 GLUT4 の細胞内輸送制御システムについて、従来の手法では得ることのできなかった多数の知見を提示していた。また、細胞内部で輸送の完結するタンパク質を標識できる手法(右)は、計測対象タンパク質を任意に選択することが容易となる画期的手法である。

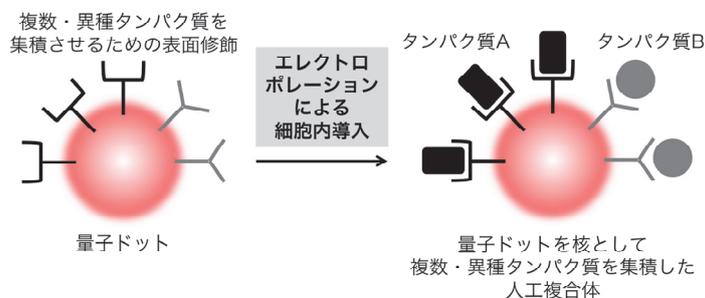


図2 本研究のねらい・方法

本研究では、量子ドットを核として複数の異なるタンパク質を集積させた人工複合体を細胞内に構築し、その挙動を計測するとともに細胞機能を制御できる可能性を探索することを目的とした。そのために、量子ドット上に複数の異なるタンパク質を集積させるための表面修飾を施し、細胞内へ導入した上でその挙動の計測を行った。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光ナノ粒子である量子ドットを核として複数の異なるタンパク質を集積させた人工複合体を細胞内において構築できるナノ材料を創成し、それを用いた細胞機能制御の可能性を探索することを目的とした(図2)。

3. 研究の方法

報告者らは研究開始時点までに、それ自体には「細胞膜透過能」と「目的分子との特異的結合能」のない量子ドットに工夫を施すことによって、細胞「内部」のタンパク質を量子ドットで標識してその一分子挙動を高精度にナノ計測できる独自の実験系を複数確立し、従来全く得ることのできなかった多数の知見を提示することに成功していた。そのうちの一つに、報告者らは「低分子リガンドと特異的に結合する HaloTag 等のタグタンパク質」と「エレクトロポレーション法」を組み合わせた手法を着想し、量子ドットを極めて容易かつ効率的に細胞内に導入して目的タンパク質を標識できる画期的な手法の開拓に成功した。この手法では、量子ドット上に結合させる HaloTag リガンド数は調節可能であり、また、複数種の異なるリガンドを異なる混合比にて量子ドットに結合させることも可能であると期待できた。そこで本研究では、報告者らが開拓していた手法を応用することによって、まず予備的な実験として、多数の HaloTag リガンドを持つ量子ドットを作製し、これを2種類以上の HaloTag 融合タンパク質を発現させた細胞内に導入した。これによって、これら HaloTag 融合タンパク質を個別に発現させたときと細胞内における挙動に差異があるか計測した。次に、量子ドット上に HaloTag リガンドと SNAPtag リガンドとを異なる量比で結合させ、これを HaloTag 融合タンパク質および SNAPtag 融合タンパク質を発現させた細胞内に導入して挙動を計測することにも挑戦した。

4. 研究成果

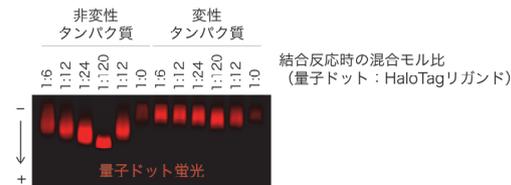
まず、表面に第一級アミンを持つ量子ドットと NHS 活性エステルを持つ HaloTag リガンドを混合することによって、HaloTag リガンド結合型量子ドットを作製した。このとき、量子ドットと HaloTag リガンドとの混合比をさまざま変化させることによって、さまざまな比率で HaloTag リガンドの結合した量子ドットを作製した。アガロースゲル電気泳動により、混合するモル比によって量子ドット上に結合する HaloTag 融合タンパク質の量を調整可能であることが示唆された(図3A)。

このようにして作製した HaloTag リガンド結合型量子ドットを、2種類の HaloTag 融合タンパク質を発現させた細胞内にエレクトロポレーション法により導入した(図3B)。ここでは、発現タンパク質として、細胞内輸送を制御する高次ナノシステムの一つとしてタンパク質・膜脂質等と時空間的に相互作用しながらエンドソームとトランスゴルジ網の間の逆行性輸送を調節するレトロマー複合体の構成因子 Vps35 と、アクチン線維上を挙動するモータータンパク質である myosin Vb のふたつを選択した(図3C)。これら2つのタンパク質はいずれも GLUT4 挙動制御に関与し、特に Vps35 (レトロマー複合体)は、成熟した GLUT4 輸送制御システムを構築する重要な因子である。これらのタンパク質をコードする発現ベクタと1モルの量子ドットに対して120モルの活性化 HaloTag リガンドを添加して作製した HaloTag リガンド結合型量子ドットを細胞内にエレクトロポレーションし、翌日量子ドットの挙動を計測したところ、HaloTag-Vps35 を単独で発現させた細胞に比べ HaloTag-Vps35 と HaloTag-myosin Vb の両者を発現させた細胞では活発な挙動が観察され、想定したような人工複合体が構築されていることが示唆された(図3C)。そこで GLUT4 の局在に影響があるかどうか調べたが、明確な局在の変化を見出すことはできなかった。おそらくは導入した HaloTag 結合型量子ドットのみで局在を変化させるまでの量が存在しなかったためであると想定される。

