

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16083204

研究課題名（和文） キネシンによる細胞内輸送の制御機構の解析

研究課題名（英文） Regulation mechanism of the intracellular transport by kinesin

研究代表者

富重 道雄 (TOMISHIGE MICHIO)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号 50361530

研究成果の概要：運動中の分子モーターキネシンの構造変化を、蛍光共鳴エネルギー移動法を用いて一分子レベルで検出する方法を開発した。この方法を用いてキネシンの協調的二足歩行運動を引き起こす構造的基盤を明らかにした。また2種類の分子モーターを混合した微小管滑り運動系や2分子のキネシンの特異的架橋のアッセイ系を確立し、これらを用いて複数分子モーター間の協調性を定量的に解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	20,700,000	0	20,700,000
2005年度	20,900,000	0	20,900,000
2006年度	19,000,000	0	19,000,000
2007年度	6,600,000	0	6,600,000
2008年度	5,400,000	0	5,400,000
総計	72,600,000	0	72,600,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：分子モーター、一分子計測、蛍光観察、蛍光共鳴エネルギー移動、構造変化

1. 研究開始当初の背景

1 分子計測技術の進展によってモータータンパク質の機能が明らかにされつつある。しかし、これらの分子が協調して働いた時に生まれ出てくる、分子間の協調性や時間・空間制御といった、生命システムにおける機能の解明は進んでいない。生命システムの構築原理を理解するためには、システム内でタンパク質の活性状態をリアルタイムに検出する方法が求められている。そこで本研究では、分子モーターキネシンによる細胞内輸送の時間・空間的制御をイメージングするための手法の開発と応用を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、蛍光エネルギー移動(FRET)法および蛍光一分子の偏向方向検出法を用いて細胞内でのキネシン分子の活性状態および運動を一分子レベルでリアルタイムに観察する手法を開発し、この方法を用いて小胞やオルガネラの輸送に関わるキネシンが、いつどこで活性化され、どのような経路で輸送を行い、いつどこで不活性化されるのか、すなわち、細胞内輸送システムの時間・空間的な制御の仕組み、を明らかにすることを目的とする。

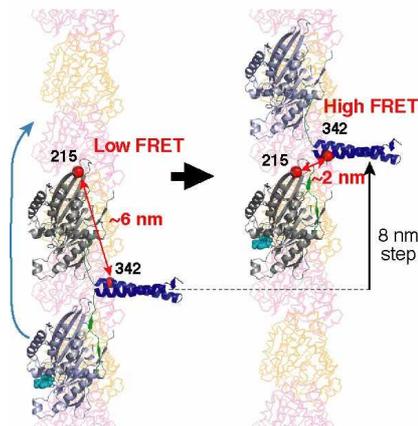
3. 研究の方法

キネシンの構造変化を検出するために、蛍光共鳴エネルギー移動（以下 FRET と略す）法を用いた。キネシンに2種類の蛍光色素を導入するために、反応性のシステインを遺伝子工学的にキネシンの任意の場所に導入し、これらのシステインを蛍光色素で標識する。蛍光標識したキネシンが微小管上を運動していく様子を全反射顕微鏡を用いて一分子レベルで観察する。FRET 効率を測定するためには、ドナーとアクセプターの蛍光を分光して一つのカメラ受光面に同時に投影し、ドナーとアクセプターの蛍光強度の比率を計測した。

4. 研究成果

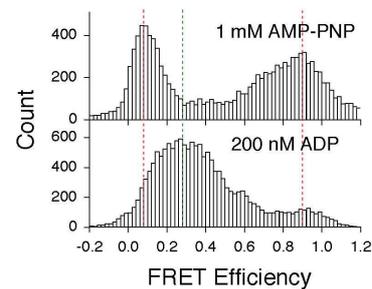
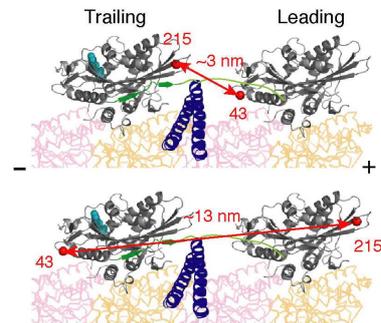
(1) *in vitro* で運動中のキネシンの構造変化を一分子レベルで検出するための方法を開発した。具体的には、機能を損なうことなくキネシン二量体の二か所に蛍光色素を導入する方法を確立し、色素間の FRET 効率を一分子レベルで測定する顕微鏡システムの確立を行った。この顕微鏡システムを用いて、Cy3 と Cy5 で標識されたキネシンを観察し、一分子レベルで FRET 効率を検出することに成功した。

