

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19770138
 研究課題名（和文）
 ナノ粒子モデルを使った微小管結合モーター蛋白質の拡散運動メカニズムの解明
 研究課題名（英文）
 Elucidating the mechanism for diffusion of microtubule-binding proteins using charged nanoparticles.
 研究代表者
 箕浦 逸史 (MINOURA ITSUSHI)
 独立行政法人理化学研究所・分子動態解析技術開発チーム・研究員
 研究者番号：70373371

研究成果の概要（和文）：

単頭キネシンやダイニンなどのモーター蛋白質分子は、微小管に沿った拡散運動を行なうことが知られている。このような運動への非特異的静電相互作用の寄与を明らかにするため、直径約 60 nm の正電荷を持つナノ粒子を合成し微小管との相互作用を計測した。この粒子は電荷依存的に微小管と相互作用し、微小管に沿った拡散運動を示した。この運動をミカエリスメンテンの酵素反応モデルに類似した相互作用モデルで解析することで、運動中に運動と結合の 2 状態があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Several types of motor proteins such as KIF1A, MCAK, and dynein are known to show diffusional motion along microtubules. To elucidate the role of electrostatic interaction on this motion, I measured the interaction between positively charged nanoparticles of 60 nm in diameter and microtubules. The particles interact with microtubules in a charge-dependent manner and showed one-dimensional diffusion along microtubules. The motion was analyzed using a Michaelis-Menten type kinetic model. The result revealed that there are two-states: "diffusion" and "binding", during the diffusional motion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	600,000	3,900,000

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：キネシン, 微小管, モーター蛋白質, 弱結合, ミカエリスメンテンモデル, 非特異的静電相互作用, ブラウン運動

1. 研究開始当初の背景

キネシンの運動メカニズムについての研究が進展し、**hand-over-hand** すなわち2つの微小管結合サイトが交互に歩くかのように微小管上を運動することが明らかになってきた。キネシンは常に片方の「足」が微小管に着地していることで連続的に長距離運動できると考えられる。その一方で、キネシンの一種である **KIF1A** は単頭であるにも関わらず微小管上を前後にブラウン運動しながら、全体として方向性のある連続的な運動を行なうことが報告された。それに引き続き、**MCAK** や細胞質ダイニン、また鞭毛軸糸ダイニン **c** なども微小管に沿ったブラウン運動をすることが報告されてきた。これらは **hand-over-hand** では説明できない現象であり、モーター蛋白質の弱結合状態と密接に関連していると考えられるが、そのようなブラウン運動を実現する分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

ブラウン運動するモータータンパク質が微小管上にとどまりながらも、長軸方向のブラウン運動を許すメカニズムを明らかにすることを目指した。そのため、微小管上でのブラウン運動を可能にするような相互作用を人工的に再現することにより、その現象と密接に関連していると考えられるモーター蛋白質の弱結合状態を研究するための基盤の創出を目指した。

単頭キネシン **KIF1A** と微小管との相互作用には静電相互作用が重要な役割を果たしていると考えられてきた。また静電相互作用は双頭キネシンと微小管との弱結合にも寄与している可能性が示されていた。そこで、非特異的な静電相互作用によって1次元ブラウン運動が再現可能であるかを確かめるとともに、もし可能であるとすればどのようなメカニズムによるものかを解析することを目指した。

3. 研究の方法

キネシンと微小管との相互作用を研究するための一般的なアプローチは、電荷を変えたキネシンと微小管との相互作用を計測することである。しかし、キネシンと微小管との相互作用メカニズムは完全には明らかになっていないため、この方法では観察された相互作用の変化が静電相互作用のみによるものか、もしくは構造変化に由来する特異的結合サイトの変化によるものかを区別することが難しい。そこで本研究では、微小管を構成するチューブリンへの結合サイトを一切持たない荷電粒子をキネシンの代わりに用いて、その挙動を計測することを試みた。具体的には微小管とポリアクリルアミドナノ粒子との相互作用を観察する実験系を作成し、微小管上での荷電粒子の挙動を定量的に計測した。

4. 研究成果

化学的に合成したポリアクリルアミドのナノ粒子は、電荷を付加しない場合は微小管と相互作用しないが、正電荷を付加したときには電荷量に応じて微小管に結合するのが観察された。このことから、ポリアクリルアミド粒子が当初の設計通り静電的に微小管と相互作用していることが確認できた。

更に粒子は微小管に沿ったブラウン運動を行なうことも観察された。この運動のメカニズムを定量的に解析するため、粒子の電荷密度を以下のように求めた。粒子はショ糖密度勾配遠心法でサイズ毎に分画し、直径 **60 nm** の均一なサンプルを得た。この粒子を電子顕微鏡で観察することで直径分布と数密度を測定するとともに、粒子に含まれるアミンの濃度を定量することで、粒子の電荷密度を得た。

粒子が微小管上で示すブラウン運動の拡散係数と滞在時間は図1に示すように電荷密度の増加に対して指数関数的にそれぞれ減少、増加することが明らかとなった。この結果は粒子が微小管上でのブラウン運動中に微小管表面に電荷依存的に結合することで、粒子の運動が減速されるとともに、結合も安定化されていると考えたと説明できる。そこで粒子の運動を微小管への結合状態と拡散状態、そして解離の3状態からなるとしてモデル化した。

