

平成23年5月19日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19770132
 研究課題名（和文） 再構成キネシン繊維上での微小管滑り運動の速度と揺らぎ
 研究課題名（英文） Fluctuation and Speed of Microtubule Movements Driven by Kinesin Motors Arranged on Catchin Thick Filaments
 研究代表者
 今福 泰浩（IMAFUKU YASUHIRO）
 九州大学・大学院理学研究院・助教
 研究者番号：70304722

研究成果の概要（和文）：

二枚貝平滑筋のミオシン繊維の芯となっているキャッチン繊維に、キネシン分子モーター頭部の向きを揃えて結合させた再構成キネシン繊維を作成した。この再構成キネシン繊維上での微小管滑り運動を観察し、速度と運動方向の関係を解析した。

また理論研究を行い、ATP分解を伴わない速い結合解離によって微小管上のキネシンが通常の運動方向とは逆方向にホッピングすることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We arranged the motor domains of kinesin by using the assembly property of catchin, a myosin rod-like protein extracted from bivalve smooth muscles. We prepared kinesin-catchin chimera protein and attached them to the surface of catchin filaments. We analyzed speed and direction of the movements of microtubules on kinesin-chimera/catchin filament.

We also showed theoretically that thermally activated kinesin head detachment followed by rapid reattachment at another binding site on microtubule can cause the motor to 'hop' backwards without ATP hydrolysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：運動・輸送、分子モーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞にたくさん存在する多種多様なタンパク質分子モーターは、細胞運動や細胞分裂、細胞内物質輸送などの過程において、細胞骨格繊維との間で定まった方向の力を発生するアクチュエーターとして働く。タンパク質分子モーターには、大別してミオシン、キネシン、およびダイニンの三種があり、それらの多くは直径数十ナノメートルの頭部とそれよりも長い尾部からなる。頭部は分子モーターの心臓部であり、細胞骨格繊維（アクチン繊維もしくは微小管）と相互作用してアデノシン3リン酸(ATP)を分解しながら、力を発生する働きを持つ。筋肉に含まれるミオシン繊維は、ミオシン尾部の性質に基づいた双極性の構造を持っており、その極性に応じてミオシン頭部の向きが良く揃っていることが知られている。

かねてより私たちが継続していた、タンパク質分子モーターによる *in vitro* 滑り運動の揺らぎ解析の結果から、多数の分子モーターがシンクロナイズして力を発生している可能性が示唆されていた。この揺らぎ解析の原理は、顕微鏡下での微小管（もしくはアクチン繊維）の滑り運動画像から位置データを記録して、微小管（もしくはアクチン繊維）の滑り距離の揺らぎを運動の拡散係数(Dm)として求め、その長さ(L)依存性を調べるというものである。もし、多数のキネシン分子が独立に作用していると仮定するならば、中心極限定理が示すとおり拡散係数は微小管長に反比例($Dm \propto 1/L$)する[Biophys. Chem. 89, 95-99, 2001]。しかし、それまでの研究によって、拡散係数が繊維の長さに依存しないことが示された。この結果は「独立作用の仮定」に否定的である。

しかしながら、従来の *in vitro* 滑り運動実験系では、分子モーターをガラス表面上にばらまいているために、分子モーター頭部の向きが不均一であり、このことが、揺らぎ解析の結果を解釈する上において障害となることが理論的に示されていた[Phys. Rev. Lett. 75, 180-183, 1995]。そのため、分子モーター頭部の向きがそろった条件での揺らぎ解析を行うことが必要とされていた。また、既存の理論モデルの計算機シミュレーションを行うことによって、揺らぎ解析の結果を検証することも求められていた。

(2) 一方、近年盛んになったタンパク質分子モーターの一分子運動実験の結果を、多数の分子モーターによる滑り運動実験の実験解

析に結び付けるためには、一分子運動を統計物理学的に解析して理論モデルを構築し、それをもとに多数の分子モーターによる滑り運動の理論モデルを構築する必要があった。

2. 研究の目的

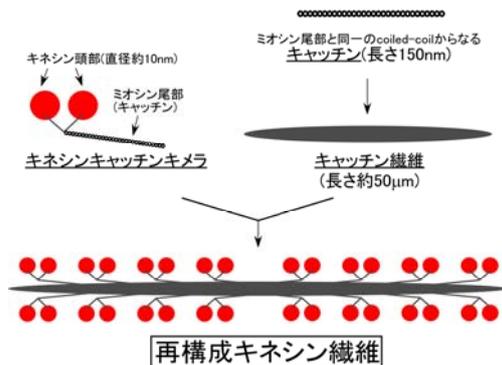
(1) 本研究においては、天然のミオシン繊維の構造を参考にして、キネシン分子モーターの向きを揃えることができる実験系を開発し、その上での微小管滑り運動の揺らぎ解析を行うことを最終目的として、まずは速度と運動方向の関係を解析することにした。

