

細胞の動的高次構造体
2021 年度採択研究代表者

2022 年度
年次報告書

中村 秀樹

京都大学 白眉センター
特定准教授

解糖系高次構造体の時空間操作技術によるグルコース代謝制御の解明

研究成果の概要

酸素を消費しないグルコース代謝経路である解糖系の酵素であり、解糖系の律速段階を触媒すると言われる PFKL に注目して実験を行っている。前年度までに、蛍光タンパク質標識した PFKL を哺乳動物細胞内に強制発現して、PFKL の細胞内ダイナミクスを検討した結果、一部先行研究で報告されている相分離による非膜型オルガネラの形成は、低酸素環境など生理的条件では認められなかった。そこで低酸素環境における PFKL の細胞内ダイナミクスの網羅的解析を目指し、近接ラベリングを用いたプロテオミクス解析の準備を進めていた。

本年度は、前年度に購入した蛍光顕微鏡にデジタルミラーデバイスをを用いた光刺激装置を増設し、時空間的に自由度の高い光刺激を実現する光学系のセットアップを完了した。この実験系と共焦点顕微鏡を併用することで、自在な光刺激を用いて細胞内のタンパク質を操作する実験が可能となった。今後、PFKL を中心とする解糖系酵素を用いて実験を行うことで、解糖系酵素の細胞内分布を操作し、代謝活性や最終産物である ATP 濃度を測定する実験へと展開を目指す。前年度の予備的検討で、PFKL に近接ラベリング酵素 TurboID を融合したプローブを用いた実験を行い、通常酸素濃度 (~20%) で PFKL 近傍タンパク質のビオチン化に成功したことを示唆するデータを得ていた。本年度はさらに検討を進め、低酸素条件 (~1%) において PFKL 近傍タンパク質のビオチン化を試みた。低酸素条件で 24 時間培養した COS7 細胞に PFKL-TurboID-mCherry を発現し、ビオチンを添加して近傍タンパク質のラベルを行った後、ビオチン化タンパク質をアビジンビーズを用いて濃縮し、LC-MS/MS 解析まで行った。その結果、PFKL と四量体を形成する PFKM, PFKP や他の複数の解糖系酵素が上位にヒットし、PFKL 近傍のタンパク質が低酸素条件でもビオチン化されていること、さらに LC-MS/MS 解析により PFKL 近傍のプロテオーム解析が可能であることを示すことができた。今後は解糖系酵素を用いて通常・低酸素条件で同様の実験を行い、結果を比較することで解糖系酵素の細胞内ダイナミクスの包括的理解へとつなげる。

並行して、生きた細胞内の非膜型オルガネラを人工的に離散させるツール、ActuAtor の開発を継続して行った。細胞内の古典的オルガネラの変形や、非膜型オルガネラであるストレス顆粒の離散とその生理的影響を報告する論文を投稿し、本年度中に行った複数の実験結果を加えてリバイズ中である。解糖系酵素の非膜型オルガネラ形成は認められなかったため、解糖系への直接の応用は難しいが、古典的・非膜型オルガネラを含む細胞内の高次構造体研究における有用なツールに発展する可能性があるため、できるだけ早い論文出版を目指している。また、同様に細胞内高次構造体の研究に資するツール開発を並行して進めている。