

論文の内容の要旨

論文題目

小
**A Study on the Motility of Minus-End-Directed
Kinesin-Related Proteins**

(マイナス端方向性キネシン様タンパク質の運動性に関する研究)

古田 健也

細胞運動や小胞輸送, 細胞分裂において, モータータンパク質とそのレールとなる細胞骨格 (微小管, アクチン繊維) は主要な役割を果たしている. モータータンパク質は ATP を加水分解することで得られるエネルギーを用いて細胞骨格上を移動することにより, 単純な三次元的拡散に依る場合と比べて圧倒的な効率で物質を輸送し, その時その場所で必要な仕事をお互いに協調しながら行っていると考えられる. このような見事なアンサンブルがどのように実現できるのかを理解するにあたって, これらの装置を構成する個々の分子がそれぞれ異なった分子特性を持ち自律的に動くことで全体の振舞いを決めていくと考える視点が重要であろう. このようなボトムアップ的な視点から, 私は個々の分子の特徴を調べ, さらにこれらを用いて最小限の再構成系を作製して調べることで, ダイナミックな生命現象を起こすための条件を探求したいと考えた.

キネシン (キネシン-1) は軸索輸送を担うタンパク質として同定され, 一分子で微小管上を長く連続的に歩くことを特徴とする. これに続き, これまでに数多くのキネシン様タンパク質が同定されてき

た。紡錘体では微小管のプラス端に移動するキネシン-5, 微小管のマイナス端に移動するキネシン-14, 微小管を壊すキネシン-8と13などが主に知られている。中でもキネシン-5とキネシン-14は紡錘体の構造を形成, 維持する上で重要な役割を果たしていると考えられている。変異体の研究から, キネシン-5とキネシン-14がお互いに反対向きの力を出して「綱引き」をし, あるタイミングでキネシン-14を阻害またはその数を抑制してそのバランスを崩すことで紡錘体の伸長をよく制御された形で実現するというモデルが提案されている。これらのキネシンのそれぞれ特有の働きは, 主に尾部の特別な構造によって実現されている。キネシン-5は, 二つの二量体がさらに尾部で結合しホモ四量体を形成し, それぞれの二量体が別々の微小管と相互作用することで微小管と微小管をスライドさせる。一方, キネシン-14は尾部にATPに依存しない微小管結合部位をモータードメインとは別に持っており, これにより, 微小管同士を架橋する活性を持っている。

本研究では, 紡錘体で働くキネシン様タンパク質の中で, マイナス端に運動するものに焦点を当てた。本研究で用いたNcdとPkl1はともにキネシン-14ファミリーに属しており, Ncdは有糸分裂, 減数分裂の両方に必須であるが, Pkl1は他のタンパク質と機能を共有し, その欠損変異体は致死ではない。しかしPkl1は有糸分裂期の微小管構造に影響を与え, 反対向きのモーターの力と拮抗する力を出していることが変異体の研究から示唆されている。

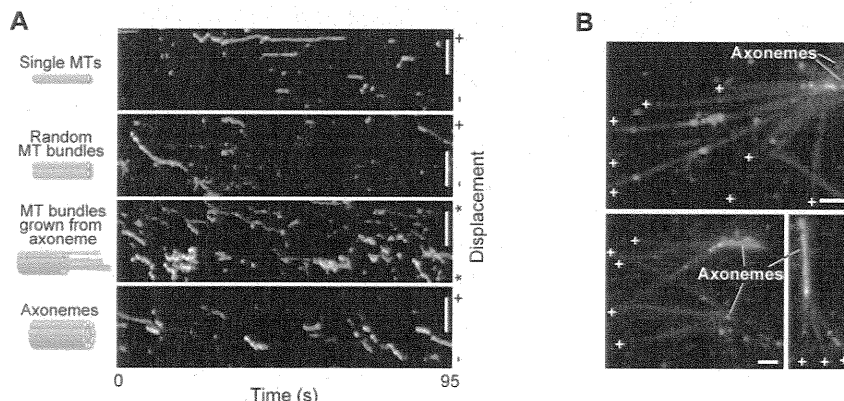
Ncdはマイナス端モータータンパク質の中で最も良く調べられているタンパク質である。紡錘体上のNcdのturnoverを調べた研究から, Ncdが意外にも速い時間で入れ替わっていることが報告された。つまり, Ncdは従来考えられてきたように微小管同士を堅く架橋するというよりは, ダイナミックに架橋と解離を繰り返している, という描像が生まれてきている。また, 一分子のNcdは, キネシン-1と同様に二量体を形成するが, 連続的に運動できないとされてきた。過去の研究ではモータードメインに焦点を当て, 二量体を形成するコイルドコイル部分で切ったコンストラクトを用いていたが, 私はこの点に疑問を持ち, 全長に近いコンストラクトを用いてNcdが微小管上をマイナス端方向に向かって連続的に歩けることを発見した。Ncdの運動は二つの成分に分けられた。一つはATPを用いずに微小管上を一次元的に拡散する成分, もう一つは, 微小管のマイナス端に向かうバイアス

