

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 11日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22687012

研究課題名（和文） 微小管及びキネシン分子から構築される紡錘体様構造の3次元力学ネットワークの解明

研究課題名（英文） A study of 3D mechanical network of the spindle-like structure composed of microtubules and kinesins.

研究代表者

矢島潤一郎（YAJIMA JUNICHIRO）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00453499

研究成果の概要（和文）：

細胞分裂時に働くキネシンおよび繊毛打運動に関与するダイニンの運動特性を検討した。分裂期キネシン-6及び軸系外腕ダイニンが、微小管を滑らせながらその長軸の方向に対して回転させること（コークスクリュー運動）を新たに見出した。このコークスクリュー様運動は、ATP濃度、リン酸化や結合タンパク質の有無、外部負荷の方向などで変わった。以上より、微小管依存性モータータンパク質のトルク発生は、外部の状況に応じて制御される可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We have examined that the motility driven by (1) kinesins functioning in mitosis and (2) or axonemal dyneins being involved in ciliary movement. We found that kinesin-6 and outer arm dynein rotated sliding microtubules around their longitudinal axis. These corkscrewing motion of microtubule has not been observed in kinesin-6 or outer arm dynein from any source. The corkscrewing motion depends on ATP concentration in the buffer, phosphorylation on N-terminal region of kinesin-6 head, binding protein or direction of load. Our results suggested that torque generation of microtubule-based motors may be regulated by external conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2011年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2012年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	20,000,000	6,000,000	26,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：分子モーター・細胞骨格・3次元計測

1. 研究開始当初の背景

生命の基本現象である細胞分裂では、紡錘

体と呼ばれる分裂装置が、細胞骨格やモータータンパク質などの相互作用を通して3次

元空間に構築される。機能の異なる生体分子モーターが、この分裂装置に必須であることは知られているが、各種分子モーターの詳細な運動機構がわかっておらず、如何に分裂装置を組み上げるのか、リン酸化などの化学シグナルからどのような情報の伝達を受けているのかの詳細は解明されていない。紡錘体構築の分子機構の解明を目指した観察手法は、現状では出尽くした感もあり、例えば、従来の生細胞を対象とするエバネッセント照明観察では、細胞表層の2次元平面のみの観察に限定され、また、近年の細胞観察の主流となっている共焦点顕微鏡による3次元観察法では、観察が蛍光だけに限定されることや、z方向の空間分解能が低く、位置の定量的な解析が困難である。このような状況を打開するためには、3次元空間でナノメートル（生体分子のサイズ）の空間分解能、ミリ秒（酵素サイクル時間）での時間分解能で生体分子を観察することが最低限必要である。本申請者は、in vitro 再構成系で、x y平面ばかりか、z方向にも nm・ms の空間時間分解能で計測できる顕微鏡システムを用いて、分裂期キネシン-5 (E g 5) が微小管の長軸に沿った方向に力を発するだけでなく、微小管の長軸に対して回転させる特性を報告した(Yajima *et al. Nat Struct Mol Biol*, 2008)。これらの分裂期キネシン分子が紡錘体の構築にどのように関与しているかを理解するためには、微小管を直進させる運動機構のみならず、回転させる運動機構をも統合したかたちでモータータンパク質（キネシン）の運動メカニズムを理解する必要があるという着想に至った。

2. 研究の目的

本申請研究では、3次元空間で蛍光粒子の位置測定を行いながら力測定できる顕微鏡を構築し、分子モーターが微小管の長軸及び短軸方向にどれだけ力を出しているのかを定量することで、キネシン分子が微小管の長軸方向に力を発生する機構のみならず、長軸とは直交した方向に力を発生する機構をも統合したかたちで微小管依存性分子モーターであるキネシン及びダイニンの運動メカニズムを解明し、微小管とモータータンパク質の相互作用に起因する‘3次元空間力学ネットワーク’を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 観察・計測システムの構築

