

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05119

研究課題名(和文)キネシンは、なぜ40種以上もあるのか？

研究課題名(英文)Why are there more than 40 kinesins in our genome?

研究代表者

岡田 康志 (Yasushi, Okada)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：50272430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内物質輸送を担う主要な分子モーターはキネシンと細胞質ダイニンである。キネシンは、ヒトのゲノム上に40個以上の遺伝子が存在し、ほとんどは微小管のプラス端方向へと運動し、遠心性の輸送を担う。一方、細胞質での求心性の輸送を担うダイニンは1個しかない。何故ダイニンは1個で十分なのに、キネシンは40個以上も必要なのだろうか？本研究の結果、キネシン頭部は、生理機能に応じて運動特性が分子進化により変化してきたとともに、キネシンの種類毎に異なる制御によって、生体内で必要な時・場所で輸送を行うなどの生理機能を実現していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内輸送とくに軸索輸送の機能低下は、さまざまな神経変性疾患の原因となると考えられている。したがって、軸索輸送を担う分子モーターの構造や運動特性と、細胞・個体レベルでの表現型の関係を理解することは、神経変性疾患の病態を理解するためにも重要である。本研究では、軸索輸送を担う分子モーターであるキネシンに多数の種類があることに着目し、その構造の違いと機能の関係を分子レベルの運動機能解析と個体レベルの表現型解析を組み合わせることで検討した。その結果、細胞・個体内での運動特性の定量解析手法が開発され、運動速度を向上させる新たな変異体が同定されるなど、将来の診断・治療の基礎となる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Kinesin super-family proteins convey intracellular transport of membrane organelles and other molecules, mostly toward the plus-end of the microtubules. There are more than forty kinesin-superfamily protein genes in our genome, while there only one gene for the cytoplasmic dynein, which conveys the intracellular transport of the opposite direction to kinesins. This project aims to answer the simple question: why more than 40 kinesin genes are required, while only one gene is enough for dynein? Series of our studies in this project have suggested that the head motor domain of kinesin might have evolved to meet the physical requirements (for example, force or velocity) for the biological functions. We have also demonstrated that the motor domain also plays essential roles in the family-specific regulations, which would enable to convey the family-specific biological functions at the proper time and positions in vivo.

研究分野：生物物理学、細胞生物学

キーワード：軸索輸送 分子進化 キネシン ゆらぎ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内物質輸送を担う主要な分子モーターはキネシンと細胞質ダイニンである。我々はこれまで、キネシンは、ヒトのゲノム上に 40 個以上の遺伝子が存在し、ほとんどは微小管のプラス端方向へと運動し、遠心性の輸送を担うことを示してきた (J Cell Biol 1994, 1995, 1998; Cell 1994, 1995, 1998; Neuron 1997; PNAS 1996, 1997)。一方、細胞質での輸送を担うダイニンは 1 個しかない。何故ダイニンは 1 個で十分なのに、キネシンは 40 個以上も必要なのだろうか？

我々は、分子進化解析により、キネシンの 14 種分類を提案し、標準化呼称として採用されている (Curr Op Cell Biol 1997; J Cell Biol 2004; Trends Cell Biol 2005)。この分類において、積荷の特異性を担う尾部による分類は、微小管上での運動を担う頭部による分類と一致し、共進化が示唆される。また、マウス・ヒトでは 3 個しかないマイナス端方向へ運動するキネシン (kinesin-14) は、ダイニンのない高等植物では 20 個以上存在する。ダイニンの代替として機能分化したと考えられる。このことから、キネシン頭部はその荷物に適した運動特性に分化している可能性が示唆されるが、その具体的な詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、キネシンの分子進化的多様性の生理的意義の解明を目的として、細胞内などの生理的な条件下でのキネシンの運動特性解析手法の開発、および、これと平行して異なるキネシン間でのキメラやキネシン頭部の変異体を用いた個体レベルでの表現型解析を行い、これを統合することでキネシンの運動特性と表現型の関係を追求し、キネシン分子のアミノ酸配列、運動特性、生理的意義の関係を解析する。

3. 研究の方法

これまでの予備的な検討から、キネシンの *in vitro* での運動特性は、必ずしも細胞内での運動特性と一致しないことが示唆されており、細胞内での計測が重要であると考えられる。そこで、我々は、高い時間分解能・空間分解能でキネシン分子の運動や輸送される積荷である小胞の運動を計測するための顕微鏡を開発・改良する。また、このような計測結果を解析し、運動特性を定量的に記述するために、非平衡統計力学のゆらぎの定理を利用した解析を行い、キネシン分子および積荷の速度ゆらぎから発生力などの力学的運動特性を推定する手法を確立する。

一方、表現型解析の基盤として、遺伝的操作と個体レベルでの表現型解析が容易な *C. elegans* を用いる。上記計測・解析手法を *C. elegans* へ適用するための改良を行う一方、ゲノム解析手法を用いてキネシン遺伝子のキメラ化あるいはキネシン頭部への変異導入を行い、その表現型を解析する。

