

論文の内容の要旨

論文題目 分子モーターキネシンの一方向性運動を決める仕組み

氏 名 磯島 広

人体や植物などの生物の細胞内では分子モーターと呼ばれるナノメートルサイズのタンパク質群が機能することで全体としての秩序が維持されている。これらのタンパク質はその精緻な動きから分子機械とも呼ばれ、その中でもキネシンは細胞内物質輸送に関わる分子機械で、ATPをエネルギーとして消費しながら微小管というレールの上を二足歩行運動することでタンパク質複合体やmRNAなどの荷物を一方向に輸送することができる。さらに、1つのATP加水分解で1歩ステップするという高効率な運動を実現していることが知られている(図1a)。しかし、熱揺らぎが支配的な環境において、キネシンがどのように連続的な一方向性運動を生み出しているのかは未だ解明されていない。

キネシンがATP結合によって一方向性を生み出す仕組みとして現在広く受け入れられているのは、2つの頭部をつなぐネックリンカーが構造変化することでステップを生み出すという「ネックリンカードッキングモデル」である。しかし、これだけではキネシンの発揮できる力を説明できないことや、後ろへの再結合が防止されるメカニズムを説明できないことなど、いくつかの問題点が存在する。それに対して最近我々の研究室は、「結合バイアスモデル」を提唱した。このモデルは、ネックリンカードッキングが前方へのバイアスを生み出すのではなく、浮いた頭部の結合がバイアスされることで前方でのみ結合できるというモデルである。我々は2量体の原子モデルからこれを説明するための構造基盤を明らかにした。具体的には、浮いた頭部が後ろに結合しようとするときネックリンカーは立体障害を迂回しなければならないのでネックリンカーに異常な張力が発生することになり、後ろへの結合は防止されている。一方、前方へ結合する際には張力は緩和するので前方での結合のみが許容される。このモデルはネックリンカードッキングなしで前方へのステップを説明でき、どちらの仕組みをキネシンが用いているかは実験的に検証されていなかった。

そこで、本研究の第一部では、ネックリンカードッキングは前方へのステップの仕組みとして必須かどうかを実験的に検証することを目的とした。具体的にはネックリンカードッキング依存的なステップとドッキング非依存的なステップを交互に繰り返す変異体(タンデムキネシン)を作成し、一分子レベルでの運動を観察することで検証した(図1b)。さらに第二部では、浮いた頭部が前方にス

テップする様子を直接計測するために、暗視野顕微鏡を用いた高時間分解能での測定で検証した。

第一部: タンデム変異体の一分子観察によるキネシンの前方へのステップ機構の解明

ネックリンカードッキング依存性のステップとドッキング非依存性のステップを交互に繰り返す変異体(タンデムキネシン)を作成し一分子蛍光観察を行なった。タンデムキネシンはATP存在下で一方向性の運動を示し、運動速度は117 nm/s程度で

あり野生型キネシン(~400 nm/s)の4分の1程度であった。次に、タンデムキネシンがHand-over-handで運動しているかを検証するために、それぞれの頭部を量子ドットで標識しナノメートル精度の蛍光イメージング法を用いることでステップの計測を行なった。その結果、どちらの頭部も16 nmステップを示したことから、タンデムキネシンはHand-over-handで運動することが確かめられた(図2)。これらの結果は、ネックリンカードッキング非依存性のメカニズムでも前方へのステップは可能であることを示しており、すなわち、ネックリンカードッキングは前方へのステップには必ずしも必須ではないことを直接示すものである。また、運動速度は野生型キネシンの4分の1程度であったことから、少なくともどちらか一方のステップは遅くなっていると予想される。

そこで次に、一分子FRET法で運動中のタンデムキネシンの頭部の位置関係を検出した。N末頭部のかかと(43番)とC末頭部のつまさき(215番)に標識した場合、FRET効率は長い時間90%をとり、時折10%へのスパイク状の遷移が検出された(図3)。90%の高いFRET効率を維持する時間は 84 ± 4 ms、10%の低いFRET効率を維持する時間は 21 ± 1 msであった。90%のFRET効率はC末頭部が後ろの両足結合状態、10%はN末頭部が後ろの両足結合状態に対応していることから、ネックリンカードッキング依存性のステップは遅く、一方でネックリンカードッキング非依存性(結合バイアス)なステップは速いことを示している。野生型キネシンの1ステップにかかる時間は20 ms程度であることから、これらの結果は、キネシンは結合バイアスを主に用いていることを示唆するものである。

