

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370063

研究課題名(和文)キネシンの二足歩行運動における頭部間協調性の仕組み

研究課題名(英文)Head-head coordination mechanism of kinesin during processive motility

研究代表者

富重 道雄(Tomishige, Michio)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50361530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子モーターキネシンは2つの頭部を交互に動かしてまるで歩くようにして運動するが、その頭部間の協調性の仕組みは明らかになっていない。我々は、暗視野顕微鏡をベースとした高時間・空間分解能の一分子計測法を用いることによって、キネシン頭部が前方へステップする際の間状態およびキネシン頭部のアロステリックな構造変化を検出することに成功した。そしてこれらの結果をもとに、頭部間の協調性にはネックリンカーの向きと張力が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular motor kinesin walks along microtubules by alternately moving two motor heads, although the underlying mechanism for the head-head coordination is still unknown. Here we employed single molecule measurements with high temporal and spatial resolutions based on dark-field microscopy, and could observe intermediate states during the stepping motion of the head and the allosteric conformational change of the head. Based on these observations we showed that the direction and tension of the neck linker play pivotal roles on the head-head coordination.

研究分野：生物物理

キーワード：分子モーター 細胞内輸送 一分子計測(SMD) ナノマシン 構造変化

1. 研究開始当初の背景

キネシンは ATP 加水分解によって得られたエネルギーを利用して微小管の上を連続的に運動する分子モーターである。近年の一分子計測法の技術的発展によりキネシンの運動機構の研究は急速に進み、その結果キネシンは2つの頭部を交互に動かして二足歩行することが明らかになったが、その詳しいメカニズム、特に2つの頭部の化学力学状態を協調させて二足歩行運動を可能にする仕組みはいまだに明らかになっていない。

最近我々はヌクレオチドなしのキネシンの結晶構造を解くことに成功し、さらにさまざまなヌクレオチド状態の組み合わせのキネシン二量体の原子構造モデルを構築することで、頭部間の協調性の構造モデルを提唱した。しかし、これは原子構造の比較から推測されたモデルであり、この構造モデルの妥当性を実験的に検証することが、二足歩行運動を可能にする仕組みを明らかにするためには必要である。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内輸送に関わる分子モータータンパク質キネシンが、ATP 加水分解によって得られたエネルギーを仕事に変換し、2つの頭部を交互に動かして二足歩行する仕組みを明らかにすることを目標にする。特に、2つの頭部をつなぐネックリンカーが前または後ろに引っ張られるという情報がそれぞれの頭部の化学力学状態の制御を引き起こす仕組み、また浮いた頭部が前方へ結合してステップする際のバイアスや力発生の仕組みを明らかにする。我々が構築したキネシン二量体の原子構造モデルを元に作業仮説を立て、我々がこれまでに確立したさまざまな変異体ツール（ネックリンカーを人工的に伸ばして張力を緩和させた変異体など）と時間・空間分解能を従来よりも大きく改善させた新しい一分子計測技術を組み合わせることで検証を進めていく。

3. 研究の方法

(1) 一分子計測の時間分解能を改善するために、野地らによって開発された全反射型暗視野顕微鏡 (Ueno et al. 2010) を用いた。ヘテロダイマーキネシン発現系を用いて、片方の頭部にのみシステインを導入した変異体を作製し、システインを介して片方の頭部を40 nmの金コロイド粒子で標識した。ガラス表面に貼り付けた微小管の上を金微粒子で標識したキネシンが運動する様子を全反射型暗視野顕微鏡で観察し、その画像を高速カメラで55 μ sの時間分解能で観察した。金微粒子の画像を二次元ガウス関数でフィッティングすることにより、重心の位置を2 nmの位置検出精度で検出した。

(2) キネシン頭部は ATP の異性化に伴いサブドメインが回転する。この構造変化はネッ

クリンカーによる ATP 加水分解のアロステリックな制御に重要であると考えられているが、それを一分子レベルで検出することは困難であった。サブドメインの回転を検出するために、野地研究室 (東大・工・応用化学) と共同で、金ナノロッドを高速暗視野顕微鏡で観察し、その非対称な散乱像を元に三次元的な角度変化を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、キネシンの片方の頭部に金ナノロッド (25x60 nm) を二つのシステインを介して固定し、微小管上を金ナノロッド標識したキネシンが運動する様子を、後方散乱型暗視野顕微鏡を用いて100 μ sの時間分解能で観察した。金ナノロッドの像を理論的に計算した画像でフィッティングすることによって、重心位置と角度を決定した。