3次元位置検出顕微鏡を新たに構築し、こ

の顕微システムに光ピンセットシステムを導入する。この測定系により、x y z 方向にナノメートルの空間分解で生体分子の挙動とピコニュートン程度の生体分子間の相互作用力を同時に定量する。

モータータンパク質により駆動される微小管の運動を詳細に観察するため、上述の3次元位置検出顕微鏡により、微小管の回転の邪魔にならないサイズの小さな目印（量子ドット及び蛍光色素ローダミン）を微小管側面につけ、その目印を3次元空間で追跡する。

モータータンパク質の破弾力の測定のため、集光した赤外レーザーで捕捉したモータータンパク質の結合したビーズを、ガラス面上に抗体を介して固定し微小管と相互作用させ、破断するのに必要な力を定量する。

(2) 運動特性を検討した生体試料

キネシン-6及びキネシン-14は単量体及び2量体を大腸菌内で発現させ、陽イオン交換カラム及び微小管とヌクレオチド依存的に結合・乖離する性質を利用して精製する。

軸糸ダイニンは、テトラヒメナから抽出し、ショ糖密度勾配遠心と陰イオン交換カラムを用いて精製し、分解酵素を用いてダイニンのモータードメインを得る。

4. 研究成果

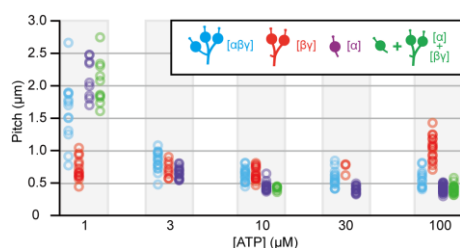
(1) 分裂期キネシン-6、-14及びダイニン分子の微小管の滑り回転運動

紡錘体で働くキネシン様タンパク質および繊毛打運動に関与する軸糸ダイニン分子をそれぞれ90%以上の精度で精製し、運動特性を検討した。

細胞分裂で機能するキネシン-6が、in vitro再構成系で、微小管を滑らせながらその長軸の方向に対して回転させていることを新たに見出した。このキネシン様タンパク質は、ATP濃度に依存してピッチ（微小管の長軸に対して1回転する間に微小管が直進する距離）を変え、この性質は細胞内での小胞の運搬などに関わるキネシン-1とは異なる性質であった。さらに、キネシン-6が特定のアミノ酸残基のリン酸化修飾でどのように運動性が制御されるのかを調べ、N末端突出領域の擬似リン酸化コンストラクトでは、トルクが大きく減少し、ピッチが長くなることを見出した。加えて、キネシン-6に結合する制御タンパク質によりピッチが変わることがわかり、キネシン-6のリン酸化や結合タンパク質の有無に応じ、細胞周期依存的にキネシン-6のトルクが制御されている可能性を示唆する結果を得た。

別の細胞分裂期キネシン-14では、ガラスやビーズに固定するアミノ酸末端の違いで、トルク発生の有無を調整していることが分かった。

軸系ダイニンでは、ATP濃度や協同して働くダイニン分子の数に依存してトルクの程度が制御されていること、軸系ダイニンを構成する各モータードメインが微小管の滑り回転運動を引き起こし、トルク発生の最小単位がモータードメインであることが明らかになった。



以上のように、微小管依存性のモータータンパク質は、化学・力学シグナルに応じたトルクが制御されている可能性を示唆する結果を得た。

また、温度制御可能な恒温チャンバーを設置し、モーターの活性を温度により制御する実験系を試作した。さらに、*in vitro*で生体分子を測定する際、可能な限り生体中での運動様式に近づけることを目的とし、微小管の両端のみを凸凹のガラス面に結合させ、吊橋のように配置し、モータータンパク質がチャンバー側面と接触せずに3次元方向へ運動できる実験系を確立した。今後、より生体内に近い環境でモーター特性を精査できるようになった。

