

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 : **Structural Biological Analysis of Microtubules and KIF1A motor protein**

和訳 : 微小管と KIF1A モーター分子の構造生物学的研究

指導教官 : 廣川 信隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 : 矢島 孔明

序論

微小管は α , β チューブリンから構成される細胞骨格の一種で、細胞内物質輸送や細胞分裂時の染色体の分割など生体内で重要な働きを担う。特に、細胞内物質輸送の実質的な原動力となっているキネシンや細胞質ダイニンなどのモーターたんぱく質のレールの役割を果たしている。

微小管の構造は外径 25nm の中空の筒状構造からなり、 α , β チューブリンが長軸方向に交互に並んだプロトフィラメントが互いに接触結合して、筒状の微小管を作り上げている。 α , β チューブリンは互いにアミノ酸レベルで 40%もの相同性があり、構造的にも酷似している。そのため、中空の微小管構造は中解像度 ($>8\text{\AA}$) で報告されているものの、その構造の中で α , β チューブリンを区別することはできていない。

一方、生体内で微小管に作用する分子は α , β チューブリンを区別して機能している。キネシンモーターはその一つであり、微小管をキネシンに結合させた複合体の構造では、 α , β チューブリンを合わせたチューブリンダイマーの長さである 8 nm の周期性が見られる。キネシンモーターがどのように α , β チューブリンを認識して結合しているのかということについて、生化学的な架橋実験が行われていたが、実際には微小管とキネシンの複合体の構造は二つのチューブリンサブユニットの中央に存在するため不明な点が非常に多い。

生物学的には区別され認識されている微小管中の α , β チューブリンを区別した形での構造解析は未だできていない。筒状構造を保ったまま微小管の α または β チューブリンを選択的に標識することによって、微小管の構造及びキネシン分子との相互作用について情報を得ることを試みた。

方法と結果

1. β チューブリンの C 末端を認識する抗体と KIF1A モーターは競争的に結合する

α , β チューブリンを区別することのできる分子として、特異的にかつ強力的に結合可能な抗体に注目した。まず、 β チューブリンの C 末端にエピトープのある抗体 TUB2.1 について、微小管に結合する定量的な検討と、構造的な検討を行うため、Fab 断片を作成し、微小管との共沈殿による定量的な結合実験を行った。得られたデータについてダイレクトプロット、スキッチャードプロットを作図して、ミカエリス・メンテンの方程式により、解離定数を求めた。この抗体は KIF1A モーターと結合部位を同一場所に持つ可能性が否定できないため、同時に KIF1A モーター付加時の結合の影響を測定した。その結果、 β チューブリン C 末端を認識する TUB2.1 は微小管に対し、解離定数は 5.4 μM と高い親和性を示した。しかし、KIF1A モーター存在下での TUB2.1 の微小管に対する結合を測定すると、スキッチャードプロットにおける y 切片が一致することが明らかになり、KIF1A モーターと競争的に結合することが判明した。このため、別の抗体について検討を行った。

2. アセチル化された α チューブリンに対する抗体は微小管の内側に結合する

アセチル化された α チューブリンにエピトープのある抗体 6-11B-1 についても同様に Fab 化を行い、定量的な微小管結合実験を行った。チューブリンの構造から 6-11B-1 のエピトープは筒状の微小管構造の内側に存在しているため、狭い微小管の中空で 6-11B-1 が結合可能であるのかという点について、6-11B-1 を加える時期を微小管重合前後変えることにより検討した。微小管重合後に 6-11B-1 を加えた時には、非常に大きな解離定数 ($>200\mu\text{M}$) を示し、構造化された微小管には少なくとも短時間では結合できないことがわかった。しかし、微小管重合前に 6-11B-1 を加え、その後重合させたところ、測定された 6-11B-1 の解離定数は 3.1 μM であった。6-11B-1 は微小管重合前に加えることにより、微小管に結合できることが明らかになった。

この微小管に結合可能な 6-11B-1 Fab の最大量を調べるため、全チューブリンに対するエピトープとなるアセチル化チューブリンの割合を二次元電気泳動で測定したところ、50%の α チューブリンがアセチル化されていることがわかった。結合実験において重合したチューブリン量は 7.0 μM であり、ミカエリス・メンテンの方程式より得られた最大結合量は 3.3 μM であったため、実際のエピトープの量と結合量がほぼ一致した。

従って、結合能について良好であり、微小管の内側に、しかも、表面はインタクトなままで露出した状態で α チューブリンに選択的に結合するという理想的な標識を見出すことができた。そこで、標識させた複合体の構造を三次元的に示すことを試みた。