を生む、方向性のある並進運動の成分である。この運動は溶液中のイオン強度に強く依存しており、チューブリンの負に荷電したモチーフを除去した実験、Ncd の正に荷電したモチーフに変異を導入した実験から、これらのモチーフがお互いに相互作用することで、Ncd が微小管上につなぎとめられていることが示唆された。

一方、Pkl1 も他の kinesin-14 モーターと同様に連続的に運動できないと予想されたが、Ncd と同様に微小管上を一次元拡散運動しながらマイナス端方向に運動するモーターであることが分かった。Ncd と同様に低い duty ratio を持つ、つまり、ATPase サイクルの中で微小管と強く相互作用している時間が非常に短いことも明らかになった。最高速度は Ncd の半分以下であったが、意外なことに二量体の Pkl1 は微小管上での滞在時間が 19 秒と非常に長く、Ncd やキネシン-1 の 10 倍程度に達した。さらに、ほとんどモータードメインしか含まない単量体 Pkl1 の運動を同様に調べた結果、その滞在時間も 11 秒と十分長く、微小管上の長い滞在時間を実現しているモチーフはモータードメインの中にあることが示唆された。これら結果から Pkl1 が微小管上に常に弱く相互作用し、微小管上に並んだ Pkl1 が必要に応じて力を発生するような仕組みを想像することができる。

これらの一分子での運動は 5 mM 酢酸カリウム存在下という非常に低いイオン強度の条件下で観察されたものであり、生理的な条件下では異なる活性を示す可能性がある。そこで Ncd に関して、より生理的条件に近づけた 105 mM 酢酸カリウム存在下で運動活性を調べた。その結果、Ncd は一本の微小管の上

では有意なマイナス端方向への偏りが見られなかった。しかし、意外なことに、高いイオン強度の条件下でも束化した微小管上で



束化した微小管上での運動

(A)キモグラフ。斜めに走る輝点は微小管上を一方向に動いていることを示す。
(B) Axoneme(軸糸)から重合させた微小管束の顕微鏡像。

はイオン強度の場合と同様の連続的な運動を観察することができた。この運動を再現良く観察し、束化した微小管の極性をコントロールするために、軸糸から微小管を伸長させ、これを束化したものを用いた観察系を作製した。105 mM 酢酸カリウム存在下でも Ncd はこの微小管束の上を連続的に運動し、低イオン強度の場合と同様の活性を持つことが確認された。この系においては、微小管の極性が揃っていることから、この結果は少なくとも紡錘体の極に近い部分では Ncd は並行な微小管束の上を極に向かって連続的に運動できることを示唆している。細胞内では、微小管束は Ncd が微小管を架橋した結果の産物であることを考慮すると、Ncd は一本の微小管よりも架橋された微小管上により多く集まることによってさらに微小管の架橋を促し、自己組織的に紡錘体を形成するのに貢献している可能性が考えられる。

Ncd と Pkl1 の運動に共通するのは、その弱い運動連続性である。キネシン-1 のような高い運動連続性をもつモーターは、遠くまで確実に物を輸送する必要がある場面では有利であると考えられる。しかし、細胞分裂という、平時の細胞からみれば非常に特殊な状況では、大がかりな分裂装置を再現良く形成・維持しつつ、一方で染色体を二つの娘細胞に分配するというダイナミックな仕事を正確にこなす必要がある。このような固く、かつ柔らかい装置を実現するためには、個々の分子に複雑な機構を作っておくよりも、拮抗する複数の種類の分子の数を状況に応じて増減することで、バランスの取れた状態とバランスを失ったダイナミックな状態を自律的に作り出させる方が容易であろう。このため、おそらく分裂期の細胞は、フィードバック制御が掛かりやすい運動連続性の低いモーターを好んで使うだろうと考えられる。また、このような仕事を協調して行うためには、紡錘体で力を発生する各素子と細胞骨格との相互作用の強さは強すぎず弱すぎず、適度に緩くチューンナップされていなければならない。本研究の結果から示唆された、タンパク質の協同的な相互作用による組織化という新しい視点は、マクロな分裂装置を制御する機構を理解するための端緒になると考えている。