

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 成川（篠崎） 苗子

2. 養成カリキュラム名：細胞内小胞運動からのナノ分子モーター解析技術者養成

3. 養成カリキュラムの達成状況

細胞内分子の挙動を生細胞のまま可視化、計測、解析する技術を習得することを目標としたカリキュラムであるが、生細胞における蛍光蛋白の可視化については、生細胞内への蛍光蛋白発現のための遺伝子組み換え技術、蛍光蛋白の挙動のリアルタイム撮影技術などを習得した。特に撮影した蛍光蛋白の挙動画像は国際学会で十分通用する程度の質を持つようになった。生細胞における蛍光蛋白の FRET 測定法については刺激依存性に相互作用が起こる可能性がある蛋白の組み合わせの選出・生化学的な解析による相互作用の有無の判定が必要であり、かつ2分子間 FRET は様々な困難が伴うため、莫大な予備検討が不可欠である上に、現在までの細胞内小胞運動の解析結果から考えて、今後必ずしも FRET 測定をする必要性は無いと思われるため、今後は生細胞における蛍光蛋白の可視化に注力し、細胞内小胞運動の機構の解明を目指す予定である。

4. 成果

人間はおよそ 60 兆個の細胞から成るが、その細胞ひとつの中で複雑でかつ巧みな物質輸送機構が存在する。細胞内の特定の場所から別の特定の場所へ目的の物質を輸送する為には、正確な輸送物質の選択と積み込み、正確な輸送経路と駆動力の確保、正確な目的地への到着が必要であり、それら各ステップは様々な細胞内の蛋白質・脂質によって複雑に制御されている。必要な物質を積み込むのが二重のリン脂質膜からできた小胞であり、目的地へ小胞を輸送する機構が近年明らかになりつつある。細胞内には、アクチン細胞骨格、微小管、中間系フィラメントという3つに分類される、細胞骨格という蛋白質の重合体が存在する。細胞骨格は、重合・脱重合を繰り返しながら、細胞の張力・基質への接着力や互いの細胞間の接着力を保ち、あるときは細胞全体を動かす駆動力を与えることも出来る、柔軟な細胞内の骨格であるが、これら細胞骨格のうち、微小管を足場として、あるいはアクチンの重合を駆動力として、小胞が輸送されることが分かってきた。微小管を足場とする場合は、キネシンとダイニンという名の、モーター蛋白というものが小胞を輸送する。例えば小胞という貨車を背負ったキネシンあるいはダイニンの車輪が微小管のレール上を走り、目的地へ輸送するようなものである。一方、アクチンの重合を駆動力とした場合は、アクチンの重合を促進する蛋白質群が小胞に集まり、そこからアクチンが次々に重合することで小胞が押し進められる。こちらの輸送は、小胞という荷物を積んだロケットがアクチン重合促進蛋白質群というエネルギーを供給されて、アクチン重合という火を噴き、目的地へ発射されるようなものである。

これらの輸送に関わる蛋白質の制御を担っているのがイノシトールリン脂質である。イノシトールリン脂質は輸送が必要な時に輸送関与蛋白質を活性化したり、輸送関与蛋白質同士の相互作用を引き起こしたりするのである。そして、このイノシトールリン脂質も、必要な時に、

必要な場所でのみ存在する。このイノシトールリン脂質の生産を制御しているのが、イノシトールリン脂質合成酵素である。このイノシトールリン脂質合成酵素の機能を解析することで、小胞の輸送機構を明らかにすることを目標として研究を行っている。

小胞の輸送機構を解析するにあたって、輸送のビフォー・アフターを示すだけでは輸送の経緯が捉えられない。輸送しているその瞬間を、連続的に捉える必要がある。その為には細胞を固定せずに、生きたままの状態に輸送機構を解析しなければならない。輸送に関与する蛋白質の挙動を生細胞で捉える為に、遺伝子操作によって挙動を解析したい蛋白質の DNA 配列にクラゲの緑色に発光する蛋白質、Green fluorescent protein (GFP) の DNA 配列を融合した。この融合 DNA を生細胞に導入することで、目的蛋白質を GFP で標識して生細胞で発現することが可能となる。培養液内で生きたままの GFP 標識蛋白質を発現させた細胞を顕微鏡下に設置し、GFP の蛍光を励起させる波長の光を照射すると、挙動を解析したい蛋白質のみが光って見える。そして顕微鏡に設置した高解像度のカメラを用いて、発光している目的の蛋白質の挙動を撮影し、そのパターンから小胞の輸送機構を解析できるのである。また、GFP の DNA を遺伝子操作することにより、青緑色に発色する cyan fluorescent protein (CFP)、黄色に発色する yellow fluorescent protein (YFP) が開発されているが、この 2 つの発光蛋白質それぞれに、挙動を解析したい異なった 2 種の小胞輸送関与蛋白質を遺伝子操作で融合することで、異なった 2 種の蛋白質の挙動を同時に撮影・解析できる。

この解析手法を用いて、前述のイノシトールリン脂質合成酵素の生細胞での挙動を詳細に解析した。その結果、生細胞における GFP あるいは CFP・YFP を用いた解析によって、イノシトールリン脂質合成酵素によって生成されるイノシトールリン脂質が、細胞内小胞輸送において、必要な物質の小胞構造への取り込みのステップと、目的地に輸送するステップ—しかもアクチン重合を駆動力とした輸送システムと微小管をレールとした輸送システムの両方—に関わっていることが明らかとなった。しかし、アクチン重合を駆動力とした輸送システムと微小管をレールとした輸送システムそれぞれが独立しているのか、もしくは共同しあっているのか、そして、イノシトールリン脂質合成酵素が局在する構造は非常にダイナミックに動く構造であり、分岐したり新たな足場を探している尺取虫のような挙動をするのだが、これらの動きがどのように制御されているのかという未解明の問題も残されている。これらの動きがどのように制御されているのか明らかにするために解析を一層進める予定である。

このような小胞の輸送の機構、モーター蛋白質の機構を解析することで生物の高効率の輸送機構・エネルギー利用を知ることが可能となり、高効率機械設計・省エネルギー技術に応用できる可能性がある。また、小胞輸送の異常は、糖尿病などの病の一因でもあるため、その機構の解明から病気の治療法の開発に貢献できる可能性があり、現在、これまでの成果を論文にまとめている最中である。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

該当無し

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

・ 第 56 回 日本細胞生物学会大会 2003 年 5 月 15 日

演題番号 2P-45 「PIP5-kinase が制御する小胞運動」

OHP、ポスター発表

BS-3 「アクチン重合による細胞内小胞運動を可視化する」

ビジュアルセッション

・ The American Society for Cell Biology 43rd Annual Meeting 2003 年 12 月 17 日

Presentation Number : 2838

「Regulation of Endosomal Traffic by Phosphatidylinositol Phosphate 5-Kinase」

ポスター発表

(3) 特許等の出願件数

該当無し