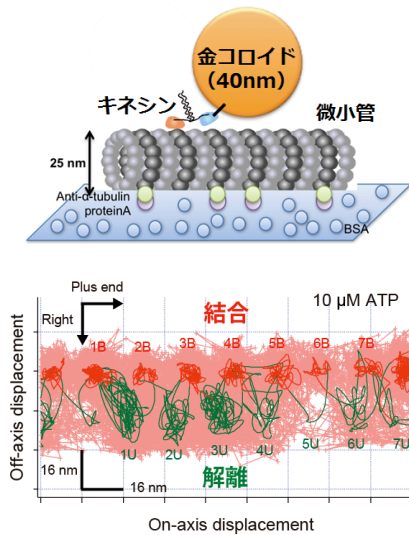
<引用文献>

- ① H. Ueno et al. Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution. *Biophys. J.* 98, 2014-2023 (2010)

4. 研究成果

(1) 微小管から解離した頭部が前方の結合部位に選択的に結合するプロセスを詳しく調べるために、片方の頭部の運動を従来よりも200倍高い時間分解能で観察する手法の開発を行った。従来の蛍光色素を用いたナノ計測法では色素の退色の問題で、時間分解能を10ミリ秒程度までしか上げることができず、高 ATP 条件下での中間状態を検出することが困難であった。そこで光をよく散乱する金コロイド粒子で片方の頭部を標識し、全反射型の暗視野顕微鏡で観察したところ、片方の頭部の運動を55マイクロ秒の時間分解能および2 nmの位置検出精度で検出することに成功した。

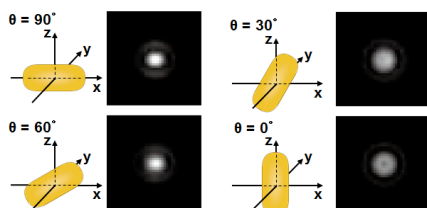
(2) 上記の暗視野顕微鏡法を用いて、微小管上を運動中のキネシンを観察した。頭部につけた金コロイド粒子は進行方向に向かって16 nm ステップを示し、またステップが起きる直前に位置のゆらぎが大きく上昇する様子が観察された。ゆらぎの上昇はキネシンの頭部が微小管から解離してブラウン運動することによるものであり、この方法によって頭部が微小管に結合した状態と解離した状態を区別して検出することに初めて成功した。この方法により、キネシン頭部が前方へステップする際の中間状態の構造やそれぞれの遷移状態の反応速度を直接検出し、その結果、キネシン頭部は微小管から解離した後、常に右向きに大きくブラウン運動し、ATP の結合後平均 2.3 ms 後に前方へステップすることを明らかにした。



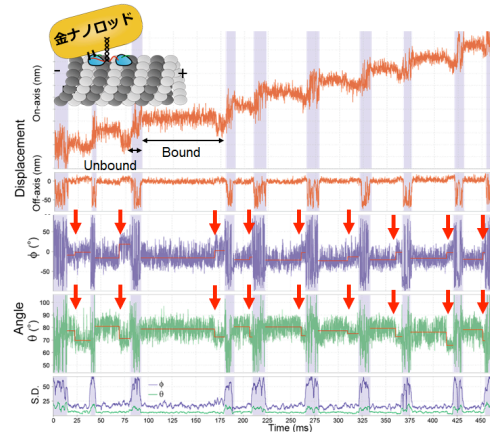
(3) キネシンの協調的な二足歩行運動におけるネックリンカーの役割を明らかにするために、ネックリンカーを人工的に伸ばした変異体の運動を全反射型暗視野顕微鏡により観察した。野生型と比較して運動速度が低下し、また微小管から解離した頭部が頻繁に後ろの結合部位に再結合する様子が見られた。一方、ネックリンカーを1アミノ酸削って短くした変異体では、頭部が微小管から解離した状態を取る時間が長くなり、また前方の結合部位にアクセスするもののすぐに外れて元の位置に戻る様子が観察された。これらの結果は、ネックリンカーが長くなる（張力が軽減する）とATP結合前に後ろの結合部位に再結合しやすくなり、一方短くなる（張力が増す）とATP結合後前方にステップしにくくなり、協調性が損なわれることを示すものである。つまり、野生型のネックリンカーはこれらを防ぐことによって協調的な二足歩行運動を可能にしていることが示された。

