

論文の内容の要旨

論文題目

The Processivity of Molecular Motors in Kinesin Superfamily

(キネシンスーパーファミリーに属する分子モーターの processivity に関する研究)

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

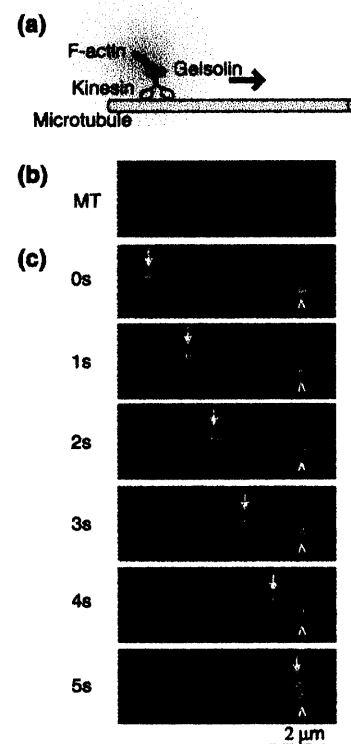
矢島 潤一郎

微小管依存性分子モーターであるキネシンスーパーファミリーのタンパク質は細胞内の輸送、微小管の dynamics、信号伝達の制御、細胞分裂、細胞の運動、形態形成等、生命現象の根幹にかかわっている。そのスーパーファミリーの中で一つのサブファミリーを形成する conventional キネシンは、主に神経細胞で小胞を微小管に沿って一方向に輸送する。生体内で、キネシン分子は単独か少数のグループで transporter としての機能を効率的に果たすと考えられているため、細胞のスケールに対して有効に働くのに要求される領域を微小管と相互作用したまま移動しなければならない。この必要性のために、キネシンは 1 分子でも遊離することなく微小管上を 8 nm ごとのサイズで、100 回程度のステップを行う能力を備えており、この特質は mechanical processivity (以降、単に processivity と記述する) と呼ばれている。一方、別のサブファミリーに属する ncd はキネシンとは異なり単独で機能するわけではなく、複数のモータータンパク質の一員として、直接的、間接的に相互作用しあいながら、確実に細胞分裂等の生命現象を導くようである。Ncd 分子の細胞内局在性から、生体内では数分子で機能する必要はなく、ncd 分子のチームとして機能しており、ncd が外部負荷のある状況で non-processive motor であるという報告とも一致している。このように分子モーターのもつ processivity は生体内での機能と密接に関係性を築いているが、この processivity に関する相違はどういったメカニズムから生れてくるのだろうか。

Processive な歩行のためにはいくつかの要求をみたさなければならない。双頭構造をとるキネシン分子は、本質的に、片方のヘッド(trailing head)が微小管を構成するチュ

ープリンの結合部位と安定結合しながら、もう一方のヘッド(leading head)が新しい結合部位を探すと推測されている。その部位と leading head の結合により、二つのヘッドが同時に微小管と相互作用し、ヘッド間に偏りのある内部ひずみが生じ、その結果、trailing head のチューブリンからの解離を促進し、キネシン分子は微小管上を一方向に移動している。この過程では、ATP を無駄に消費することなく達成されることが合目的であり、ATP 加水分解とメカニカルなステップとの関係は tight coupling となることが報告されている。このためキネシン分子は微小管からの恒久的な遊離の確率を低めながらも、ひとつのヘッドは ATP 加水分解サイクルと同等の rate constant で、tubulin の結合部位との間で結合と解離を繰り返している。従って、キネシン分子が微小管上を processive に移動するためには、ATP の turn over に共役した反復的な構造変化のプログラムが2つのヘッド間で協同的に進行しているはずである。そこで、本研究では、各種ヌクレオチドがキネシン分子の processivity に与える影響と各ヌクレオチド状態での1分子のキネシンと微小管との相互作用時間を顕微鏡下で直接観察し、ATP 加水分解サイクルの遷移状態である各ヌクレオチド状態とキネシン分子の機械的なステップの各素過程の状態とを対応付けることを目的に実験を行った。

この目的のために、単分子レベルでの機能解析技術の開発が必須と考え、1分子のモータータンパク質を無負荷で長時間観察可能な実験系(1分子 imaging 法)を標準的な蛍光顕微鏡を使って開発することに取り組んだ。従来の GFP をプローブとして利用する1分子 imaging 法では、GFP の光強度が弱く退色が速いため長時間の計測ができず、また、エバネッセンス顕微鏡や超高感度カメラも必要であるという問題点があった。これに対しプローブに多数のローダミンファロイジン分子でラベルした1本のアクチンフィラメントを用いることで、光強度を全体として非常に強くし、長時間の計測を可能とした。キネシン1分子に対し1本のアクチンフィラメントを結合させるために、アクチンフィラメントを切断してその切断端を cap するゲルゾリンをラットキネシン N 末側 430 アミノ酸残基の C 末端に融合した。大腸菌内で発現して得られた融合タンパク質