3. 筒状の微小管における内側の狭い空間から α チューブリンの標識に成功した

6-11B-1 Fab 断片が本当に微小管の内側に結合した構造をとるのかどうかということを確認するために、微小管に 6-11B-1 Fab を結合した複合体について、クライオ電子顕微鏡とらせん対称性を利用した三次元再構成による構造解析により、複合体の三次元再構成像を 19Å の解像度で得ることに成功した。この再構成像において、微小管単独では存在しない密度が微小管の内壁に現れた。これはプロトフィラメント方向に配向するチューブリンダイマーに対して一ヶ所に結合していた。この構造に Fab の原子モデルを当てはめると、そのエンベロープは良く一致した。さらに、チューブリンダイマーの原子モデルを当てはめると、結合させた 6-11B-1 Fab 断片のエピトープである α チューブリンの N 末端から 40 番目のリジン残基の位置は、Fab の原子モデルの抗原認識部位に重なっていた。このことから、微小管の内側の狭い空間から、 α チューブリンを標識することを示すことができた。

4. α チューブリンと β チューブリンの C 末端において構造が異なる

α チューブリンを標識した複合体における 19Å の解像度の三次元再構成像において、微小管の表面構造にも、微小管にはみられない突起状の構造が現われた。原子モデルをこの構造に重ね合わせてみると、この突起状の構造は、原子モデルでは構造として見えていない α チューブリンの C 末端の位置に相当していた。この突起構造は β チューブリンでは観察されず、この複合体において、 α チューブリンの C 末端と β チューブリンの C 末端が構造的あるいは安定性において異なることが明らかになった。また、滑り実験により、このように複合体を形成した微小管が KIF1A モーターにより ATP 存在下で動くことを確認できた。

5. KIF1A モーターはチューブリンダイマーの中央の位置で結合する

微小管中のチューブリンダイマーに対する KIF1A モーターの結合位置を決めるために、 α チューブリンを標識した微小管に KIF1A モーターを結合させた複合体の三次元再構成像を求めた。その結果、KIF1A モーターは二つのチューブリンダイマーの間でなく、一つのチューブリンダイマーの中央に結合していることが明らかになった。つまり、KIF1A モーターは微小管に対する強い結合状態において、イントラダイマーの位置でチューブリンダイマーに結合していることを示すことができた。

考察および結論

今回の実験で、微小管の構造を保ったまま α , β チューブリンを識別できる分子を見つけ、微小管構造において α , β チューブリンの構造を区別する方法を確立した。それにより、(I) 微小管表面における α , β チューブリン構造の相違と、(II) KIF1A モーターのチューブリンダイマーに結合する位置関係を構造的に示すことができた。

I. 微小管における α , β チューブリンの表面構造の相違

微小管は巨大分子であるため構造解析の方法が限られており、また、似ているが同一でない α および β チューブリンを最小構成要素としているため、微小管における α , β チューブリンの構造を区別して解析することは困難であった。しかし、今回の実験で、微小管における α , β チューブリンの構造の区別が可能となった。この複合体における表面の構造は α , β チューブリンで異なっており、 α チューブリンの C 末端に β チューブリンでは見られない構造が見られた。チューブリンの C 末端は原子モデルでは見えておらず、 α , β の違いにより異なる可能性があることが示唆された。この構造の違いは、 β チューブリンにおいて可動しやすいアミノ酸配列が挿入されていることによると思われる。この構造は複合体であるため、Fab の結合の影響も考えられるが、滑り運動の実験から Fab を結合した微小管もまた KIF1A モーターで動く生理活性を失っていない。 α , β チューブリンの表面構造の違いが示唆されたことにより、微小管結合分子の制御機構や微小管のダイナミックスの構造的な仕組みの解明につながると思われる。

II. α , β チューブリンと KIF1A モーターの結合面の決定

α , β チューブリンとキネシンモーターの結合部位の研究は主として生化学的な架橋実験により行われてきた。しかし、複合体の構造ではどちらも二つのチューブリンの中央に結合しており、これら結果はモーターが隣接する二つのチューブリンダイマーの間に結合する”インターダイマー”か、一つのチューブリンダイマーの中央に結合する”イントラダイマー”に位置するのか不明であった。つまり、モーターが接する α , β チューブリンの結合面は実験的には決定していなかった。今回の実験では α チューブリンを特異的に標識することにより、KIF1A は”イントラダイマー”の位置で結合することがわかった。このことから、 α , β チューブリンそれぞれに結合するモーターの結合要素を明らかにできた。今回は KIF1A の微小管に対する強い結合状態の構造であるが、 α , β チューブリンを識別することが可能になったことから、動的過程の途中である遷移状態を含む弱い結合での移動の差異をみることも可能と思われる。KIF1A モーターの作動メカニズムを知る重要な手がかりになるとと思われる。