

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19770161

研究課題名(和文) モータータンパク質の運動特性が細胞内膜輸送に果たす役割

研究課題名(英文) The roles of motile properties of motor protein on intra-cellular membrane transportation.

研究代表者

富永 基樹 (TOMINAGA MOTOKI)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・研究員

研究者番号：50419892

研究成果の概要：

本研究では動・植物細胞における膜輸送の駆動力であるミオシンの分子機能を、分子生物学およびライブイメージングの手法を用い解析した。

動物において、分子内折りたたみ構造形成能を阻害した変異ミオシン Vb を HeLa 細胞で発現させることによって、膜交通制御における折りたたみ構造の役割を明らかにした。

植物において、全植物ミオシンのクローニングと発現に成功した。ミオシンメンバー間での広範な機能分担が明らかとなり、植物独自のユニークな輸送制御システムを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	0	2,500,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動

1. 研究開始当初の背景

真核生物の膜交通は、非常に複雑かつ高度に制御されたシステムである。近年、多種多様なモータータンパク質が方向性を持った能動的駆動力としてのみならず、交通網の維持や制御に深く関与していることが明らかになりつつある。しかしながら、モーターが持つ分子レベルでの運動機能がどのような仕組みで細胞レベルでの複雑な膜選別機構を制御しているかに関してはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 細胞辺縁の膜交通における、ミオシン Vb の分子内構造変化による制御機構。

ミオシン V は主に細胞内の小胞輸送に関与し、複雑なメンブレントラフィックにおける能動的輸送の一端を担っている。細胞内での複雑な輸送を担うためには高度な運動制御機構が存在するはずである。しかしながらそのメカニズムに関してはほとんど明らかになっていない。近年、*In vitro*での解析より、モータードメインと球状尾部が結合することによる折りたたみ構造が観察されている。

この構造状態の変化が細胞内での制御に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、その実例は現在のところ発見されていない。一方、コイルドコイル形成領域（ストーク）の一部を削除すると折りたたみ構造の形成が阻害されることから、折りたたみ構造形成にストークの長さが重要であることが報告されている。

ミオシン Vb は、トランスフェリンレセプターを含む小胞に結合し、トランスフェリンのリサイクリング過程における細胞縁でのエンドサイトーシス経路に関与している。通常ミオシン Vb が運搬する小胞は、細胞内全域、特に核周辺に分布している。本研究では、ストーク長を短くし、折りたたみ構造形成を阻害した変異ミオシン Vb を HeLa 細胞で発現させることによって、膜交通制御における折りたたみ構造の役割を明らかにしようと試みた。

(2) ミオシンによる植物特異的膜交通制御機構の解析。

植物細胞で明らかになりつつある複雑な膜交通や、細胞小器官特異的な運動の制御には、モータータンパク質の介在が不可欠である。微小管をメインレールとし、多種多様なモーターが関与している動物細胞に対し、植物細胞ではアクチンフィラメントがメインレールとなっている。ところが関与するモーターは植物特異的ミオシン VIII と XI の 2 クラスのみである。ただ、両者とも多数のメンバーを擁しており、ミオシン VIII において 4 メンバー、ミオシン XI に至っては 13 のメンバーが存在する（シロイヌナズナ）。メンバー毎の運動や制御機能の多様性が、植物の膜交通を制御している可能性が考えられる。植物特異的なミオシンによるユニークな輸送システムを、分子から細胞レベルまで解析することにより、真核生物に共通するモーター輸送の基本原則を抽出する。

3. 研究の方法

(1) 細胞縁の膜交通における、ミオシン Vb の分子内構造変化による制御機構。

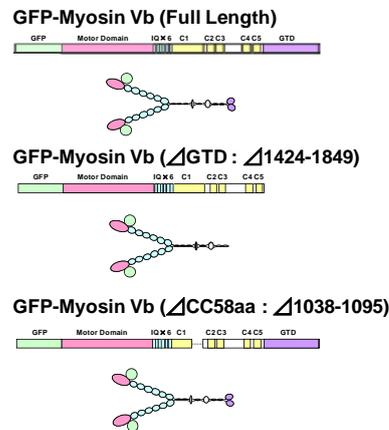
①ヒトミオシン Vb の全長 cDNA は、かずさ DNA 研究所より取り寄せた。この cDNA を元に、カーゴ結合ドメインやモータードメインを欠如したもの、及びストークを短縮した変異ミオシン Vb を作製した。

②細胞内イメージングのために、ミオシン運動能に影響がないとされる N 末端に GFP を融合した。GFP-ミオシン Vb および truncated 変異体を HeLa 細胞で一過的に発現させた。その局在や運動を、ニポウディスクによる高速型共焦点顕微鏡で観察した。

③ミオシン Vb はトランスフェリンレセプターを介した、トランスフェリンのリサイクリ

ングに関与している。変異ミオシン Vb がこのリサイクリングに及ぼす影響を、パルスチェイス法によって解析した。具体的にはミオシン Vb や変異体を発現する細胞内に (Alexa Fluor 594)-transferrin を一過的に取り込ませ、その後のリサイクリング過程を追跡した。

