

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600019

研究課題名(和文)「ふりかけるだけ」細胞内一分子ナノ計測の提案

研究課題名(英文) Establishment of simplified methods for analyzing intracellular single molecule behavior

研究代表者

畠山 裕康 (Hatakeyama, Hiroyasu)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：00619067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内の任意の分子の一分子計測を容易に可能にする材料と手法の提供を目的とした。そのために、極めて安定で明るい蛍光ナノ材料、量子ドットに対して、低分子リガンドと特異的共有結合を形成するタグタンパク質を利用した目的分子との特異的結合能の獲得と細胞膜透過性ペプチドを利用した細胞膜透過性の獲得の2点を試みた。前者については目的を達成したものの、後者は導入効率等に課題があったため断念した。しかし、エレクトロポレーション法により低い細胞毒性にて高効率な細胞内導入を可能にすることができた。これにより細胞内におけるミオシンの一分子計測を行うことができ、本研究の目的を達成することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to provide materials and techniques to allow easy and non-invasive measurement of intracellular single molecule behavior. To achieve this, we attempted to introduce: 1) ability to specifically bind molecules of interest, using tag protein technologies that can form a covalent bond between tag-fusion proteins and small molecule ligands; and 2) cell permeability, using cell permeable peptides to introduce extremely stable and bright fluorescent nanocrystal quantum dots. We successfully introduced the former ability, but we aborted the latter, due to drawbacks, such as transduction efficiency. However, we enabled highly efficient transduction of quantum dots by electroporation, without noticeable cytotoxicity. With this approach, we successfully tracked intracellular movement of myosin motor proteins.

研究分野：細胞生理学

キーワード：量子ドット

1. 研究開始当初の背景

あらゆる細胞機能は、関与する機能分子の時空間的振る舞いによって制御される。すなわち、細胞内における機能分子の動きは、あらゆる細胞機能を制御する決定因子の一つであり、その破綻は様々な障害や疾患と直結する。これを高精度に計測することで、分子動態という全く新しい概念に基づき疾患の理解や予測・新規治療戦略の開拓といった革新的社会貢献を可能にする。そのための最も有効な手法の一つに、極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た細胞内一分子動態の直接計測がある。しかし、ナノ材料である量子ドットには細胞膜を透過する能力がなく、現状ではマイクロインジェクションや界面活性剤を用いた細胞膜透過化等侵襲性の高い手法によって細胞内への導入が行われていた。

報告者らは研究開始当初までに、生理的な食後血糖降下作用を担う糖輸送担体 GLUT4 の一分子動態について量子ドットを用いてナノ計測できる手法を開拓してきた。この手法は GLUT4 が細胞内貯蔵部位と細胞膜とを複数回往來するリサイクリングタンパク質であることを利用した非侵襲的な手法であり、これにより GLUT4 一分子動態障害によるインスリン抵抗性という全く新しい概念の提示に成功してきた。しかし、この手法でも適用範囲は細胞膜を経由するリサイクリングタンパク質に限定される。そのため、容易かつ非侵襲的な手法にて細胞内の任意のタンパク質の一分子挙動計測を可能とする手法が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内の任意の分子の一分子計測を容易に可能にすることを目的とし、目的分子への特異的結合能を獲得させた量子ドットに細胞膜透過性を獲得させ、これによって細胞にふりかけるだけで細胞内の任意のタンパク質を量子ドットで標識して容易にナノ精度で一分子計測することを可能にする材料と手法の提供を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、低分子リガンドと 1:1 の特異的共有結合を形成するタグタンパク質 (HaloTag 等) を利用して量子ドットに目的分子への特異的結合能を獲得させることと Protein Transduction Domain (PTD) と呼ばれる短いペプチドを利用することにより高効率での細胞質への導入能力を獲得させることを試みた。ただし、導入効率や標識効率の点で課題が生じた場合には、他の手法を選択することも念頭に置いて研究を進めた。

4. 研究成果

(1) 目的分子への結合能を獲得した量子ドットの調製

本研究では、量子ドットに目的分子への特

異的結合能を獲得させるために、低分子リガンドと 1:1 の特異的結合を形成するタグタンパク質を利用した。そのために、表面がポリエチレングリコールアミンで修飾された量子ドットとスクシンイミド化された HaloTag リガンドとを様々な量比にて混合することで HaloTag リガンド-量子ドット複合体を調製した。調製したこの複合体が HaloTag 融合タンパク質と結合するかどうか検証するため、HaloTag-YWHAB で形質転換し発現誘導した大腸菌の可溶化液にこの複合体を混合して反応させた後、アガロースゲル電気泳動にて量子ドット蛍光を検出した。その結果、量子ドット上の HaloTag リガンド数が多いほど多くの HaloTag-YWHAB タンパク質と結合することが確認されたとともに、このような結合は非変性 HaloTag-YWHAB タンパク質との間でのみ起こることが確認された (図 1)。このことから、調製した HaloTag リガンド-量子ドット複合体は確かに HaloTag 融合タンパク質と結合することが確認できた。