また実験研究と並行して理論研究を行い、既存の滑り運動モデルの計算機シミュレーションを行い、これまでになされた揺らぎ解析の結果を検証することを目指した。

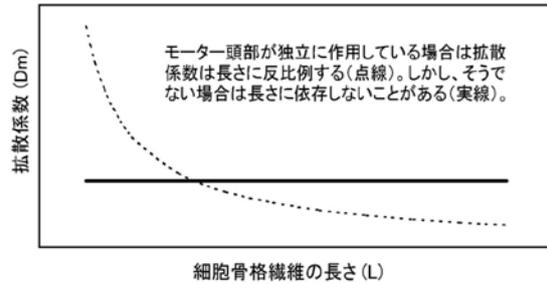
(2) 英国の物理学者の協力を得ながら理論研究を行い、キネシン分子の動作機構について、統計物理学に基づいた解析を行い、キネシン単分子運動の理論モデルを完成させることを目指した。特に、キネシン分子と微小管の間の速い結合・解離によって、キネシン分子がATP加水分解を伴わずに微小管上を「ホッピング」することによって起きるステップ運動を解析することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 二枚貝平滑筋の繊維状構造の芯となっているキャッチン繊維に、キネシン分子モーターの頭部の向きを揃えて結合させた再構成キネシン繊維を作成した。ここで用いる物は、貝の筋肉から精製したキャッチンタンパク質と、キネシン分子モーター頭部とキャッチンのキメラタンパクである。キメラは大腸菌を用いて発現させ、あらかじめ作成しておいたキャッチン繊維と再構成キネシン繊維上での微小管滑り運動を観察し、速度と運動方向の関係を解析した（下図）。



計算機シミュレーション研究では、既存の3つの理論モデル (Sekimoto-Tawada モデル [Phys. Rev. Lett. **75**, 180-183, 1995]、Prost モデル [Phys. Rev. Lett. **72**, 2652-2655, 1994]、Duke モデル [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, 2770-2775, 1999].) のシミュレーションを行い、運動距離の揺らぎを表す拡散係数のモーター数依存性を解析した。



(2) キネシンと微小管の速い結合解離によって起きる「ホッピング」運動の理論モデルを、統計物理学に基づいて構築した。計算機シミュレーションを併用することで、「ホッピング」は既知のキネシン運動モデルである「キネシン歩行モデル」に組み込むことが可能となる。そのために、新たな「歩行&ホッピングモデル」にして、これに基づいて既存のキネシン分子運動の実験データを解析した。

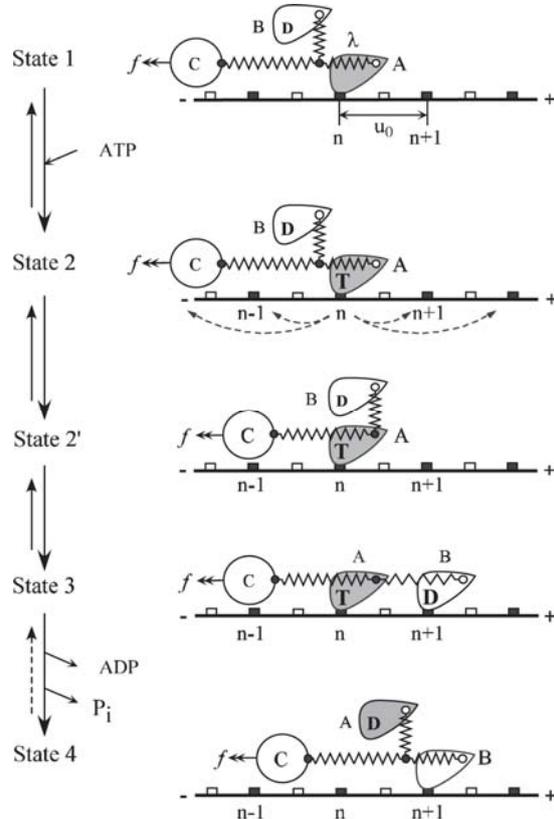
4. 研究成果

(1) さまざまなキネシンキメラの変異体を持ちいて、再構成キネシン繊維上での微小管滑り速度の解析をおこなった。その結果、キネシンのネック部位がそこなわれていないばあいは、微小管の運動速度は運動方向によらず一定であるが、ネック部位に欠失があるばあいは、微小管が再構成キネシン繊維の中央にむかう方向の運動速度が、その反対方向の運動速度よりも、統計的に有意におおきことがわかった。ネック部位に欠失があるキネシン頭部は柔軟性が失われているため、この結果は、キネシンの柔軟性、とくにその頭部の柔軟性が運動速度に影響を与えていることを示している [Journal of Muscle and Cell Motility **65**, 816-826, 2008]。

