

91-22-46

早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

キネシン分子モーターの
1 分子顕微機能解析
Microscopic analysis of kinesin molecular motors

申 請 者

川 口 憲 治

KENJI KAWAGUCHI

モータータンパク質は、ATPの加水分解によって得られる化学エネルギーを力学的エネルギーに変換する力学酵素であり、筋線維や繊毛に存在するのみでなく、全ての真核細胞に存在する。その理由は、真核細胞は大きく単純な拡散だけでは細胞内に十分な物質を行き渡らせることができないこと、そこでそれを補うために、細胞内部の小胞やミトコンドリアなどのオルガネラの輸送が必要となることにある。筋肉細胞にはミオシン分子モーターが存在し、繊毛細胞にはダイニンが存在する。そして第3のモータータンパク質として存在するのが本論文の題材でもあるキネシンであり、ダイニンに続く微小管系の第2のモータータンパク質として約15年前にイカの神経軸索で見出された(Vale *et al.*, 1985)。細胞内で小胞やオルガネラの輸送を行い、細胞分裂時の中心体の分離と紡錘体の形成にも重要な役割を担っている。ゲノム解析の結果、キネシンは10種のサブファミリーに分類され(キネシン様タンパク質、KRP)、ヒトやマウスでは45種類が同定されている。最初にイカから精製された天然のキネシン(従来型キネシン, conventional kinesin とよぶ)は一般に神経軸索にあって小胞輸送を担い、340個のアミノ酸からなる相同な2つの球状頭部を持つ。キネシンはこの2つの頭部が微小管との結合・解離を交互に繰り返しつつ微小管のプラス端(重合端)側に向かって"歩く"リニアモーターであるといわれていて、そこにはATP加水分解と共役した巧妙な仕組みが存在する。キネシンの特徴は、たった1分子でも微小管から解離することなく長距離(1 μ m程度)かつ長時間(1秒程度)にわたって運動を持続するというプロセッシブ性(逐次前進性)にある。このことと、分子量が小さく安定なことから、キネシンはミオシンやダイニンに比べて研究しやすく、原子間力顕微鏡(AFM)や光ピンセットによる1分子操作・計測、電子顕微鏡構造解析や光学顕微鏡による1分子イメージングなどの生物物理学的手法、それに加えて、特定のアミノ酸を置換した変異体を調製できる遺伝子工学的手法を用いた多くの研究成果が報告されている。本論文ではキネシンと微小管の相互作用を多分子レベル、1分子レベルで顕微機能解析し、得られた研究の成果をまとめた。

第1章では、キネシンが発見された背景、その研究の意義、本論文の概要などについて述べる。

第2章では、本研究で使用した実験系、タンパク質の精製法などについて述べる。具体的には、微小管の構成要素であるチューブリンの精製法、その重合や蛍光標識のさせ方、キネシンの精製法について述べる。キネシンを題材にした研究は当研究室においては初めてということから、詳しい精製方法を示した。また、ビーズアッセイの基本的な方法についても述べる。

第3章では、キネシン1分子の発生力、速度、プロセッシブ性の温度依存性について述べる。牛脳から精製したキネシン分子を、直径1 μ mのポリスチレンビーズ1個あたり1分子の割合で混ぜ、キネシン分子をビーズ表面に結合させる。このキネシン付きビーズをレーザーにより捕捉し(レーザートラップ)、あらかじめガラス表面に結合した微小管の上に持っていく。するとATP存在

下においてはビーズ上のキネシン分子が微小管と相互作用して運動を開始する。ビーズの動きを $\text{nm} \cdot \text{pN}$ (10^{-9} メートル、 10^{-12} ニュートン)分解能で計測することによって間接的にキネシン分子の運動を追跡することができる。キネシン分子が微小管と相互作用すると、はじめ速い速度で変位し、負荷が大きくなるにつれてしだいに速度が低下し、ついにはほとんど変位せず、一定の最大力 7pN を維持するが、しばらくすると解離して力はゼロに戻る。この一連の相互作用を、温度を 15°C から 35°C までの範囲で変化させて行い、滑り速度、発生力、プロセッシブ性の温度依存性を調べた。滑り速度は 50kJ/mol のアレニウス活性化エネルギーで増加した。これは ATPase における温度依存性と同じ結果であった。また、平均の移動距離、つまりキネシンのプロセッシブ性は、温度の上昇に伴って増加した。一方で、キネシン一分子が発生する力に温度依存性は見られず、 $7.34 \pm 0.33 \text{ pN}$ (平均 \pm 標準偏差。n=70) と一定であった。また滑り速度は、温度に関係なく外部負荷の増加に伴い直線的に減少した。このことは、この温度範囲ではメカノケミカルエネルギー変換の効率が一定に保たれていることを示す。このように、力発生は温度に依存しないヌクレオチド結合状態または構造変化に起因しており、一方滑り速度は ATPase によって決定されていることが示唆された。