(4) 野地研究室と共同で、金ナノロッドを高速暗視野顕微鏡で観察しその三次元的な角度変化を一分子レベルで検出する方法を開発した。これを用いて F_1 -ATPase の γ サブユニットの角度変化を $10 \mu\text{s}$ の時間分解能と1度の決定精度で決定した。また、この方法を用いてキネシンの片方の頭部に結合させた金ナノロッドの変位と角度変化を同時に検出し、運動中に頭部のサブドメインが、ATP加水分解に伴って回転する様子を直接検出することに成功した。

金ナノロッド配向の模式図とシミュレーション像



(5) 協調的な二足歩行には、(3)で明らかにした仕組みのほかに、両足結合状態において、前の頭部よりも後ろの頭部が先に微小管から解離する仕組みが必要である。我々はこれまでの研究から、キネシン頭部におけるATP加水分解の促進にはサブドメインの回転が必須であり、前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られることによってサブドメインの回転および加水分解が抑制されるというモデルを提案した。この仮説を前述の金ナノロッドを用いた高速暗視野顕微鏡を用いて検証した。キネシンの片方の頭部のサブドメインに特異的に結合させた金ナノロッドを $100 \mu\text{s}$ の時間分解能で観察し、運動中のキネシンの金ナノロッドの変位と角度変化を求めたところ、頭部が微小管に結合している間に 15 度程度の角度変化を一回だけ行うことが明らかとなった。また角度変化の前と後の持続時間はほぼ同じであり、これは前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られることによって回転が抑えられるが、後ろ頭部になるとネックリンカーが前を向くことで回転が安定化されるという上記の仮説を裏付けるものである。



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4件)

- ① S. Enoki, R. Iino, Y. Niitani, Y. Minagawa, M. Tomishige, and H. Noji. High-speed angle-resolved imaging of single gold nanorod with microsecond temporal resolution and one degree angle precision. *Anal. Chem.* 87, 2079-2086 (2015)、査読有り
DOI:10.1021/ac502408c
- ② M. K. Mattson-Hoss, Y. Niitani, E. A. Gordon, Y. Jun, L. Bardwell, M. Tomishige and S. Gross. CK2 activates kinesin via induction of a conformational change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 7000-7005 (2014)、査読有り

DOI:10.1073/pnas.1321419111

- ③ T. Aoki, M. Tomishige, and T. Ariga. Single molecule FRET observation of kinesin-1's head-tail interaction on microtubule. *BIOPHYSICS* 9, 149-159 (2013)、査読有り
DOI:10.2142/biophysics.9.149
- ④ N. Uchida, K. Okuro, Y. Niitani, X. Ling, T. Ariga, M. Tomishige, and T. Aida. Photoclickable dendritic molecular glue: Noncovalent-to-covalent photochemical transformation of protein hybrids. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 4684-4687 (2013)、査読有り
DOI:10.1021/ja401059w

〔学会発表〕(計 20 件)

- ① 富重道雄、シンポジウム「細胞のメゾスケール構造機能」京都大学 iCeMS、分子モーターキネシンの二足歩行運動の一分子計測、2014 年 12 月 13 日
- ② Michio Tomishige, High temporal resolution observation of the kinesin head motion during processive motility, Gordon Conference: Muscle & Molecular Motors, Mount Snow Resort, West Dover, VT, July 7, 2014
- ③ Michio Tomishige Direct observation of binding and unbinding motions of kinesin motor domain during processive motility, Tokyo ATPase Workshop, Takeda Hall, The University of Tokyo, Jun 3, 2014
- ④ 富重道雄、暗視野顕微鏡によるキネシンの高時間分解能運動計測、第 3 回分子モーター一討論会、東大農学部中島董一郎記念ホール、2013 年 7 月 19 日
- ⑤ Michio Tomishige How kinesin coordinates two motor domains to walk along microtubule, The 2nd KIAS Conference on Subcellular Dynamics, Korea Institute for Advanced Study, Seoul, Korea, June 12, 2013
- ⑥ Michio Tomishige Structural basis for the coordinated processive movement of kinesin motor protein, 2nd Tokyo U - Korea U Joint Workshop on Bio-Soft Matter, Korea University, Seol, March 1, 2013
- ⑦ 富重道雄、キネシンの協調的な二足歩行運動を可能にするアロステリックな仕組み、

第 12 回日本蛋白質科学会年会、ワークショップ「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」名古屋国際会議場、2012 年 6 月 20 日

〔図書〕(計 1 件)

- ① 富重道雄、DOJIN BIOSCIENCE SERIES 「一分子生物学」(原田慶恵・石渡信一編) 4 章キネシン、p48-60、化学同人、2014 年 9 月 25 日

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