早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

1 分子力学測定による
生体分子モーターのメカニズム
の研究

A study on the mechanism of biomolecular motors revealed by single-molecule mechanics

申 請 者

氏 名		
	上村	想太郎
	UEMURA	SOTARO

専攻・研究指導
(課程内のみ)

生命理工学専攻・実験生物物理

2003 年 11 月

本論文は、双頭構造をもち、１分子で働く分子モーターであるキネシンとミオシンＶのメカニズムの解明を目指し、光ピンセット法と高速顕微解析法を用いて、分子モーターに特徴的な力学特性と運動機能を解析した研究の成果をまとめたものである。これら 2 種類のモータータンパク質に共通する性質はプロセッシブ性という点にある。プロセッシブ性は逐次前進性と訳されるが、数μm という長距離にわたって、微小管あるいはアクチンフィラメント上を解離せずにフィラメントの+端（B 端）方向に運動しつづける性質を指す。この性質によって長距離にわたる細胞内物質輸送が可能であり、力学酵素に本質的な力発生機能の全てが１分子の中に備わっている。その点で、分子モーターに共通の運動メカニズムを解明するという目的には最適の研究対象である。

第一章では、1 分子解析の生物物理学的意義やモータータンパク質研究の背景、そして未解明な問題をまとめ、本論文の概要を述べる。

第二章では、本研究で用いたタンパク質の精製法と顕微解析装置、そして 2 種類の運動測定（Motility Assay）法について、その概要をまとめる。すなわち *in vitro* 運動計測実験の基礎的手法であるグライディングアッセイ法とビーズアッセイ法（1 分子計測に必要な分子モーター結合ビーズの調製法を含む）について述べる。さらに１分子の検定法についても述べる。各タンパク質の精製方法（天然キネシン、微小管、ミオシンⅤ、アクチン）は生命科学研究の基礎である。タンパク質の調製に必要なクロマトグラフィーやタンパク定量法などについても述べる。

そして本論文で用いた 3 種類の顕微鏡システムについて述べる。一つは、力学測定に必要な、ビーズ位相差像の輝度重心と、（分子モーター＋微小管・アクチン）系の蛍光像とを同時にビデオ記録し計測・解析する装置（TMD-300）、そしてもう一つは、四分割フォトダイオード投影系による高時間分解能装置（TE-2000）、さらに暗視野斜光照明法で得られたビーズの変位を高時間・高空間分解能で計測するための装置（東北大学際センター・樋口秀男研究室）である。

第三章では、キネシン・微小管破断力（結合を破断するのに必要な力）測定によって各ヌクレオチド状態の結合様式を特定する研究について述べる。プロセッシブ運動は、ATP 加水分解過程と共役したキネシン・微小管結合様式の変化によって実現していると考えられる。それは、各ヌクレオチド状態に応じて結合ポテンシャルが異なることの現れである。従って各ヌクレオチド状態での結合様式を明らかにすることは、分子モーターの運動メカニズムを理解する上で非常に重要である。そこで申請者は、各ヌクレオチド状態にある結合複合体に外力を加え、得られた破断力の大きさと分布をもとに結合様式を特定することにした。

本実験では、AMP-PNP（加水分解しない ATP アナログ）、ヌクレオチドなし、ADP の三条件でキネシンを微小管と結合状態にし、キネシン吸着ビーズを捕捉した光ピンセットの捕捉中心を動かすことによってキネシン・微小管結合に外部負荷を加え、結合を破断させて破断力を計測した。結合状態を特定するために、双頭キネシンだけでなく単頭キネシン

も用いた。1 分子結合した直径 1μm のビーズを光捕捉し、ガラス表面上に固定された微小管上にビーズを近づける。微小管はあらかじめ、アミノ基を介してローダミン色素で標識されており蛍光画像でその位置を確認することができる。しかも重合速度の異方向性を利用することによって微小管を非対称的に蛍光ラベルし、重合端（＋端）と脱重合端（－端）とを識別する。各ヌクレオチド状態で、キネシン吸着ビーズを微小管上で約 30 秒間保持する。その間に、ビーズは回転ブラウン運動をし、キネシンを介して微小管に結合する。その後、光ピンセットの捕捉中心を一定の速度で微小管に沿って動かし続けることによってキネシン・微小管結合にほぼ一定の上昇速度で負荷を加える。破断は確率的に生じるが、破断時に加わっていた負荷（破断力）を測定する。そしてさらに光捕捉中心を動かし続けることによって、キネシン・微小管の再結合による再破断を記録・計測することができる。このようにして繰り返し測定によって得た破断力分布は、＋端方向へ負荷を加えた場合、1mM AMP-PNP では双頭キネシンは 6pN と 12pN に２つのピークを持つのに対し、単頭キネシンは 6pN のみのピークを持った。そしてヌクレオチドなしと 1mM ADP では双頭キネシン、単頭キネシン双方ともそれぞれ、6pN、3pN の１つのピークを持つ分布となった。この結果は、1mM AMP-PNP では単頭結合と双頭結合の２状態（ともに強結合）、ヌクレオチドなしでは単頭強結合状態、そして 1mM ADP では単頭弱結合状態にあることを示しており、ATP 加水分解過程でキネシンがこれらの結合状態を経巡っていることが示唆される。そして－端方向へと負荷を加えて結合を破断させると、＋端方向への破断力のおよそ 45％高い値が得られた。これは結合ポテンシャルが非対称であることを示しており、－端方向への負荷に対しては解離しにくい結合をしていることを意味する。さらに速度論から破断力分布のシミュレーションを行い、単頭強結合と単頭弱結合の破断力分布が再現されることを確認した。シミュレーションでは結合寿命の負荷依存性を$\tau(F)=\tau(0)\exp(-Fd/k_BT)$とした。τ(0)は無負荷時における結合寿命、F は外部負荷、d は分子間相互作用距離、k_Bはボルツマン定数そして T は絶対温度である。Howard らの測定結果を参考に、単頭弱結合状態（1mM ADP）では$\tau(0)$=1 秒、単頭強結合状態（ヌクレオチドなし及び 1mMAMP-PNP）では$\tau(0)$=150 秒とすると破断力分布が最もよく再現された。相互作用距離 d は、ヌクレオチド状態によらず＋端側破断の場合 4.0nm、－端側破断の場合 3.0nm と見積もられた。このことはキネシン・微小管結合破断の負荷方向依存性（非対称性）はヌクレオチドによらず、ヌクレオチドに依存するのは$\tau(0)$、すなわち結合ポテンシャルの障壁の高さであることを示している。