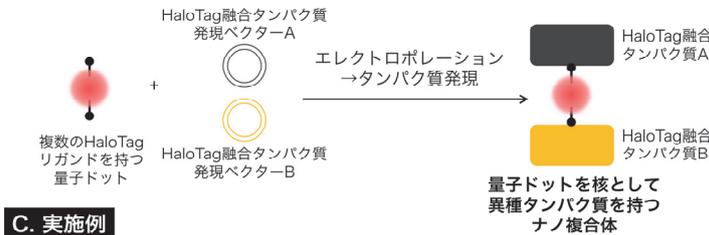
しかし、このような量子ドットを用いることによって挙動には影響を及ぼすことができる可能性が示唆されたため、引き続き量子ドット上に HaloTag リガンドと SNAPtag リガンドとを様々な量比で結合させ、HaloTag 融合タンパク質と SNAPtag 融合タンパク質の両者を発現させた細胞内に導入することによって、より実験者によるコントロールの可能な人工複合体構築を目指した。ここでは発現タンパク質として、アクチン線維および微小管上を挙動するモータータンパク質である myosin と kinesin、特に myosin Vb と KIF-5A を選択した。各種発現ベクタと様々な量比で HaloTag リガンドおよび SNAPtag リガンドを結合させた量子ドットを細胞内に同時にエレクトロポレーションし翌日に量子ドット挙動を計測したが、残念ながらすべての量子ドットの間には明確な挙動の差異は見出されなかった。また、予めリポフェクションにより HaloTag 融合タンパク質と SNAPtag 融合タンパク質の発現ベクタを遺伝子導入した細胞に量子ドットを導入することによって、細胞内における特異的結合の確率の上昇を試みたが、やはり明確な挙動の差異は見出されなかった。

上記のように、現在までに想定していたような細胞機能の制御には至っていない。ただし、特定の組み合わせにおいては挙動の変動を誘導することが可能であることが示唆されたため、より詳細に条件設定を行うことによって当初の目的へとアプローチすることは可能であるものと考えられる。解決すべき点としては、単一量子ドット上に結合している各種リガンドの数およびその割合を直接的に知ることが現時点ではできないこと、および細胞内において想定するような複合体が構築されているか確かめることが非常に困難であること、の2点がある。こ

A. HaloTagリガンド結合型量子ドットの作製



B. 量子ドットを核とする人工複合体の構築



C. 実施例

レトロマー複合体

- 細胞内輸送を制御する高次ナノシステムの一つ
- タンパク質間相互作用や膜脂質との相互作用がオルガネラ近傍のアクチン重合と協調的に制御される
- GLUT4輸送制御における最重要過程に寄与

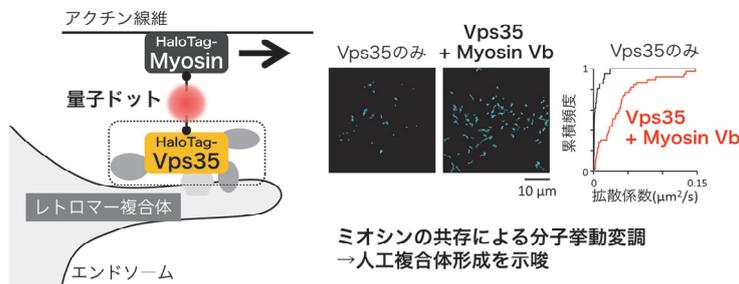


図 3 HaloTag リガンド結合型量子ドットによる細胞内分子挙動の変調

(A) 第一級アミンを持つ量子ドットと活性エステルを持つ HaloTag リガンドを混合することによって HaloTag リガンド結合型量子ドットを作製できる。このとき、両者のモル比を様々変化させることで、単一量子ドット上の HaloTag リガンド数を調整可能。ここには様々なモル比で調整した HaloTag リガンド結合型量子ドットを HaloTag 融合タンパク質と混合し、アガロースゲル電気泳動にて分離して量子ドット蛍光を観察した例を示す。より泳動度の大きいものは、より多くの HaloTag 融合タンパク質と結合した量子ドットを示す。(B) 多数の HaloTag リガンドを持つ量子ドットを複数種の HaloTag 融合タンパク質をコードする発現ベクターとともに細胞内に導入することによって、量子ドットを核として異種タンパク質を集積させた人工複合体を調整できると考えられる。(C) ここでは HaloTag-Vps35 と HaloTag-myosin Vb を発現させた細胞の例を示す。Vps35 のみを発現させた細胞に比べ、myosin Vb を同時に発現させた細胞では挙動が大きく異なる様子が観察される。図には示さないが、myosin Vb を単独で発現させた場合に比べると挙動は抑制されており、2つのタンパク質を共存させた場合の挙動はそれぞれ単独で存在する場合の中間的な状態と考えられる。この例では人工複合体の作製はできているものと想定されるが、残念ながら細胞機能制御までは至らず、また他の例において明確な挙動変化を見出すことはできなかった。

これらの点に改善を加えていくことによって、ナノ材料によって分子・超分子複合体レベルにおける少数の分子の機能を制御し、細胞機能計測と制御に資する新規技術を提示できる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。