(2) 量子ドットの細胞内への導入

本研究は、PTD として広く用いられているヒト免疫不全ウイルス (HIV) の Tat タンパク質に存在する細胞膜透過性領域 (Tat-PTD) をもとに配列改変を行い、高効率に細胞質へと導入される新規 PTD の開発を目標として研究を開始した。しかし、ある程度の高効率化には成功したものの、計測に十分なほどの細胞質への導入は困難であったこと、また PTD が量子ドット上に残存することによる影響が未知であったことにより、本手法による細胞内導入を追求することは断念した。一方で報告者らは、細胞内への遺伝子導入手法として広く用いられているエレクトロポレーション法が量子ドットの細胞内導入に非常に

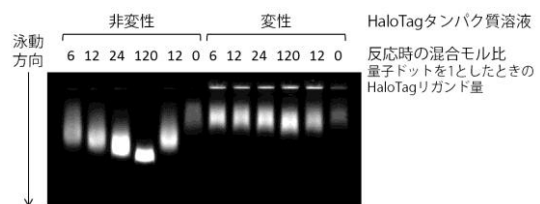


図 1 量子ドットと HaloTag リガンドとの結合

様々な混合比にて量子ドットと HaloTag リガンドを混合して作製した HaloTag リガンド-量子ドット複合体を HaloTag-YWHAB タンパク質を含む溶液と反応させ、アガロースゲル電気泳動した後に量子ドット蛍光を検出した。この際、HaloTag-YWHAB タンパク質溶液を煮沸した変性溶液も準備した。非変性 HaloTag タンパク質との結合により、混合モル比 (=量子ドット上の HaloTag リガンド数) 依存的に泳動度が変化することから、作製した HaloTag リガンド-量子ドット複合体は非変性 HaloTag タンパク質とのみ結合することが分かる。

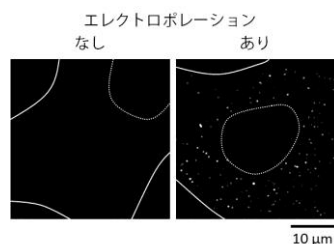


図 2 エレクトロポレーションによる量子ドットの細胞内導入

(1)で調製したHaloTagリガンド-量子ドット複合体を含む溶液を細胞外液として与えた後、エレクトロポレーションを行うことにより、量子ドットの顕著な細胞内への導入が認められる。実線および破線はそれぞれ細胞膜と核膜を示す。

適していることを見出した (図2)。一般的に接着細胞にエレクトロポレーションを行う際には、一端細胞懸濁液を調製してから行う必要があるが、報告者らは接着したままで処理可能なエレクトロポレータを用いることにより、接着状態を保ったまま電気パルスを与えた。報告者らが行った実験手順では、細胞外液に量子ドットが存在しても電気パルスを負荷しないかぎり細胞内への量子ドットの導入は認められなかった (図2)。与える電気パルスの条件を検討することにより、細胞には毒性をほとんど与えず量子ドットを高効率に細胞内へと導入することのできる条件を設定することに成功した。この手法では細胞に量子ドットをふりかけた後エレクトロポレーションを行うという手順を加える必要があるが、従来のマイクロインジェクションや細胞膜透過処理と比較すると極めて容易であり細胞への侵襲性も低いものと考えられる。また、本手法では目的分子をHaloTag融合タンパク質として発現させる必要があるが、エレクトロポレーションを行う際の細胞外液に量子ドットのみならずHaloTag融合タンパク質の発現ベクタも添加して同時に細胞内に導入することが可能であり、非常に利便性の高い手法である。

(3) 細胞内ミオシン分子の一分子計測

作製したHaloTagリガンド-量子ドット複合体により細胞内の分子挙動を追跡できることを確かめるために、ここではアクチンフィラメント上を異動するモーター分子であるミオシンの挙動の計測を試みた。そのために、3T3-L1 繊維芽細胞に対してHaloTagリガンド-量子ドット複合体とHaloTag-myosin Vb 発現ベクタをエレクトロポレーションし、翌日まで培養した後に観察を行った。このとき、ローダミン等の蛍光分子で標識されたHaloTagリガンドでHaloTag-myosin Vb を発現する細胞を観察すると、直線性の動きを示す量子ドットが観察され、これはアクチンフィラメント上を動くmyosin Vb を観察しているものと考えら