4. 研究成果

計測のための顕微鏡の開発・改良では、時間分解能 10 ミリ秒、空間分解能 100 nm で生きた細胞内での小胞の運動を観察することが出来る独自開発の超解像顕微鏡 (SDSRM, Hayashi and Okada 2015、文部科学大臣表彰科学技術賞) を改良し、時間分解能を 5 ミリ秒と 2 倍に改善するとともに、フォトン利用効率を 4 倍以上向上させ実測値で 5.5 倍の高感度化に成功した (図 1)。また、細胞内での安定した一分子計測のため、光褪色を起こしにくい超耐光性近赤外蛍光色素を新規に開発した (Angew Chem 2018)

また、このような顕微鏡技術の開発・改良をベースに、細胞内および *in vitro* での一分子計測、X 線回折やクライオ電子顕微鏡を組み合わせることで、キネシンの種類毎の頭部の構造のわずかな違いは、単に運動特性の違いを生むだけではなく、微小管との結合時に微小管自体の構造変化を引き起こし (図 2)、逆に微小管の構造の違いを読み取る (図 3) など、微小管との相互作用に関し、各キネシンの荷物を正しい目的地へと運び分けるという機能に関与していることが示唆された (J Cell Biol 2018)。

細胞内での運動特性解析については、神経軸索でのエ

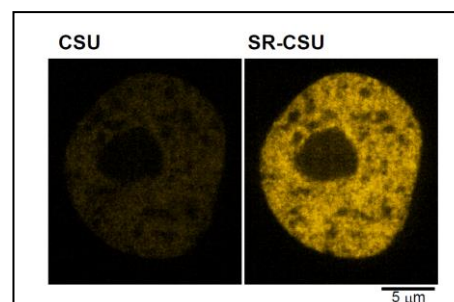


図 1. SDSRM の改良
約 5 倍の高感度化に成功

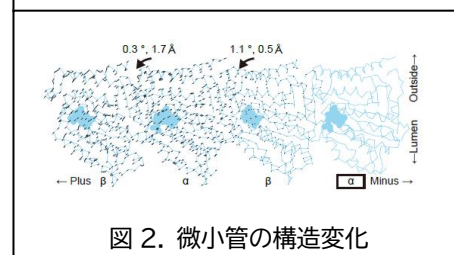


図 2. 微小管の構造変化

ンドソーム輸送および魚類表皮の黑色素細胞でのメラニン色素顆粒の輸送をモデル系として解析手法の確立を行った。時間分解能 10 ミリ秒、位置精度 8 nm の高速高精度計測を行い、その結果を非平衡統計力学の揺らぎの定理

$$F_d = k_B T_{eff} \frac{\ln[P(\Delta x)/P(-\Delta x)]}{\Delta x}$$

を用いて解析した。その結果、キネシン(図 4)およびダイニンの細胞内での力速度関係を推定することに成功した(MBoC 2018, Sci Rep 2019)。

線虫 *C. elegans* における運動特性と表現型解析のモデルシステムとして、kinesin-1 (unc116) 依存の細胞質流動現象の定量的イメージングを確立し、その数理モデルを作成した(Nat Cell Biol 2017)。

さらに、この数理モデルからは、キネシンの運動速度が重要であることが示唆されるため、kinesin-1 の 2 倍程度速く運動する kinesin-3 の頭部を kinesin-1 に導入したキネシン遺伝子(unc104::unc116)を作成し、キメラ型キネシンの解析の雛形とした。野生型の unc116 遺伝子を、このキメラ遺伝子と置き換えた線虫は致死であった。受精後に起こるべき細胞質流動が受精前から生じていることから、キネシンの種類毎の頭部の構造の僅かな違いは、単に運動特性を変えるだけではなく、生体内での必要な時、場所で輸送を行うといった適切な制御を行うためにも重要であることが示唆された。

このように、微小管構造変化に関する結果および線虫の表現型から、単純なキメラ化によって大きく構造を入れ替えると、運動特性だけではなく様々な制御系との相互作用も変化することが予想され、特に個体レベルの表現型解析において、後者の影響が無視し得ないと考えられた。そこで、運動特性を変化させる最小限の変異の導入に注力することとした。

