

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03661

研究課題名(和文) 高時間分解能一分子計測によるキネシンの化学力学共役機構の解明

研究課題名(英文) High temporal resolution single-molecule analysis of the mechanochemical coupling of kinesin

研究代表者

富重 道雄 (Tomishige, Michio)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：50361530

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)：分子モーターキネシンはATP加水分解のエネルギーを利用して2つの頭部を交互に動かしながら運動するが、頭部間の協調性の仕組みやエネルギー変換の仕組みはまだ明らかになっていない。我々は、高時間かつ高空間分解能の一分子計測法を用いることによって、キネシンの後ろ頭部が前頭部よりも先に解離する仕組みや浮いた頭部が選択的に前方の結合部位に結合する仕組みを明らかにした。また負荷を受けながら運動中のキネシンの観察を行うことにより、外力により運動速度が低下する仕組みの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は多様な細胞内活動に関わっているが、その多くは複数のサブユニットを協調させることで仕事の効率を上げている。本研究の成果は、キネシンのサブユニット間の協調性の仕組みを構造や反応速度論の観点から明らかにするものであり、アロステリックな分子内協調の普遍的な仕組みへの示唆を与えると同時に、効率的な人工分子機械の設計指針を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Molecular motor kinesin walks along microtubules by alternately moving two motor heads utilizing ATP hydrolysis energy, although the underlying mechanism for the head-head coordination and force production is still unknown. Here we employed single molecule measurements with high temporal and spacial resolutions, and uncovered the underlying mechanism for the preferential detachment of the trailing head before the leading head and for the preferential binding of the unbound head to the forward binding site. In addition, we observed the movement of kinesin under applied loads and elucidated the mechanism how the load decreases its speed.

研究分野：生物物理

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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モータータンパク質である。一分子観察法を用いた計測により、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二足歩行することが明らかになった。その後の研究により、キネシンの二足歩行運動の詳細は解明されつつあるが、分子モーター研究の最も根源的な問題であるエネルギー変換の仕組み(どのような化学反応ステップや構造変化が8 nm ステップや力発生を生み出すのか)は未解明のままである。その原因はこれまでの一分子計測技術ではこれらを直接検証することが技術的に困難であったためであり、それを明らかにするには、1) キネシンの8 nm ステップの間の中間状態を直接観察するための時間分解能の大幅な改善や、2) この計測をキネシンに負荷をかけながら測定精度を損なわずに行う手法の開発、が求められる。

2. 研究の目的

本研究は、キネシンが ATP 加水分解によって得られたエネルギーを一方向性の運動や力発生に変換する仕組みを明らかにすることを目標とする。具体的な目的としては、1) キネシンの8 nm ステップはどのような構造変化および化学反応ステップによって引き起こされるのか、2) エネルギー変換の仕組み、つまり ATP 加水分解のエネルギーは何に使われるのか、また力発生はどのような反応ステップ・構造変化によるのか、を明らかにすることを旨とする。

そのために、1) 高速一分子計測法を用いてキネシン頭部の運動を観察することで、後ろの頭部が解離してから前方へステップするまでの詳細なプロセスを野生型および異なる反応ステップが遅い様々な変異体で明らかにする。さらに、拡散バイアスと結合バイアスによるステップを交互に取りながら運動する「タンデム変異体」についても同様な測定を行い、ステップを生み出す仕組みを明らかにする。2) DNA ナノスプリングを用いてキネシンに負荷をかけた状態で高速一分子計測法を用いた観察を行う。DNA ナノスプリングの伸びからキネシンにかかっている負荷を見積もることで、ステップの中間状態の遷移速度や構造遷移の負荷依存性を明らかにする。これにより、負荷依存的な構造変化や化学反応ステップを定量的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 最近我々が開発した全反射照明型暗視野顕微鏡を用いた高速一分子計測法(H. Isojima et al. 2016)を用いて、キネシン頭部の運動を観察する。具体的には、キネシンの片方の頭部に反応性のシステインを導入してビオチン化した後、ストレプトアビジンコートした直径40 nm の金コロイド粒子に反応させる。微小管上を運動中のキネシン頭部につけた金粒子を、全反射顕微鏡をベースにした暗視野顕微鏡で観察し、その像を高速カメラで撮影する。輝点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1.5 nm の空間精度と50 μ s の時間分解能で検出した。

(2) キネシンに負荷をかけるために、理研 QBiC の岩城光宏氏らが開発したエントロピーバネとして振る舞う DNA オリガミ(DNA ナノスプリング)を用いた(M. Iwaki et al. 2016)。DNA ナノスプリングの両末端に対して相補的なプライマーを、SNAP タグを介して野生型キネシンおよび変異体キネシン(微小管に結合した後解離することができない)のC末端側にそれぞれ反応させる。これらを DNA ナノスプリングに反応させることで、DNA ナノスプリングの片端に野生型キネシン、もう一方の端に変異体キネシンを取り付けた。DNA ナノスプリングにつける野生型キネシンの頭部を金コロイド粒子で標識し、その運動を高速暗視野顕微鏡法を用いて計測することで、負荷を受けながら運動しているキネシン頭部の運動を観察した。