ローダミンラベルしたアクチンフィラメントと Ca^{2+} の存在下で混ぜ合わせることで、任意の数のローダミン分子を含むアクチンフィラメントをキネシン分子に特異的に結合させた(図 a)。アクチンフィラメントと結合した双頭キネシン分子 (RK430G·A) をローダミンとは異なる発光極大を持つ BODIPY でラベルした微小管(図 b)の吸着しているガラス面にアプライしたとき、ATP の存在下で、微小管に沿って点状の短いアクチンフィラメントがスムーズに一方向に移動するのが観察され(図 c)、キネシン分子が processive に微小管上を移動する過程を検出できた。対照的に、双頭構造ではあるが non-processive motor と考えられている ncd(GDN507·A)では、アクチンフィラメントが動くのが観察できず、外部負荷下の以前の報告と同様に、無負荷な状態ですら ncd 分子は processive に運動しないことが確かめられた。また、微小管とキネシン分子の間で親和性の高い結合を生み出す AMPPNP(ATP 非加水分解アナログ)存在下では運動が観察できず、この状態でのアクチンフィラメントの変位から見積もられた標準偏差は約 11 nm であった。この位置測定精度から、150 nm 以上のキネシン分子の微小管上での変位は十分に反映すると考えられる。こうして、これらの条件下で 1 分子キネシン、ncd の微小管上での挙動を直接観察することに成功した。

キネシン分子の微小管からの解離状態を検証するため、ATP 加水分解の 4 つ遷移状態、すなわち K (ヌクレオチドのない状態、rigor)、K·ATP、K·ADP、K·ADP·Pi でのキネシン分子の微小管との相互作用時間(結合寿命)を計測した。結合寿命は、1 分子のキネシンが微小管に結合してから遊離するまでの時間を直接観察に基づき算出した。計測の結果、キネシン分子が ATP の非加水分解アナログである AMPPNP(2mM) 状態、溶液中の ATP、ADP を消費する apyrase を加えた rigor 状態では、ともに結合寿命は 300 秒以上であり、それに対し、ADP(2mM)、ADP·Pi(2 mM ADP + 20 mM Pi) 状態ではそれぞれ 0.8 秒程度であった。このことから、キネシンは微小管と安定結合している状態と、相対的に、不安定結合状態の 2 つに大きく分類できる。

次に、ATP 存在下でのキネシン分子の運動を観察し、processivity の指標としてキネシン 1 分子が微小管に結合してから遊離するまでに動いた距離(run length)とその相互作用時間(dwell time)を ATP 濃度の関数として計測した。Run length、dwell time は広範囲の ATP 濃度で 1 次指数分布をとり、これらの分布の近似曲線から各 ATP 濃度における平均 run length と平均 dwell time がそれぞれ得られた。計測の結果、run length は、1 μM から 2 mM の広範囲にわたる ATP 濃度でほぼ一定値(380 nm)をとり、dwell time は 1 μM ATP で 22 秒、2 mM ATP で 0.44 秒と ATP 濃度の上昇とともに短くな

った。低 ATP 濃度では ATP 分子のキネシンへの結合が律速過程となるため、rigor 状態で微小管と結合している時間が増加するが、微小管からの遊離速度が非常に小さいために、rigor 状態で 1 回の run あたりに遊離する確率は依然として非常に低いと考えられる。以上のことからキネシンが微小管から遊離する確率は、rigor 状態以外のステップ中の各ヌクレオチド状態にある一定の遊離確率が存在すると考えられる。

そこで rigor 状態以外での遊離の可能性を検討するために、高濃度の ATP(2 mM)の存在する溶液に ADP を加え、同様に ADP 濃度の関数として processivity を調べた。結果は、添加した ADP 濃度の上昇とともに run length は減少し、2 mM ADP の添加で 208 nm とほぼ半減した。このことは、キネシン分子は K·ADP で微小管から遊離することを示唆している。同時に、キネシン分子の微小管上の運動速度も 853 nm/s から 2 mM ADP での 344 nm/s と減少したので、ADP は ATP のキネシン分子への結合の競争阻害として作用し、キネシンの微小管上での一方向へのステップと ATP の加水分解が tight coupling であることも矛盾のない結果となった。

本研究において、無負荷な状態でモータータンパク質の 1 分子の運動を長時間連続的に観察する系を開発したことにより、各ヌクレオチド状態での 1 分子のキネシンの微小管との相互作用の時間と距離をはじめて直接観察し、詳細に解析することが可能となった。この系で得られた結果から、キネシン分子が効率よく微小管上を一方向に移動するためには、2 つのヘッド間で 2 つの結合状態を交互に出現させ、結合状態の非対称性を調整する機構が必要であることが強く示唆された。微小管に rigor 状態で結合しているキネシン分子は、ATP の結合・加水分解を伴い微小管との結合状態を遷移させることを反復して processive 運動を行い、ADP を捕捉した状態で微小管から遊離することがわかった。