

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07022

研究課題名(和文)キネシンの運動方向を決定する分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of direction of kinesins

研究代表者

矢島 潤一郎 (Yajima, Junichiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00453499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内で微小管上をそのプラス端方向に移動するキネシンとマイナス端方向に移動するキネシンそれぞれの単量体型及びキメラタンパク質を作成し、運動方向を決定する部位の特定を試みた。運動計測の結果、そのキネシンがプラスモーターであってもマイナスモーターであっても、キネシンのモーターコア自体は、プラスモーター特性を持つことを見出した。プラスモーター特性を持つキネシンをマイナスモーター特性を持つキネシンに変換するためには、モーターコアのC末端側のネックミミック領域とN末端側の適切な相互作用が重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We made the minimal motor domain constructs for plus-ended kinesins, minus-ended kinesins and kinesin-1 - kinesin-14 chimeras. Kinesin monomers were engineered such that they could be anchored via either their N- or C-termini, leaving the opposite terminal regions mechanically disconnected from the surface. We find that the conserved catalytic motor core of minus-end-directed motor kinesin-14 has intrinsic plus-end directionality and that the proper interaction of the C-terminal neck-helix region and the N-terminal neck-mimic region are required to achieve minus-end directionality.

研究分野：生物物理

キーワード：キネシン 微小管 バイオナノマシーン Ncd

## 1. 研究開始当初の背景

微小管依存性モータータンパク質・キネシンは、14のサブファミリーに分類される。アミノ酸N末端側にモーター領域を持つキネシンは、微小管のプラス端方向に移動し(+モーター)、C末端側にモーター領域を持つキネシン(kinesin-14)は、微小管のマイナス端方向に移動する(-モーター)。キネシンの運動方向決定機構の解明を目指した過去の研究では、+モーターのキネシン-1と-モーターのキネシン-14のキメラタンパク質を用い、モーターコアに十分な長さのネックを付け替えると、微小管を滑らす方向が逆になることが示され、運動方向決定部位の特定が試みられてきた。しかしながら、運動方向を評価したキメラのシリーズも不十分であり、運動方向がモーターコアで決まるのか、ネックで決まるのか、未だに決着がついていない(Henningsen et al. 1997 *Science*, Case et al. 1997 *Cell*, Endow et al. 1998 *Science*, Sablin et al. 1998 *Nature*)。さらに、近年、多分子のモータータンパク質が運動に関わる場合は+モーターであり、1(少数)分子で運動する場合は-モーターとなるキネシン-5やkinesi-14が報告されたが(Roos et al. 2011 *Science*)、分子数に応じて運動方向を変える分子機構の解明には至らず、キネシンの運動方向がどのように決定されるのか、一層謎が深まった。

## 2. 研究の目的

微小管上をプラス端方向に移動するキネシン-1とマイナス端方向に移動するキネシン-14とのキメラタンパク質の運動観察により、運動方向を決定する部位の特定が試みられた。しかしながら、運動方向決定部位の共通認識には至らず、キネシンが微小管上で運動方向を決定する分子機構は、未だ解明されていない。そこで本申請研究では、キネシンが運動する最小の構成要素である単量体型のキネシンを用い、(1)キネシンの固定端による運動性の検証を行い、(2)+モーターと-モーターのキメラキネシンを構造的な基盤に基づき網羅的に作成して運動方向の決定にかかわる重要な部位を同定し、(3)少数分子で機能した場合に運動方向が逆転する分子機構を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1)野生型キネシン及びキメラキネシンの作製。運動の最小構成要素であるモータードメインのみからなるDNAコンストラクトを作成し、大腸菌内で発現させた。可溶化しない場合は、ヒト培養細胞で発現させた。また、種差による比較を行うため、酵母、シヨ

ウジョウバエ、カエル、ラット、アカパンカビ、ヒトのキネシンを作成した。また、キネシンをN末端部位、モーターコア、C末端部位の3つのドメインに分類し、+モーターと-モーターのキメラキネシンを網羅的に作成した。1分子のキネシンの運動を計測するために、位置測定マーカーとして、各コンストラクトにGFPを融合させるか、Cy3やDNAオリゴを化学修飾できるDNAコンストラクトを作成し、発現・精製した。