第4章では、温度パルス顕微鏡(TPM)法を応用し、キネシン分子の動的、静的運動特性の研究を行った。TPM法では、ガラス表面上に円形に蒸着したアルミニウムに対物レンズを通して赤外レーザー($\lambda=1.053\mu\text{m}$)を集光・照射することによって、水溶液中で局所的に温度パルスを与えることができる。TPM法の一つの特徴は、約 $1^{\circ}\text{C} / \mu\text{m}$ の温度勾配を瞬時(ビデオレート内)に形成できる点にあるが、温度のリアルタイムイメージングは蛍光色素の熱消光の性質を利用して、微小管に結合したローダミンの蛍光強度を画像処理することによって行った。その結果、ガラス表面に吸着したキネシン分子を可逆的に短時間熱変調することができ、世界最高速の微小管滑り速度(約 $4\mu\text{m/s}$, 48°C)を記録した。また、微小管の後部の温度が高いときに、微小管の細かいバックリング(座屈)現象が見られた。これはキネシン分子の滑り力(滑り運動中での発生力)が高温ほど大きいために、微小管が長軸に沿って圧縮されることで生じたものであろう。また少数個のキネシン分子を吸着したプラスチックビーズの滑り運動についても、温度上昇に伴って同様の速度増加がみられた。このことから、非常に少数個のキネシンの場合にも同様に熱励起されることがわかった。

第5章では、1分子の従来型キネシンが吸着したポリスチレンビーズを光ピンセットで捕捉・操作し、微小管に結合させた上で、微小管に平行にプラス端、あるいはマイナス端方向に負荷を加える。この結果の破断曲線や、破断直前の変位と負荷との関係を解析することによって、キネシン・微小管複合体1分子結合の破断力と複合体の弾性率を求めた。AMP-PNP 存在下での破断力と弾性率は、ともに、ヌクレオチドなし状態あるいは AMP-PNP と ADP との共存状態で得られた値の2倍となった。この結果は、AMP-PNP 存在下ではキネシン

は双頭結合であり、あとの2状態では単頭結合であるということを強く示唆している。

また、破断力の大きさは、ヌクレオチド状態によらずプラス端よりもマイナス端方向に負荷を加えたときの方が約45%大きかった。このように、キネシン・微小管は負荷を加えることで不安定化し、しかもそれが負荷の向きに関して非対称になっている。そこで、双頭結合状態では双頭ブリッジを通じての内部応力が存在すると仮定すると、プラス端側に負荷を受ける後ろの結合頭部が比較的不安定で、解離しやすい傾向にあると推測できる。

第6章では、破断力分布の形はAMP-PNP存在下のみでなく、ヌクレオチドなしでも負荷上昇率と負荷のかけ方に依存することを述べる。ヌクレオチド状態や負荷のかけ方に関係なく、微小管のマイナス端よりもプラス端側に負荷を加えた時の方が第5章と同様に平均破断力が45%大きかった。これらの結果は単頭結合と双頭結合の間に平衡が存在し、それぞれの結合寿命の負荷(F)依存性が $\tau(F) = \tau(0)\exp(-Fd/k_B T)$ ($\tau(0)$ は無負荷状態での結合の寿命、 d は特性距離であり、その大きさは単頭結合か双頭結合かで異なると仮定したモデルによって説明することができた)。モデル解析の結果、単頭結合双頭結合間の遷移速度定数として、それぞれ2、0.2/s (AMP-PNP存在下)、70、0.7/s (ヌクレオチドなし)と見積った。さらにAMP-PNP存在下においては、単頭から双頭結合に遷移する瞬間を弾性率の急激な増加として捉え、遷移速度を1/sと見積もった。これはモデル計算の値と一致した。

第7章では本論文の結果をまとめ、キネシン1分子での機能解析の今後の展望について述べる。生化学、クライオ電子顕微鏡、1分子計測の結果のほとんどは、微小管に結合したキネシン頭部にATPが結合することによって構造変化が生じることを示している。この構造変化によって、解離している方の頭部が微小管に結合できるようになり、その結合が後方の結合頭部に対して微小管のプラス端方向への内部負荷を生み出す。では、どのようなメカニズムで、内部負荷が方向性運動を引き起こす分子内協調性を生み出すのだろうか？一定負荷を加えるとキネシンのATPase活性が下がるという報告がある(Schnitzer *et al.*, 2000)。また、外部負荷がヌクレオチド結合性(酵素活性)を変化させるという証拠が得られている(上村、石渡；投稿中)。このような性質こそ、化学力学酵素としての分子モーターの本質をつくものであろう。内部負荷による分子内協調性のメカニズムを明らかにするための鍵もここにある。今後はさらに高時空間分解能で構造変化を捉える研究が盛んになるだろう。高速AFMによるミオシンVのリアルタイム1分子挙動観測なども注目される(Ando *et al.*, 2001)。キネシン歩行運動における構造変化の役割をさらに明確にするためには、各ヌクレオチド結合状態での結晶構造解析が必要になる。そしてまた、ステップ中の頭部の動きを直接観察することができれば、もっと詳細にキネシンの歩行運動メカニズム、つまりそこにおける化学・力学共役の内容を理解することができるだろう。