(2) (1)で確立した手法を用いて、キネシンの2つの頭部をつなぐリンカー部位（ネックリンカー）の構造変化を検出した。その結果、運動中にネックリンカー部位は構造変化し、2つの構造状態の間をステップする毎に遷移することを示した。これは運動中のキネシンの構造変化を一分子レベルで直接検出した初めての例である。



(3) 2つの頭部に一つずつ結合させた色素間の距離を一分子 FRET 法で測定することによって、キネシンの両足結合状態と片足結合状態を区別して検出することに成功した。さらにこのプローブを用いて、運動中のキネシンが片足をついた状態と両足をついた状態を交互に取りながら歩行している様子を可視化し、その結果 ATP 結合を待っている状態

ではキネシンは片足結合状態を取り、ATP が結合することで両足結合状態に移行することを示した。これにより ATP 加水分解とキネシンの構造変化との間の相関を明らかにすることができた。



(4) ネックリンカーを遺伝子工学的に伸ばすことにより2つの頭部間にかかる負荷を軽減させたところ、運動速度が低下し、ATP加水分解反応を効率的にステップ運動に結びつけることができなくなった。また野生型と異なり浮いた頭部がATP結合前にすぐに微小管に再結合してしまうこと、さらにこの状態では両方のネックリンカーが後ろを向いていることを示した。これらの結果は、ネックリンカーにかかる負荷によってネックリンカーの向きが制御されており、これが2つの頭部の前後位置を認識する上で重要であることを示唆するものである。

(5) ATPを加水分解できずネックリンカーのドッキングに欠陥がある変異体（R203K）と野生型のヘテロダイマーの運動中の構造変化を一分子FRET法で観察したところ、ゆっくり連続的に運動するものの、変異体頭部が後ろ足であるような両足結合状態を長く取っていることを明らかにした。この結果はネックリンカーのドッキングは浮いた頭部を前に一歩進めるのに必ずしも必須ではないことを示唆するものである。

(6) 高速FIONA法を用いて最良で3 nmと2 msの空間・時間分解能でキネシンに結合させた蛍光色素一分子の運動を追跡することに成功した。この方法を用いてキネシンの運動を2次元的に解析し、3%程度の頻度で横方向にステップすることを見いだした。

(7) 新しい原理の3次元顕微鏡を開発し、F1-ATPaseや滑走性バクテリア等の3次元的な運動を観察した。

(8) 粒子の3次元の変位を高精度で検出できる光学顕微鏡を応用して単頭のキネシン-1やキネシン-3による微小管の滑り運動を観察し、微小管が~300 nmのピッチの左ネジ回転を行っていることを明らかにした。

(9) 互いに逆向きに運動する2種類のモータータンパク質(キネシンとダイニン、もしくはキネシンとncd)を様々な比率で混合した系での微小管滑り運動を観察した。逆向きのモーターが運動の負荷になりうることを、またまれに微小管の振動を引き起こすことを明らかにした。この結果は、キネシンとダイニン・ncdは互いの運動に対して負荷をかけうることを示すものである。

(10) 細胞内輸送において一つの輸送小胞に結合した複数のキネシン分子の間で生じる協調性を調べるための最も単純な実験系として、2分子のキネシン2量体を架橋した複合体を作成した。ラパマイシンによって誘導されるFKBPの架橋反応を利用することによって、2つのキネシン分子を特異的にクロスリンクすることに成功した。架橋されたキネシンの運動速度は一分子のものと同様であったが、移動距離は1.5倍上昇した。この結果は、架橋された2分子は互いの運動を抑制することなく何らかの仕組みで協調しあっていることを示唆するものである。

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11件)