### (2)野生型キネシン及びキメラキネシンの運動方向の計測

運動観察・計測システムの構築。キメラキネシン等によって駆動される運動速度が非常に遅いため、環境の温度変化による顕微鏡自体のドリフトは、運動計測の定量性を損なう。ドリフトを低減させるため、温度制御可能なチャンバーを設計・構築した。また、細胞内に置かれている微小管の配置に近い状態にした単量体型キネシンの運動測定系のため、三次元位置測定顕微システムを導入した。

キネシン1分子駆動、少数分子駆動、多分子駆動のそれぞれで起こる運動の計測。1分子のキネシンの運動を計測するために、全反射顕微システムを構築した。少数分子をDNAオリガミに固定することで、分子数の制御を行った。多分子での運動は、キネシンをガラス面に固定し、微小管がそれらの上を滑り運動する方向を観察する方法か、キネシンを直径数百ナノメートル程度の微小ビーズに固定し、丸太橋状に固定した微小管のあらゆる側面で運動させ、ビーズが微小管に沿って運動する方法を用いた。

### (3)クライオ電子顕微鏡によるキメラキネシンの構造解析

+モーターと-モーターのキメラキネシンのネック部位やネックヘリックス部位の詳細な構造を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡によるキメラキネシンの構造解析を行った。構造解析は、理化学研究所・仁田亮博士との共同研究として行った。

## 4. 研究成果

### (1)キネシンの運動方向を決定する分子機構の解明のためのコンストラクトの作製。

野生型キネシン(kinesin-1,2,3,5,6,10,14)は大腸菌かHEK細胞かのどちらかで発現でき、光学顕微鏡下での運動計測に十分な濃度及び純度の高い試料を得ることができた。

キメラキネシンは、変異体も含め20種類のDNAコンストラクトを作成した。13のコンストラクトについては、運動活性を定量した。

### (2)キネシンモーターコアに内在する運動

方向性の検証。

野生型キネシンのうち、-モーターの kinesin-14 は、ガラス面やビーズ面に固定するアミノ酸末端を変えると運動が逆転することが世界で初めて明らかになった。研究成果は bioRxiv で公開中である (Plus-end directionality is present in the catalytic core of kinesin-14 minus-end directed motors. doi:https://doi.org/10.1101/292375.)。さらに、繊毛内の物質輸送にかかわる kinesin-2, 細胞分裂において、紡錘体の構築にかかわる kinesin-5, 中央紡錘体の機能にかかわる kinesin-6, 染色体の運搬にかかわる kinesin-10 についても、開発した運動計測系で、運動特性の定量を行った。

キメラキネシンを用いて、+モーターを -モーターに変換する部位の同定をすることができた。Kinesin-14 に特徴的な N 末端側のネックヘリックスだけでは、-モーターとして機能せず、ネックヘリックスとは逆の C 末端側のネックミミック部位が、マイナス端方向の運動には重要であった。モーターコアとネックミミックのリンカー領域の間の 5 残基のアミノ酸が、-モーターの機能を発揮するためには必須であった。また、(2) の項目で行った微小管の滑り運動の長時間計測実現のために必要であったドリフトを低減した計測系が確立でき、今後、0.1~0.01nm/s 程度の運動速度のモータータンパク質の運動性の計測にも応用が可能である。

(3) クライオ電子顕微鏡によるキメラキネシンの構造解析。従来よりも高い空間分解能のキメラキネシンの構造情報が得られ、モーターコアとネックミミックの間の 5 残基が、ネックヘリックスと相互作用していることが明らかとなった。kinesin-14 に特徴的なネックヘリックスが適切に機能することで、微小管のマイナス端側に運動するキネシンの分子メカニズムの一端が明らかになった。前項で得られたキメラキネシンの運動方向性の結果と構造情報とを合わせ、キネシンの微小管上での運動方向をプラスモーターからマイナスモーターに逆転させるためには、従来の運動方向を決定するモデルとは異なり、ネックヘリックスとモータードメインの相互作用だけではなく、ネックヘリックスと C 末端ネックミミック領域の相互作用も関わっていることがわかった。