これまで、運動活性を低下させる変異は数多く知られているが、運動活性を上昇させる変異はほとんど報告がない。そこで、我々は、キリンのような大型動物に着目した。大型動物の神経軸索は、マウスなど小型動物に比べて長く、長距離の輸送を担うキネシンの運動活性が高いのではないかと予想した。そこで、キリンのゲノムを解析し、キネシン遺伝子を同定し、その配列をマウスおよびヒトなどのキネシン遺伝子と比較したところ、進化的に保存された 3ヶ所の変異を発見した。この変異を導入したキネシンは、*in vitro* でマウス・ヒトのキネシンより速く運動することが示された。3ヶ所の同じ変異は、キリンと進化的に遠縁のニシキヘビにも生じており、大型動物での長距離輸送を担うために運動活性を向上させる収斂進化の可能性が示唆された。また、対応する変異を導入した線虫では、細胞質流動の速度上昇が認められ、この変異が *in vivo* でもキネシンを高速化し、表現型に影響することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Hasegawa S, Sagawa T, Ikeda K, Okada Y, Hayashi K. Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using fluctuation unit χ . Sci. Rep 9: 5099, 2019 査読あり doi:10.1038/s41598-019-41458-w
2. Hayashi K, Tsuchizawa Y, Iwaki M, Okada Y. Application of the fluctuation theorem for non-invasive force measurement in living neuronal axons. Mol Biol Cell, 29:3017-3025, 2018 査読あり doi: 10.1091/mbc.E18-01-0022
3. Gzrybowski M, Taki M, Senda K, Sato Y, Ariyoshi T, Okada Y, Kawakami R, Imamura T,

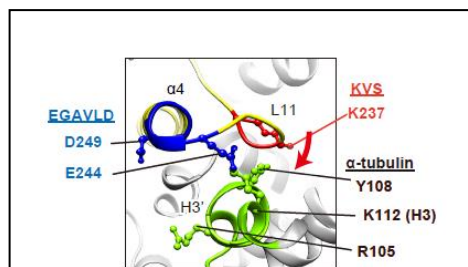


図 3. キネシンと微小管の相互作用
Kinesin-1 に特徴的な配列(赤、青)が、微小管の構造変化を読み取る。

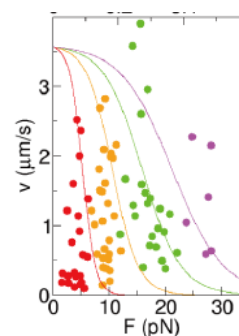


図 4. 細胞内でのキネシンの力速度関係

Yamaguchi S. A highly photostable near-infrared labeling agent based on a phospho-rhodamine for long-term and deep imaging. *Angew. Chem.* 57:10137-10141, 2018. 査読あり doi:10.1002/anie.201804731

4. Kimura K, Mamane A, Sasaki T, Sato K, Takagi J, Niwayama R, Hufnagel L, Shimamoto Y, Joanny JF, Uchida S, Kimura A. Endoplasmic-reticulum-mediated microtubule alignment governs cytoplasmic streaming. *Nat Cell Biol.* 19:399-406. 2017 査読あり doi: 10.1038/ncb3490

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Yasushi Okada, Regulatory mechanisms of axonal transport investigated by single-molecule and super-resolution live imaging. The 66th NIBB Conference/ABiS international symposium. Okazaki Conference Center, 2019
2. Yasushi Okada, Mechanisms of axonal transport investigated by high-speed and high-resolution imaging. 15th Annual German-Japanese Colloquium, 2019
3. 岡田康志「キネシンの結合による微小管の動的構造変化」、大阪大学蛋白質研究所セミナー「構造生物学と計算科学の融合による動的構造生物学の新しい展開」、2018
4. Yasushi Okada, "Conformational switching of microtubules as the basis for the polarized intracellular transport", 日本生物物理学会第 56 回年会シンポジウム「細胞の形態形成を制御する自己組織化メカニズム」、2018
5. Yasushi Okada, Biophysical and quantitative analyses of axonal transport using advanced bioimaging techniques, 第 41 回日本神経科学大会シンポジウム、2018
6. Yasushi Okada, Imaging based approaches to the mechanobiology of the fast axonal transport, UBI-MBI Joint Symposium, 2018

〔図書〕（計 1 件）

岡田康志、超解像・一分子イメージングによる分子動態の計測、森泰生、尾藤晴彦編、脳神経化学、第 30 章、319-329、化学同人、2018

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：測定方法、力測定装置、力測定システム、力測定プログラム及び記録媒体

発明者：林久美子、岡田康志

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-210698

出願年：2017

国内外の別：PCT

○取得状況（計 1 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：木村 暁

ローマ字氏名：Akatsuki Kimura

所属研究機関名：国立遺伝学研究所

部局名：遺伝メカニズム研究系

職名：教授

研究者番号（8桁）：10365447

研究分担者氏名：池田 一穂

ローマ字氏名：Kazuho Ikeda

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：上級研究員

研究者番号（8桁）：20642565

研究分担者氏名：丹羽 伸介

ローマ字氏名：Shinsuke Niwa

所属研究機関名：東北大学

部局名：学際科学フロンティア研究所

職名：助教

研究者番号（8桁）：30714985

研究分担者氏名：神原 丈敏

ローマ字氏名：Taketoshi Kambara

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：上級研究員

研究者番号（8桁）：40451637

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。