< 引用文献 >

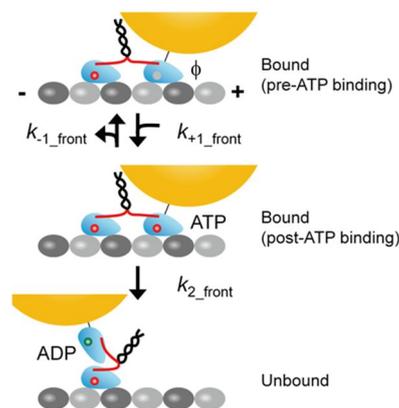
H. Isojima, R. Iino, Y. Niitani, H. Noji, and M. Tomishige. Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1. *Nature Chem. Biol.* 12: 290-297 (2016)

M. Iwaki, S. F. Wickham, K. Ikezaki, T. Yanagida, and W. M. Shih. A programmable DNA origami nanospring that reveals force-induced adjacent binding of myosin VI heads. *Nature Commun.* 7:13715 (2016)

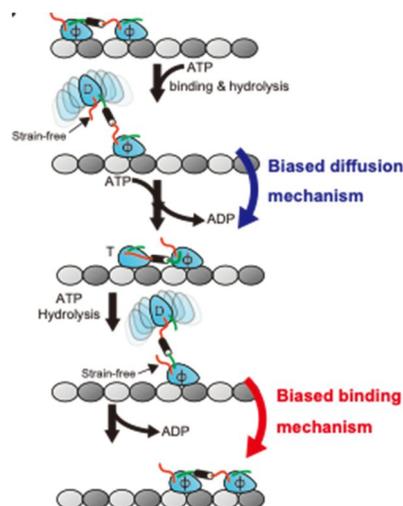
4. 研究成果

(1) キネシンが2つの頭部を交互に動かして二足歩行運動するためには、前頭部よりも先に後ろ頭部が微小管から解離する必要がある。それを説明するためのモデルとして、前頭部が後ろに引っ張られることによって前頭部の解離が抑えられているというモデルが提案されている。

このモデルを検証するために、後ろ頭部の解離を遅くした E236A 変異体と野生型のヘテロダイマーを用いて、前頭部が微小管から解離するまでの速度を全反射照明型暗視野顕微鏡を用いて計測した。飽和 ATP 存在下では、前頭部は 160 ms に一度微小管から解離し、その頻度は ATP 濃度を下げると低下した。前頭部が微小管から解離するまでの時間は、我々が過去に測定した後ろ頭部が微小管から解離するまでの平均時間 10 ms よりも長く、これは前頭部では ATP 加水分解が 16 倍押さえられていることを示すものである。さらに、2 つの頭部をつなぐネックリンカーにかかる張力の影響を調べるために、人工的にネックリンカーを伸ばした変異体を用いて同様に観察を行ったところ、解離までの平均時間は変化しなかったが、ATP の親和性を表すミカエリス定数 K_m が低下した。これらの結果は、ネックリンカーにかかる張力の大きさではなく、前頭部のネックリンカーの向き（進行方向に対して後ろ向き）が ATP 加水分解の抑制に関わっており、後ろ頭部ではネックリンカーが前を向くため、ATP 加水分解が促進されるというモデルを裏付けるものである。



(2) キネシンの浮いた頭部が進行方向の結合部位に選択的に結合するモデルとして、拡散運動にバイアスがかかるというモデルと前後の結合部位への結合のしやすさにバイアスがかかるという二つのモデルが提案されている。これらのモデルを検証するために、2 つの仕組みを交互に使いながら二足歩行運動するタンデム変異体を用いて、それぞれの頭部を金コロイド粒子で標識し、全反射照明型暗視野顕微鏡を用いて観察した。その結果、結合バイアスのみでのステップの場合は、90% 以上の確率で前方ステップするのに対し、拡散バイアスのみでのステップの場合は、50% 程度の確率で後ろの結合部位に再結合し、ATP 濃度を下げるとその確率が上昇することが明らかになった。一方、微小管から解離した後、再び結合するまでの時間は、いずれも 3 ミリ秒程度で顕著な違いは見られなかった。これらの結果は、前方ステップには拡散バイアスの仕組みのみで十分であることを示唆するものである。