第四章ではヌクレオチドなし及び AMP-PNP 存在下での破断力分布の負荷上昇速度依存性から求められた結合状態について述べる。ここで用いたのは双頭キネシンだが、データ解析には単頭結合と双頭結合との間の状態遷移を仮定した。1mM AMP-PNP 条件では負荷上昇速度を変化させると単頭結合と双頭結合を示す２つのピークの割合が変化した。そこでこの結果を単頭結合と双頭結合との状態変化によるものと仮定し、それらの間の速度定数 k+と k-、そして各状態から直接解離する負荷依存的な２つの速度定数を加えた４つの状態間遷移を仮定したモデルを構築したところ、よく説明することが出来た。

第五章では ADP 結合活性の負荷方向依存性と内部負荷の存在について述べる。先に述べたように、破断力分布は＋端方向では ADP 状態で 3pN、ヌクレオチドなしでは 6pN であり、これは双頭キネシンでも単頭キネシンでも同様であった。このことはキネシン・微小管単頭複合体に、ADP が結合すると弱結合（3pN）、解離すると強結合（6pN）の 2 状態が存在することを意味する。そこで ADP 濃度を０から１mM へと上げていくと弱結合の割合が増えることを確認した。ところが、弱結合の割合の ADP 濃度依存性が＋端方向破断と－端方向破断とで異なり、ADP 濃度が 10-100μM 付近での弱結合成分の割合は、＋端側破断の方が－端側のものより大きかった。このことは＋端方向に負荷を加えたときの方が弱結合状態で破断する確率が高いことを示しており、ADP の結合が外部負荷の方向に依存して変化することを示唆する。

そこで双頭結合時に前後頭部がそれぞれ引き合うような内部負荷が存在すると仮定する。つまり前頭部は－端方向に引かれ、後頭部には＋端方向への負荷が加わる。すると ADP は後頭部に結合しやすく、したがって後頭部の方が解離しやすくなる（弱結合のため）ので、双頭結合状態から次の一歩を踏み出すことができるというプロセッシブ性のメカニズムの本質がここに存在すると考えることができる。

第六章では、ミオシンⅤのサブステップ高速運動計測によって見出された運動機構について述べる。この研究は東北大学・学際センターの樋口秀男氏との協同研究であり、そこで組み上げられた高時間･空間分解能の顕微鏡装置を使用した。この装置によって 36nm ステップ以下の高速サブステップ計測を目指した。その結果、四分割フォトダイオードによって 10kHz のサンプリングレートで運動を観察すると 36nm ステップは 12nm と 24nm に分離されることがわかった。これらのサブステップは長い待ち時間（Dwell Time）を持つ主状態を経た後、12nm ステップ、そして続けて 24nm ステップの順番で出現した。12nm ステップ後の中間状態は負荷の大きさに依存し、その待ち時間分布は 1 次反応を示す指数減衰型の曲線となった。さらに 24nm、及び 36nm ステップ後に存在する主状態の待ち時間も負荷の大きさに依存し、その待ち時間分布は既に報告されているように一つのピークを持つ 2 次反応を示すものだった。また、中間状態の待ち時間は ATP、ADP の濃度には依存しなかった。ところが、リン酸放出を遅くする BDM（2,3-butanedione monoxime）を加えると 7〜8 倍ほど長くなった（100mMBDM によって Pi 放出が抑制されることを、マラカイトグリーン法によるリン酸定量のよって確認）。主状態は ATP 濃度の低下、あるいは ADP 添加により長くなった。したがって 12nm サブステップは ATP 結合によって、24nm サブステップはリン酸放出により引き起こされることが強く示唆された。

第七章では、本研究のまとめと、1 分子モーター研究における本研究の位置づけ、そして今後の 1 分子モーター研究のあり方について述べる。