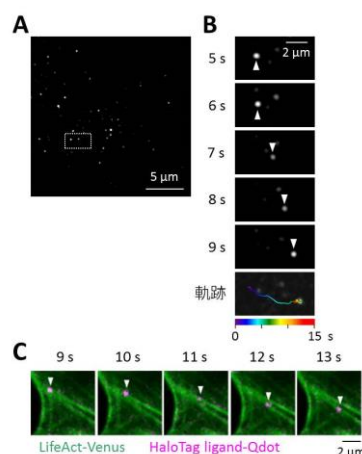


図 3 細胞内ミオシン分子の追跡

(A) HaloTag リガンド-量子ドット複合体の蛍光像。

(B) (A)の点線内の拡大図。時間経過に伴って直線性の挙動を示している。

(C) LifeAct-Venus を用いてアクチンフィラメントを可視化すると (緑)、この構造上を動くHaloTag リガンド-量子ドット複合体 (HaloTag ligand-Qdot、マゼンタ)の像が検出される。

れた (図3A および 3B)。HaloTag-myosin Vb を発現していない細胞ではこのような動きは観察されなかったため、本手法により確かにHaloTag-myosin Vb の動きを観察しているものと考えられる。なお、観察された量子ドットのうち直線性の動きを示したものはわずか5%程度であった。この知見は過去の文献とも一致しており、残りの量子ドットの多くは不活性なミオシンか、あるいはミオシンと結合していない量子ドットを観察しているものと考えられる。さらにLifeAct-Venus を用いてアクチンフィラメントを可視化したところ、確かにアクチンフィラメント上を動くと思われる量子ドット蛍光像が観察された (図3C)。

以上より、本手法を用いることにより細胞内の任意のタンパク質について容易に一分子計測を可能にすることができた。残念ながら研究期間終了までに論文発表には至らなかったが、現在執筆中であり、近い将来の論文発表を目指している。

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0件)

[学会発表] (計12件)

- ① 細谷 雅浩・堰合 茂智・畠山 裕康・神崎 展、マウス走行運動モデルと電気パルス強収縮モデルを用いた収縮骨格筋の生物学的応答の解析—GLUT4 制御に関わる分子基盤について—、第4回骨格

- 筋生物学研究会、2016年3月1日、松本大学（長野県松本市）
- ② 梶山 裕康・神崎 展、AS160 vs Tbc1d1: Cooperative determination of insulin-responsive GLUT4 trafficking activity after exercise-mimetic stimuli、Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes、2015年9月14-19日、ストックホルム（スウェーデン）
- ③ 梶山 裕康、一分子計測で迫る糖輸送体分子の細胞内輸送システム、東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター第14回講演会 バイオイメージングセミナー～細胞イメージング技術が切り拓く医工連携研究の最前線～、2015年8月3日、東海大学湘南キャンパス（神奈川県平塚市）
- ④ 梶山 裕康・神崎 展、Coordinated actions of AS160 and Tbc1d1 as a determinant of insulin sensitivity in GLUT4 trafficking、FASEB Science Research Conference “Glucose Transport: Gateway to Metabolic Systems Biology”、2015年7月26-31日、ビッグスカイ（アメリカ合衆国）
- ⑤ 細谷 雅浩・宇田 侑平・梶山 裕康・神崎 展、Involvement of Mechanosensitive Transcriptional Network in Contraction-dependent Muscle Fiber Type Conversion Analyzed using the “in vitro Exercise Model”、Cell Symposia “Exercise Metabolism”、2015年7月12-14日、アムステルダム（オランダ）
- ⑥ 梶山 裕康、「生きている」をみる・はかる、東北大学学際科学フロンティア研究所 全領域合同研究交流会、2015年5月14日、東北大学（宮城県仙台市）
- ⑦ 梶山 裕康・神崎 展、GLUT4一分子挙動計測に基づくTBC/RabGAPsが司る運動効果の分子基盤解析、第3回骨格筋生物学研究会、2015年3月7日、東北大学（宮城県仙台市）
- ⑧ 梶山 裕康・海田 翔平・長瀬 瑛介・神崎 展、マウス単離骨格筋ファイバーにおける細胞内小胞輸送動態の一分子計測、第3回骨格筋生物学研究会、2015年3月7日、東北大学（宮城県仙台市）
- ⑨ 細谷 雅浩・梶山 裕康・土谷 昌広・神崎 展、運動依存性 GLUT4 トランスロケーション機構の解析—電気パルス刺激によるマウス骨格筋の強収縮モデルを用いた試み—、第3回骨格筋生物学研究会、2015年3月7日、東北大学（宮城県仙台市）
- ⑩ 梶山 裕康・神崎 展、Submissive Role of AS160 in Tbc1d1-mediated GLUT4 Trafficking Activation in response to Ca²⁺ and Insulin、74th Scientific

- Sessions of the American Diabetes Association、2014年6月16日、サンフランシスコ（アメリカ合衆国）
- ⑪ 梶山 裕康・神崎 展、一分子イメージングに基づく細胞内輸送システムの定量計測、バイオイメージングフォーラムワークショップ2014、2014年6月9-10日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市）
- ⑫ 梶山 裕康・神崎 展、インスリン応答性 GLUT4 輸送制御における TBC1D family Rab GTPase 活性化タンパク質群の機能解析、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月24日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
梶山 裕康 (HATAKEYAMA, Hiroyasu)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教
研究者番号：00619067