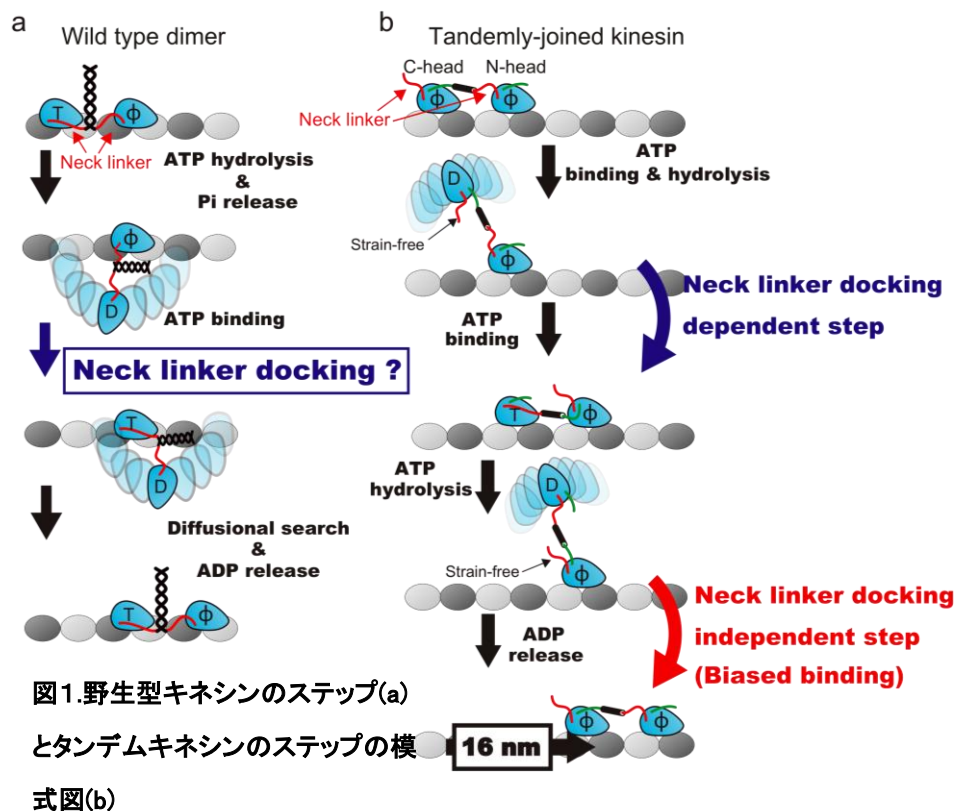


図1.野生型キネシンのステップ(a)

とタンデムキネシンのステップの模

式図(b)

第二部:暗視野顕微鏡を用いた高時間分解能計測によるキネシンのステップの直接計測

浮いた頭部の揺らぎを直接観察するためには μs 程度の高い時間分解能で計測する必要があるが(図4a)、従来の蛍光色素を用いた方法では、蛍光の退色や消光などの問題があり十分な蛍光強度を得られないために、ミリ秒程度が限度であった。そこで本研究では、蛍光ではなく金コロイドの散乱光を検出することで高い時間分解能で測定することにした。全反射型暗視野顕微鏡を用いてバックグラウンドノイズを抑えつつ金コロイドの散乱光をS/N良く検出し高速カメラで撮影することで $55 \mu\text{s}$ の時間分解能かつ 1.3 nm の中心位置精度を実現した。そこでこの系を利用して金コロイド標識したキネシン頭部の