Truncated mutants of myosin Vb

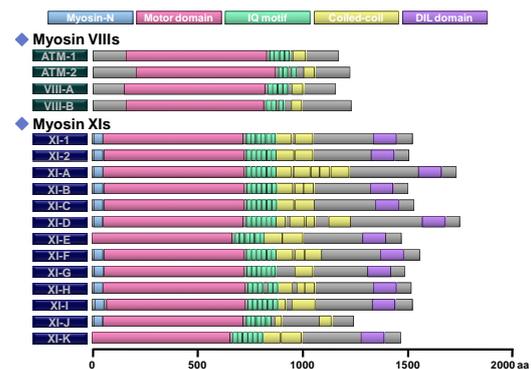


(2) ミオシンによる植物特異的膜交通制御機構の解析。

①植物ミオシン全長のクローニング。

シロイヌナズナで発現するミオシンメンバー全 17 種の“完全長 cDNA クローニング”を行った。結果、いくつかのミオシンメンバーにおいて、データベースの予測配列とは異なった配列を持つものが明らかとなった。細胞内イメージングのため、ミオシンの運動に影響がないとされる N 末端に GFP を融合した。

Plant Myosin members in *Arabidopsis thaliana*



②シロイヌナズナプロトプラストで GFP-myosin を一過的に発現させ、局在や運動を可視化した。また、RFP 系の蛍光タンパク質を融合した各種のオルガネラマーカとの共発現を行い、ミオシンが結合しているオルガネラの同定を試みた。

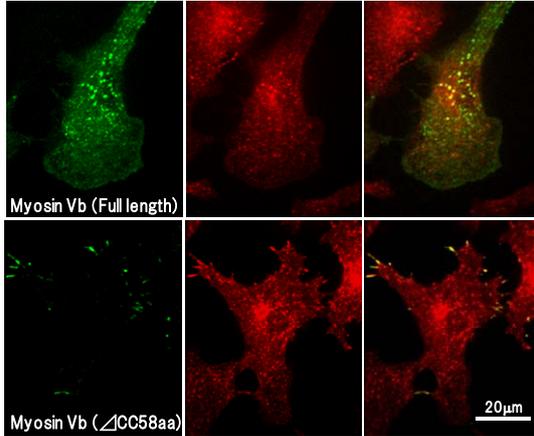
③植物体内での機能を同定するため、ミオシンを発現する形質転換植物（シロイヌナズナ）を作製した。

4. 研究成果

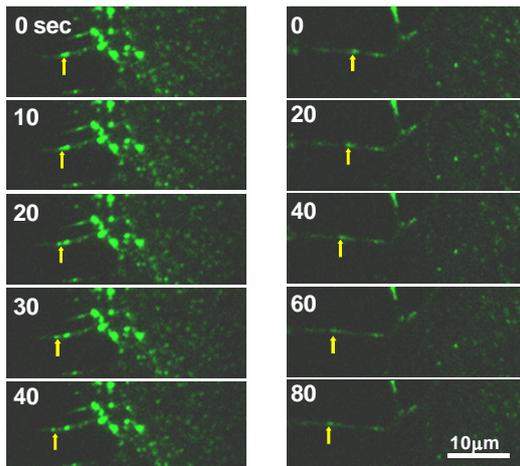
(1) 細胞辺縁の膜交通における、ミオシン Vb の分子内構造変化による制御機構。

ストークを短くした変異ミオシン Vb を発現させたところ、糸状仮足内部あるいはその基部に蓄積することが明らかとなった。また、トランスフェリンレセプターとの二重染色の結果、変異ミオシン Vb は積荷である小胞を結合したまま蓄積することが示された。蛍光性トランスフェリンを用いた一過的取り込み実験から、変異ミオシン Vb を発現する細胞では、糸状仮足周辺でのトランスフェリンの排出が阻害されていることが明らかとなった。以上の結果より、ミオシン Vb の折りたたみ構造は、細胞辺縁の最終的なエンドサイトーシス経路において、小胞を適切な場所で“手放す”ための制御に関与していることが示された。