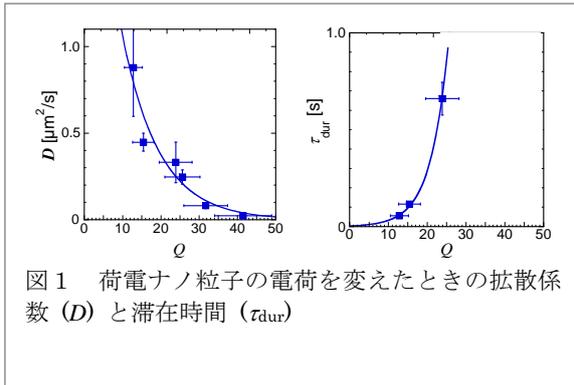


図1 荷電ナノ粒子の電荷を変えたときの拡散係数 (D) と滞在時間 (τ_{dur})

このモデルはミカエリスとメンテンによる酵素反応モデルと相似の式で表すことができることが明らかとなり、そこから相互作用ポテンシャルの深さを求めることに成功した (図 2)。この結果は非特異的静電相互作用による 1 次元ブラウン運動を実測データに基づいてモデル化し、相互作用ポテンシャルを求めた最初の報告となった。

更にこのようなポテンシャル形成に寄与するチューブリンの分子構造を理解するため、チューブリン C 末端の負電荷を増減させた変異チューブリンを作成し、粒子との相互作用を観察した。負電荷が集中した C 末端がない微小管上では、粒子の結合は少ないものの、粒子はブラウン運動し、かつその拡散係数は C 末端のある微小管上の拡散係数とほぼ同じであった。この事実は 1 次元ブラウン運動が粒子と C 末端のみとの相互作用ではないことを示し、上記の 3 状態モデルを使わないとうまく説明できないものである。

タンパク質同士の相互作用については、これまで鍵と鍵穴と言われる相補的な形に基づく特異的結合に焦点が当てられてきたが、本研究ではこれまであまり研究されてこな

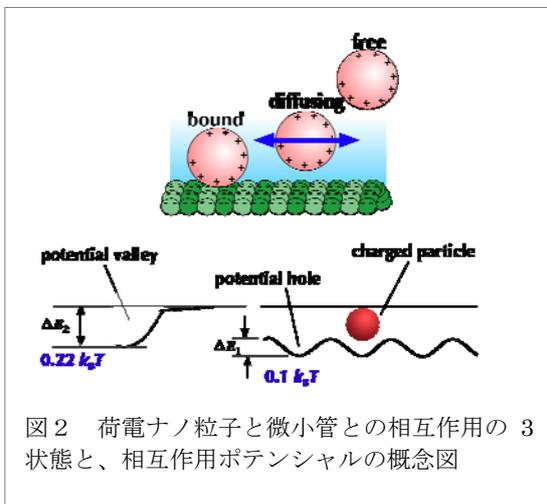


図2 荷電ナノ粒子と微小管との相互作用の 3 状態と、相互作用ポテンシャルの概念図

かったタンパク質間の非特異的な相互作用のメカニズムを明らかにすることに成功した。このようなメカニズムにより、例えば 8 nm 離れた隣り合うチューブリンのような、分子間相互作用の観点からは非常に遠い距離を解離せずに運動することが可能になっていると考えられる。このようなゆるやかな相互作用は単に弱いだけの結合ではなく、特異的結合とは異なる機能を担う相互作用であることが示唆された。

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 1 件)

Itsushi Minoura, Eisaku Katayama, Ken Sekimoto, Etsuko Muto (2010)

One-dimensional Brownian motion of charged nanoparticles along microtubules: A model system for weak binding interactions.

Biophysical Journal 98 (8) 1589–1597 (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

① 箕浦逸史、武藤悦子

微小管表面の静電ポテンシャルを反映した荷電粒子の 1 次元ブラウン運動

ナノ学会第 6 回大会 (福岡) 2008 年 5 月

② Itsushi Minoura, Seiichi Uchimura, Etsuko Muto
How does the charge distribution of microtubules affect the one-dimensional Brownian motion of charged particles? (荷電粒子の 1 次元ブラウン運動は微小管の電荷分布にどのように影響されるか?)

46th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (日本生物物理学会第 46 回年会) 2008 年 12 月 福岡

③ Itsushi Minoura, Seiichi Uchimura, Masashi Degawa, Etsuko Muto

The role of extended C-terminal tail of tubulin on weak-binding interaction between motor proteins and microtubules (チューブリン C 末端の伸長した構造が弱結合に果たす役割)

47th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (第 47 回日本生物物理学会年会) 2009 年 10 月 徳島

④ Masashi Degawa, Itsushi Minoura, Seiichi Uchimura, Etsuko Muto

Is the tubulin C-terminus tail necessary for the 1D Brownian motion of KIF1A? (KIF1Aの一次元ブラウン運動にチューブリン C 末端は必要か?)

47th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (第 47 回日本生物物理学会年会) 2009 年 10 月 徳島

⑤ Itsushi Minoura, E. Katayama, K. Sekimoto, S. Uchimura, M. Degawa, E. Muto

Three-state model for one-dimensional Brownian motion of charged nanoparticles along microtubules.

54th Annual Meeting of Biophysical Society 2010 年 2 月 サンフランシスコ

⑥ Masashi Degawa, Itsushi Minoura, S. Uchimura, E. Muto

C-terminal tail of tubulin nonessential for Brownian motion of KIF1A

54th Annual Meeting of Biophysical Society 2010 年 2 月 サンフランシスコ

[その他]

<http://mtu.brain.riken.jp/research.html>

<http://researchmap.jp/minoura124/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箕浦 逸史 (MINOURA ITSUSHI)

独立行政法人理化学研究所・分子動態解析技術開発チーム・研究員

研究者番号：70373371

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者