A. Yildiz, M. Tomishige, A. Gennerich, and R. D. Vale. Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134, 1030-1041 (2008). 査読有

J. Yajima, K. Mizutani, T. Nishizaka. A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1119-1121 (2008). 査読有

M. Tomishige. Activation of mitotic kinesin by microtubule bundling. *J. Cell Biol.* 182, 417-419 (2008). 査読無

富重道雄, 細胞内輸送を担う分子モーターの運動機構、*生体の科学*, 59, 362-363 (2008). 査読無

T. Mori, R. D. Vale and M. Tomishige, How

kinesin waits between steps. *Nature* 450, 750-754 (2007). 査読有

T. Nishizaka, K. Mizutani and T. Masaike, Single molecule observation of rotation of F₁-ATPase through micro beads.

Methods Mol. Biol. 392, 171-181 (2007). 査読無

M. Tomishige, N. Stuurman and R. D. Vale, Single molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 887-894 (2006). 査読有

富重道雄, 一分子計測法によって明らかになったモータータンパク質キネシンの二足歩行の仕組み、*物性研究*, 85, 624-629 (2006). 査読無

富重道雄, 二本足で歩くタンパク質キネシン、*Bionics*, 2, 64-70 (2005). 査読無

A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale and P. R. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* 303, 676-678 (2004).

T. Nishizaka, K. Oiwa, H. Noji, S. Kimura, E. Muneyuki, M. Yoshida and K. Kinoshita Jr. Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 142-148 (2004).

[学会発表](計30件)

T. Mori, M. Nakajima and M. Tomishige. Processive motility of heterodimeric kinesin that has defect in the neck linker docking. 53rd Annual Meeting of Biophysical Society, March 1, 2009, Boston, MA, USA

磯島広、豊北祐士、森徹平、富重道雄、キネシンの協調的な二足歩行運動に対するネックリンカーの役割、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月4日、福岡国際会議場

尾世川麻里奈、小橋川翔太、森徹平、富重道雄、単頭と双頭のキネシン分子モーターによる協調的運動、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月3日、福岡国際会議場

M. Tomishige, Single molecule observation of conformational changes of kinesin, 2nd International Symposium on Bio-nanosystems. November 2, 2008, The University of Tokyo, Tokyo

富重道雄、微小管上を歩く分子モーターキネシンの運動の仕組み、第30回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会、2008年10月15日、北海道大学学術交流会館

T. Mori, R. D. Vale and M. Tomishige, Single molecule FRET observations of nucleotide-dependent configuration

changes of kinesin dimer, Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysical Congress, February 5, 2008, Long Beach, CA, USA

M. Tomishige, N. Stuurman and R. D. Vale, Single molecule FRET observations of structural changes in the neck linker of kinesin, 51st Annual Meeting of Biophysical Society, March 5, 2007, Baltimore, MD, USA

T. Mori, R. D. Vale and M. Tomishige, Conformation of kinesin dimer at ATP-waiting state probed by single molecule FRET. 51st Annual Meeting of Biophysical Society, March 6, 2007, Baltimore, MD, USA

M. Tomishige, Single molecule observations of structural changes in a "walking" motor protein. Ninth Annual Japanese American Kavli Frontiers of Science Symposium, December 9, 2006, Beckman Center, Irvine, CA, USA

H. Tsurusawa, H. Tadakuma, T. Shima, R. Ohkura, T. Kon, K. Sutoh and M. Tomishige, Observation of the tug of war movement of microtubules by kinesin and dynein molecules in vitro, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan, November 15, 2006

藤原弘章、多田隈尚史、富重道雄、逆向きに運動するモーター蛋白質による微小管の綱引き運動の蛍光顕微鏡観察、第43回日本生物物理学会年会、2005年11月23日、札幌コンベンションセンター

M. Tomishige, Single molecule observation of structural changes of kinesin. 61st Harden Conference - Molecular Motors Structure and Function. September 19, 2005, Cambridge, UK

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富重 道雄 (TOMISHIGE MICHIO)
東京大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号：50361530

(2)研究分担者

西坂 崇之 (NISHIZAKA TAKAYUKI)
学習院大学・理学部・教授
研究者番号：40359112