(4) 運動に関与するキネシンの分子数に応じ、運動方向が逆転すると報告されている kinesin-14 及び kinesin-5 の単量体型キネシンの運動方向性の検証。

kinesin-14 及び kinesin-5 の単量体型では、分子数の違いに応じて、運動方向を変えることはなく、常に同じ方向性を保持していることが明らかになった。分子数による運動方向のスイッチングは、二量体型のキネシン

を構成する必要があることが示唆された。

運動に関与する分子数が増すにつれ、微小管の長軸上を拡散しながら運動するビーズの割合が減り、微小管上を一方方向に運動するようになった。微小管の短軸側方向の運動では、運動にかかわる分子数の違いによる運動性の差は検出されなかった。しかしながら、キネシンが単量体型であるか、二量体型であるかで違いが生じる結果となった。単量体型キネシンでは、微小管側面を拡散的に運動し、二量体型のキネシンでは、一方方向性の運動性を示唆する結果を得た。

(5) 単量体型及び二量体型キネシンを 1 分子及び少数分子のチームとして運動定量できる実験系の構築。

DNA オリガミの技術を用いて、キネシン分子の分子数とキネシン分子間の相対的な立体配置 (数ナノメートル間隔で配置可能) とを制御する系の開発を行い、キネシン分子間に働く相互作用機構の可能性を検証した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Dissection of the angle of single fluorophore attached to the nucleotide in corkscrewing microtubules. Fujimura S, Ito Y, Ikeguchi M, Adachi K, Yajima J, Nishizaka T. *Biochem Biophys Res Commun*. 485:614-620. (2017)  
DOI:10.1016/j.bbrc.2017.01.16 (査読有)

Structural Basis of Backwards Motion in Kinesin-1-Kinesin-14 Chimera: Implication for Kinesin-14 Motility. Yamagishi M, Shigematsu H, Yokoyama T, Kikkawa M, Sugawa M, Aoki M, Shirouzu M, \*Yajima J, and \*Nitta R. *Structure*. 24:1322-1334. (2016)  
DOI:10.1016/j.str.2016.05.021 (査読有)

[学会発表](計 3 件)

山岸雅彦、矢島潤一郎、キネシンの運動方向を決定する共通機構、第 69 回日本生物物理学会 (招待講演)、2017 年 6 月 5 日~8 日、東北大学、仙台市

Yohei Maruyama, Akihiko Sato, Tim Davis, Toshihisa Osaki, Shin Yamaguchi, Shoji Takeuchi, Masanori Mishima, Junichiro Yajima. The left-handed spiraling movement of mitotic kinesin-6. Biophysical Society 60<sup>th</sup> annual meeting (国際会議) 2016 年 2 月 27 日~3 月 2 日、アメリカ合衆国、ロサンゼルス

丸山洋平、佐藤秋彦、Tim Davis, 大崎寿

久、山口真、竹内昌治、三嶋将範、矢島潤一郎、分裂期 kinesin-6 の並進回転運動機構、生体運動合同班会議、2016年1月8日～10日、キャンパスプラザ京都、京都市

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )

〔図書〕(計 1件)

少数性生物学 - 永井健治・富樫祐一 編、少数での動き。矢島潤一郎 日本評論社 p103-110. (2017) < 著書・分担 >

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/laboratories/Yajima.html>

プレスリリース

東京大学

<http://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/files/20160722topics.pdf>

理化学研究所

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160722\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160722_1/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

矢島潤一郎 (Yajima, Junichiro)  
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授  
研究者番号：00453499

### (2)研究分担者

須河光弘 (Sugawa, Mitsuhiro)  
東京大学・大学院総合文化研究科・助教  
研究者番号：80626383

### (3)連携研究者

( )