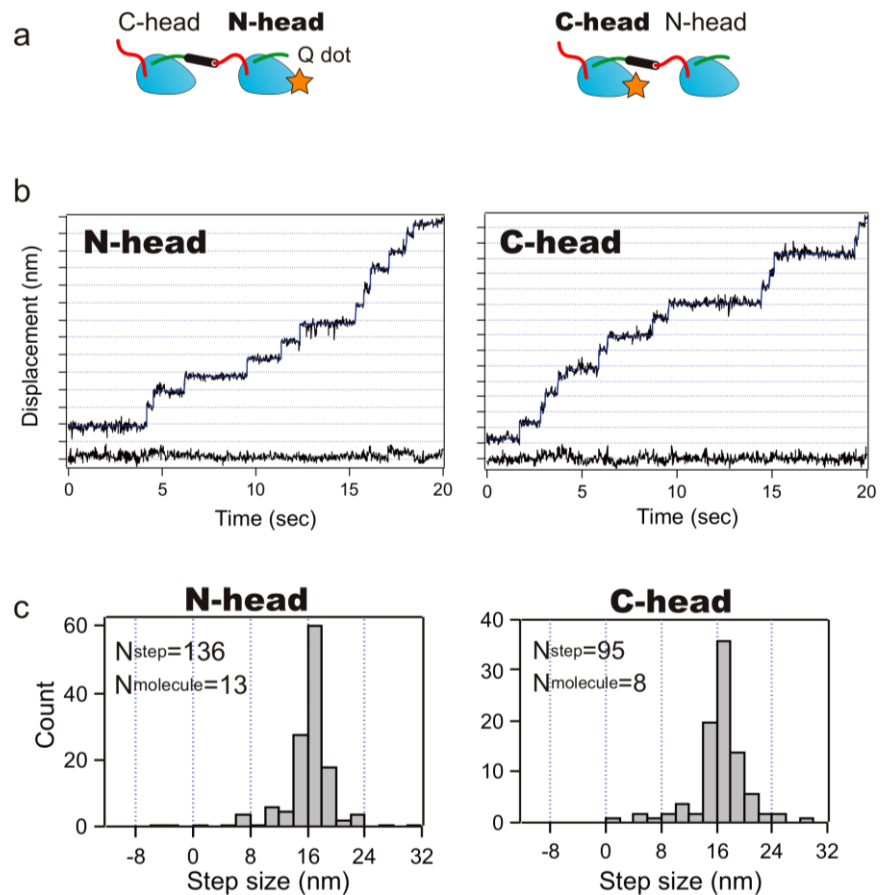
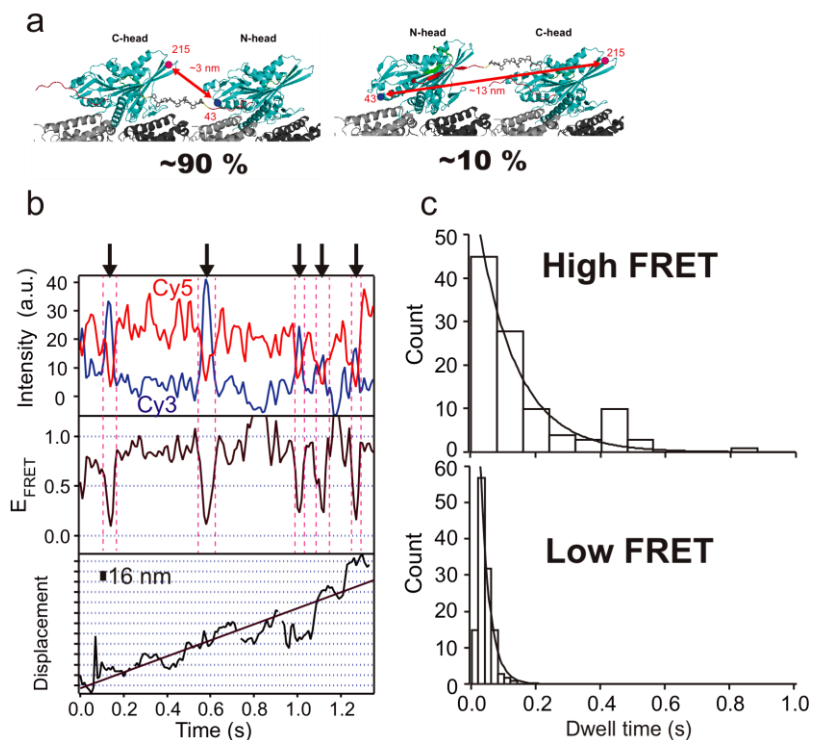


図2. ナノメートル精度の蛍光イメージング

(a) タンデムキネシンの量子ドット(Qdot)標識位置。N末頭部のつまさき(215)とC末頭部のつまさきをそれぞれ標識した。(b) $5 \mu\text{M}$ ATP存在下におけるトレース例。(c) ステップサイズのヒストグラム。

図3. タンデムキネシンの一分子FRET観察

(a) 頭部の位置関係とFRET効率を表した模式図。N末頭部のかかと(43)とC末頭部のつまさき(215)に標識することで、どちらの頭部が前であるかをFRET効率の違いで検出できる。(b) 1 mM ATP存在下におけるFRET効率のトレース(中段)。FRET効率は高い値から低い値にスパイク状に遷移していた(矢印)。(c) 高いFRET効率($>50\%$)を維持する時間のヒストグラム(上)と低いFRET効率($<50\%$)を維持する時間のヒストグラム(下)。どちらの分布も指数関数的に減少する関数でフィッティングすることができ、時定数はそれぞれ $84 \pm 4 \text{ ms}$ 、 $21 \pm 1 \text{ ms}$ であった。