(3) キネシンの頭部は ATP を加水分解して ADP 状態になると微小管から解離し、ADP を解離することで微小管に再結合する。しかし、微小管から解離して再結合するまでの速度がどのような要因によって決まっているのかはまだ明らかになっていない。そこで、片頭部をコイルドコイルストークを介して変異体頭部（微小管に結合した後解離しにくい）につなぐことで、頭部を微小管に繫留してその結合解離を繰り返し観察する実験系を開発した。野生型頭部を金コロイドで標識し、高速一分子計測法で運動を観察したところ、頭部が微小管から解離している時間は ATP 濃度によらず 3 ミリ秒程度であることがわかった。またネックリンカーが頭部に結合したドック状態を安定化する硫酸塩を加えた条件では、その時間が大幅に上昇した。これらの結果は、微小管から解離している時間は、ネックリンカーの構造遷移に依存していることを示唆するものである。

(4) 高速一分子計測法を負荷存在下で運動中のキネシンに応用することにより、キネシンの運動の負荷依存性の仕組みを調べた。キネシンに負荷をかけ、各時刻での負荷を見積もるために、バネのように伸び縮みする DNA ナノスプリングを用いた。全反射照明型暗視野顕微鏡を用いて観察したところ、野生型キネシンが運動した後、速度が徐々に低下していく様子が観察された。しかし、その後微小管から解離して最初の位置に戻る様子はあまり観られず、変異体キネシンが解離して DNA ナノスプリングが同じ方向に動き続ける様子が見られた。キネシンの運動の負荷依存性を調べるために、キネシンの運動速度の違いによってトレースを 5 つの領域に分割し、それぞれの速度領域でのステップ運動の様子を比較した。負荷が上昇し運動速度が低下すると、両足結合状態の持続時間は変化しなかったが、片足結合状態の持続時間が上昇した。また負荷の上昇により、浮いた頭部が後ろの結合部位に再結合する頻度や前方の頭部が先に解離する頻度が上昇した。これらの結果は、運動中のキネシンに負荷がかかると、片足結合状態の浮いた頭部のブラウン運動が後方に制限され、それによって前方の結合部位へアクセスする頻度が低下し、運動速度が低下することを示唆するものである。

(5) キネシン 5 は細胞分裂時の紡錘体形成に関わっており、微小管を架橋して多分子で協調することで紡錘体構造の形成・維持に関わっている。キネシン 5 の一分子レベルでの詳細な運動を調べるために、高速一分子計測法を用いて二量体キネシン 5 頭部の運動を観察した。キネシン 5

は一方方向運動のみを示すキネシン 1 とは異なり、一方方向運動と拡散運動の両方を示した。また、一方方向運動中のキネシン 5 はキネシン 1 に比べて頭部間の協調性が低く、後ろ頭部が微小管から解離後前方にステップせずに元の結合部位に戻る頻度が高くなった。またキネシン 1 と異なり、キネシン 5 は ADP 解離を伴わない可逆的な結合解離を頻繁に示した。これらの結果は、キネシン 5 は ATP 加水分解依存的な強結合状態だけでなく、ATP 非依存的に素早く結合解離する弱結合状態があり、これらを何らかの要因によって切り替えていることを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ariga Takayuki, Tomishige Michio, Mizuno Daisuke	4. 巻 121
2. 論文標題 Nonequilibrium Energetics of Molecular Motor Kinesin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Review Letters	6. 最初と最後の頁 218101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevLett.121.218101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto Kazuya, Morita Yuki, Iino Ryota, Tomishige Michio, Shintaku Hirofumi, Kotera Hidetoshi, Yokokawa Ryuji	4. 巻 12
2. 論文標題 Simultaneous Observation of Kinesin-Driven Microtubule Motility and Binding of Adenosine Triphosphate Using Linear Zero-Mode Waveguides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 11975 ~ 11985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnano.8b03803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ariga Takayuki, Tomishige Michio, Mizuno Daisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Experimental and theoretical energetics of walking molecular motors under fluctuating environments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 503 ~ 510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-020-00684-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 ARIGA Takayuki, TOMISHIGE Michio, MIZUNO Daisuke	4. 巻 59
2. 論文標題 Measuring Dissipation of Molecular Motor Kinesin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 300 ~ 304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.59.300	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計29件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 富重道雄
2. 発表標題 二本足で歩く生体分子モーターキネシンの一分子運動計測
3. 学会等名 青山学院大学ライフサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田大雅、松崎興平、富重道雄
2. 発表標題 一方向運動と拡散運動を切り替えるキネシン5の高速一分子観察
3. 学会等名 第8回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michio Tomishige
2. 発表標題 High-speed single molecule observations of the stepping motion of molecular motor kinesin
3. 学会等名 3rd International Symposium on Frontiers in Bioimaging（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松崎興平、富重道雄
2. 発表標題 キネシンの選択的ステップ運動の高速一分子観察
3. 学会等名 第7回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富重道雄
2. 発表標題 二本足で歩く分子モーターキネシンの化学力学共役
3. 学会等名 青山学院大学－東京農業大学ジョイントミーティング（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富重道雄
2. 発表標題 二本足で歩く生体ナノマシン キネシン
3. 学会等名 青山学院大学物理・数理学科コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California, San Francisco		