また、これまでに行われた分子モーターの揺らぎ解析実験によってわかった性質、すなわち、「無負荷条件では分子モーターはシンクロナイズするが、高負荷条件では分子モーターは独立にはたらくこと」を説明する理論を確立するために、これまで他の研究グループが提案したいくつかの理論モデルの計算機シミュレーションをおこなった。その結果、これまでに提出されたモデルでは過去の揺らぎ解析実験を説明できないことがわか

った [Journal of Physical Chemistry B, **112**, 1487-1493, 2008]。

(2) キネシンの「歩行&ホッピングモデル」(下図) によって、既存の実験データを解析することによって、キネシン単分子が逆方向の運動を行う頻度や運動速度の力学負荷依存性や、キネシン変異体の運動速度などを説明できた。特に、2つの頭部が互いに異なるヘテロ・キネシン変異体の運動速度を、2つの頭部が同一のホモ・キネシン変異体の実験結果から予測することに成功した [J. theor. Biol. **261**, 43-49, 2009]。これらの結果は、キネシン分子と微小管の間の速い結合・解離によって、キネシン分子がATP加水分解を伴わずに微小管上を「ホッピング」することによって起きるステップ運動を行うことがあることを示唆している。



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4件)

1. Yasuihro Imafuku, Neil Thomas and Katsuhisa Tawada, "Hopping and stalling of processive molecular motors", *Journal of theoretical Biology* **261**, 43-49, 2009. (査読

有)

2. Toshiki Taba, Masaki Edamatsu, Shiori Toba, Keitaro Shibata, Yasuhiro Imafuku, Yoko Yano Toyoshima, Katsuhisa Tawada, and Akira Yamada, "Direction and Speed of Microtubule Movements Driven by Kinesin Motors Arranged on Catchin Thick Filaments", *Journal of Muscle and Cell Motility* **65**, 816-826, 2008. (査読有)
3. Yasuhiro Imafuku, Namiko Mitarai, Katsuhisa Tawada, and Hiizu Nakanishi, "Anomalous Fluctuations in Sliding Motion of Cytoskeletal Filaments Driven by Molecular Motors: Model Simulations", *Journal of Physical Chemistry B*, **112**, 1487-1493, 2008. (査読有)
4. Yasuhiro Imafuku, Namiko Mitarai, Katsuhisa Tawada, and Hiizu Nakanishi, "Fluctuations in sliding motion of cytoskeletal filament driven by molecular motors", *IEEE MHS2007 & Micro-Nano COE Vol.1*, 193-198, 2007.11. (査読有)

[学会発表] (計9件)

1. 今福泰浩、ニール・トーマス, 「RNAヘアピンとキネシンネックリンカーの構造変化ダイナミクス」, 2011年 生体運動研究合同班会議, 2011年1月8日, 大阪市立大学 (大阪府大阪市)
2. Yasuhiro Imafuku and Neil Thomas, "Zipping dynamics of RNA hairpin and kinesin neck linker", 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20日, 東北大学(宮城県仙台市)
3. 今福泰浩、ニール・トーマス, 「キネシンネックリンカーとRNAヘアピンのダイナミクス」, 2010年 生体運動研究合同班会議, 2010年1月10日, 中央大学理工学部 (東京都文京区)
4. Yasuhiro Imafuku and Neil Thomas, "Dynamics of zipping the kinesin neck linker and an RNA hairpin", 第47回日本生物物理学会年会, 2009年10月30日, アステイ徳島 (徳島県徳島市)
5. Yasuhiro Imafuku, Katsuhisa Tawada and Neil Thomas, "Hopping and Stalling of

Processive Molecular Motors", *6th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium*, 2009年1月, 香港科技大学 (中華人民共和国香港特别行政区)

6. Neil Thomas and Yasuhiro Imafuku, "Zipping model for kinesin neck-linker docking", 第46回日本生物物理学会年会, 2008年12月, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
7. Toshiki Taba, Masaki Edamatsu, Shiori Toba, Keitaro Shibata, Yasuhiro Imafuku, Yoko Yano Toyoshima, Katsuhisa Tawada, and Akira Yamada, "Torsional Flexibility of Kinesin: Direction and Speed of Microtubule Movements Driven by Kinesin Motors Arranged on Catchin Filaments", *2nd International Symposium on Bio-nanosystems*, 2008年11月, 東京大学・小柴ホール (東京都文京区)
8. Yasuhiro Imafuku, Namiko Mitarai, Katsuhisa Tawada, and Hiizu Nakanishi, "Fluctuations in sliding motion of cytoskeletal filament driven by molecular motors", *MHS2007 & Micro-Nano COE*, 2007年11月, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
9. 田場登志希、枝松正樹、鳥羽葉、今福泰浩、豊島陽子、太和田勝久、山田章, 「再構成キネシン繊維上での微小管滑り運動の方向と速度」, 第45回日本生物物理学会年会, 2007年12月, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今福 泰浩 (IMAFUKU YASUHIRO)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 70304722