図 ミオシン Vb (上: 緑) とストーク短縮変異体 (下: 緑) の局在。赤はトランスフェリンレセプター。



Intra-filopodial movement

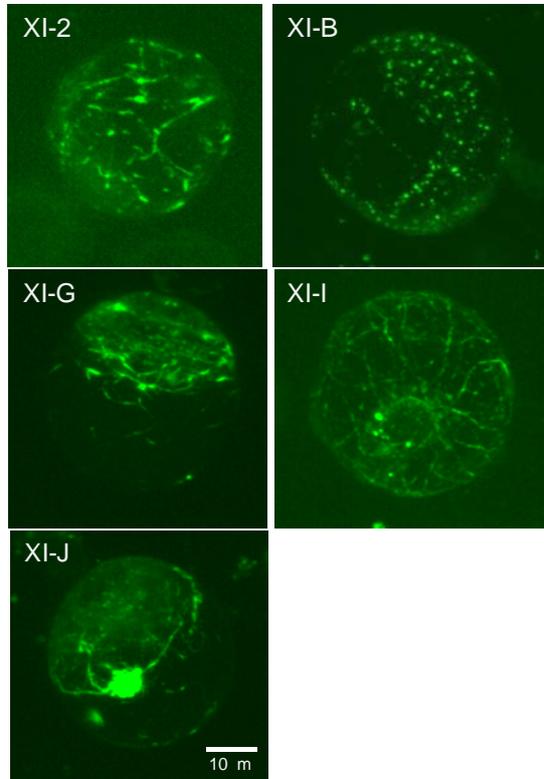


◆ Vesicles carrying by myosin Vb (ΔCC58aa) moved toward the tip of the filopodia.

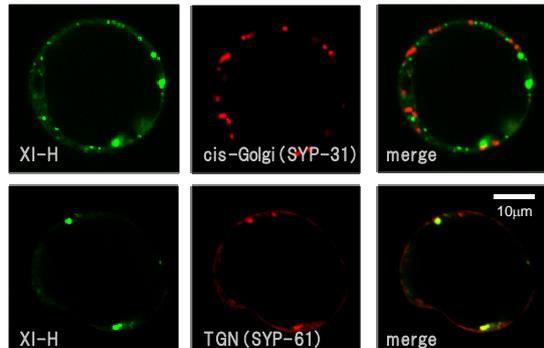
(2) ミオシンによる植物特異的膜交通制御機構の解析。

膜交通におけるメンバー個々の機能を同定するためには、全長の発現による局在や運動の詳細な解析が不可欠である。今回シロイヌナズナから、全 17 ミオシンメンバー全長のクローニングに成功した。ミオシンの運動機能に影響がないとされる N 末端に蛍光タンパク質を導入し、シロイヌナズナのプロトプラストにおいて一過的発現を行った。ライブイメージングの結果、メンバー依存的に形状やサイズの異なる細胞小器官に局在し、固有の運動を行っていることが明らかとなった。また、オルガネラマーカースとの共発現において、一部メンバーが TGN に局在することが分かった。ミオシンメンバー間での広範な機能分担を示す結果が得られたことで、膜交通における植物独自のユニークな制御システムの存在が示唆された。

図 植物ミオシンの様々な細胞内局在



図ミオシン XIH とオルガネラマーカースの共局在



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 Tominaga, M. (20 人中 3 番目)
Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 4489-4494, (2008), 査読有
- ② Tominaga, M. (8 人中 2 番目)
Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in Arabidopsis thaliana and the liverwort, Marchantia polymorpha. Plant Cell Physiol., (2009) In press 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 富永基樹、Conformational change of myosin Vb is involved in the regulation of peripheral membrane traffic
The 56th Fujihara Seminar, International Conference on Molecular Mechanism of Intracellular Transports : The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins 2007. (The Molecular Motor Conference 2007)、2007 年 8 月 25 日、北海道
- ② 富永基樹、Conformational change of myosin Vb is involved in the regulation of peripheral membrane traffic
International Symposium on Membrane Traffic、2007 年 11 月 27 日、兵庫県
- ③ 富永基樹、ミオシン Vb の分子内構造変化は細胞辺縁の膜交通制御に関与している
第 6 回エクストリーム・フォトニクス研究会「先端光源開発と量子科学への応用」
2007 年 11 月 14 日、愛知県
- ④ 富永基樹、ミオシン Vb の分子内構造変化は細胞辺縁の膜輸送制御に関与している
2007 年 12 月 23 日、第 45 回日本生物物理学会年会、神奈川県
- ⑤ 富永基樹、Conformational change of myosin Vb is involved in the regulation of peripheral membrane traffic
2008 年 6 月 30 日、第 60 回日本細胞生物学会大会、神奈川県
- ⑥ 富永基樹、ミオシンによる植物特異的膜交通制御機構の解析
2008 年 9 月 26 日、日本植物学会第 72 回大会、高知県
- ⑦ 富永基樹、膜交通機構における植物特異的ミオシン VIII と XI の機能と制御
2008 年 12 月 4 日、日本生物物理学会第 46 回年会、福岡県
- ⑧ 富永基樹、メンブレントラフィックにおける植物特異的ミオシン VIII と XI の機能

2009 年 1 月 10 日、2009 年生体運動研究合同班会議、東京都

- ⑨ 富永基樹、膜交通機構における植物特異的ミオシン VIII と XI の機能
2009 年 3 月 23 日、第 50 回日本植物生理学会年会 愛知県

[その他]

中野研究室ホームページ

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hasseipl/HP/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 基樹 (TOMINAGA MOTOKI)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・研究員

研究者番号 : 50419892