ATP存在下での動きを観察したところ、On-axis方向には16 nmの離散的なステップが見られた(図4b)。一方、Off-axis方向に関しては揺らぎが一時的に増大しており、この状態は16 nmステップが完了する直前に起きていた(図4b赤)。

また、ATP濃度を下げると揺らぎの増大する時間も長くなったことから、この状態はATP待ち状態に対応することを示しており、ATP待ち

は片方の頭部が浮いたUnbound状態であるという過去の知見と一致する。さらに、Unbound状態の揺らぎの分布を調べたところ結合サイトに対して常に右側で揺らいでいることが明らかになった(図4c赤)。この結果は、ネックリンカーの付け根が右側に位置するというキネシンの構造を反映していると考えられる。また、Unbound状態における金コロイドの揺らぎの分布を詳細に分析したところ、金コロイドは前方にアクセスできるほど広い分布を示した(図4c赤)。この結果は、ATP待ちの間も浮いた頭部は前方の結合サイトへアクセスできるが前方でのADP解離および微小管への結合が阻害されているという、結合バイアスモデルを支持するものである。

まとめると、キネシンがどのような仕組みで前方へのステップを実現しているのかを明らかにする目的で、タンデムキネシンの一分子観察と高時間分解能測定を行なった。第一部では、ネックリンカードッキングは前方へのステップの仕組みとして必須ではないことが明らかになった。第二部では、浮いた頭部が前方にステップする様子を55 μ sの分解能で直接計測することに成功し、浮いた頭部は前方にアクセスできるぐらい広い分布を持つことが示された。これらの結果は、キネシンは揺らぎを無理矢理制御しているのではなく、揺らぎを巧みに利用しながら一方向性を生み出すという分子モーター特有の機構を持っていることを示すものである。

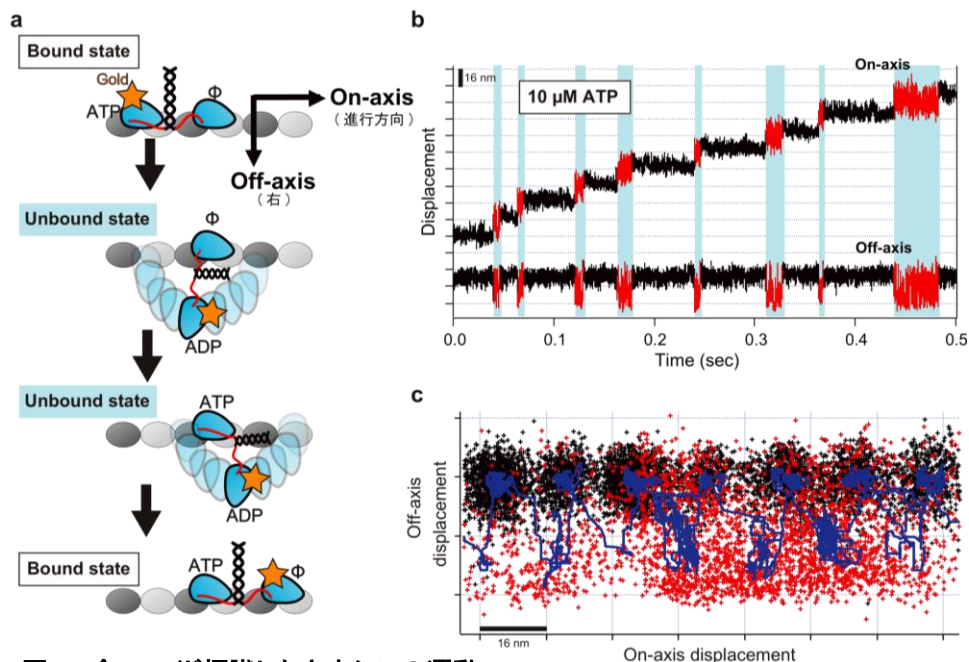


図4. 金コロイド標識したキネシンの運動

(a) ステップの模式図。進行方向をOn-axis成分、垂直な方向をOff-axis成分とした。(b) 10 μ M ATP条件下におけるトレース。揺らぎの大きい状態を赤で表示した。(c) On-axis成分を横軸、Off-axis成分を縦軸で表示した二次元トレース。青線は51frameでアベレージをとったもの。