(2) 分裂期キネシン-6の破弾力の測定

上述のように、キネシン-6は、微小管の長軸に平行方向への力と垂直方向への力を発する。加えてN末突出領域の擬似リン酸化により回転速度が減少する。このキネシンの破弾力を測定するため、光ピンセットシステムを確立した。高速カメラの導入により、赤外レーザーによる捕捉力を高精度に見積もるように実験系を改良し、捕捉したビーズをリアルタイムで解析できるような実験系とし、1分子のキネシン-6の破断力が2次元空間で定量できるようになった。さらに、微小管から鉛直方向に破弾力を測定できるよう、3次元位置検出顕微鏡に光ピンセットシステムを導入し、xyz方向でモータータンパク質の発生する力の定量が可能となった。今後、モータータンパク質と微小管の相互作用力を定量し、微小管のすべり回転運動の分子機構の理解がより深まることが期待される。

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2件)

- ① Tsuji T, Kawai-Noma S, Pack CG, Terajima H, Yajima J, Nishizaka T, Kinjo M, Taguchi H. Single-particle tracking of quantum dot-conjugated prion proteins inside yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 405, 638-643 (2011). 査読有
- ② Kim K, Yajima J, Oh Y, Lee W, Oowada S, Nishizaka T, Kim D. Super-resolution imaging of microtubular transport *in vitro* based on nanoscale localization sampling using nanoantenna arrays. *Small* 8, 892-900 (2012). 査読有

[学会発表] (計17件)

- ① 大和田慎介、西坂崇之、矢島潤一郎、N末端領域変異単頭キネシンによる微小管のコークスクリュウ運動、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月21日～9月23日 東北大学、仙台市
- ② Junichiro Yajima、Takayuki Nishizaka, Characterisation of corkscrewing motion of microtubules driven by single-headed kinesins. 第55回米国生物物理学会年会、2011年3月3日～3月9日 ボルチモア 米国
- ③ 山口真、豊島陽子、矢島潤一郎、Rotation of microtubules driven by sub-particles of Tetrahymena 22S outer arm dynein. 第49回日本生物物理学会年会、2011年9月17日～9月20日 兵庫県立大学、兵庫県
- ④ Shin Yamaguchi, Yoko Toyoshima, Junichiro Yajima, Rotation of microtubules driven by Tetrahymena 22S outer arm dynein. 第51回米国細胞生物学会年会、2012年12月3日～12月7日 デンバー、米国
- ⑤ 山口真、豊島陽子、矢島潤一郎、テトラヒメナ外腕ダイニンによる微小管の滑り回転運動 生体運動合同班会議、2012年1月6日～1月8日 筑波大学、茨城県
- ⑥ 知念拓実、樽井弓佳、南雲陽子、矢島潤一郎、山本高幸、長田裕之、臼井健郎、M期特異的キネシン(KSP)阻害剤 TerpendoleEの作用機構解析 日本農芸化学会例会 2012年1月21日 筑波大学、茨城県
- ⑦ 矢島潤一郎、バイオナノマシンによる微小管のコークスクリュウ運動 本農芸化学会例会 2012年1月21日 筑波大学、

茨城県 【シンポジウム招待講演】

- ⑧ Junichiro Yajima, Microtubule corkscrewing motion driven by multiple non-processive motors, Ncd. Mechanochemical Cell Biology シンポジウム、2012年8月23日～8月24日 Warwick 大学、英国 【シンポジウム招待講演】
- ⑨ 佐藤秋彦、Tim Davis、山口真、三嶋将紀、矢島潤一郎、Regulation of motor activity of kinesin-6 by phosphorylation of the N-terminal extension domain. 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月22日～9月24日 名古屋大学、愛知県
- ⑩ 山岸雅彦、豊島陽子、矢島潤一郎、キネシン様モータータンパク質のパワーストロークモデルの検証 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月22日～9月24日 名古屋大学、愛知県
- ⑪ 山口真、豊島陽子、矢島潤一郎、Rotational of microtubules driven by *Tetrahymena* 22S outer arm dynein and its sub-particles. 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月22日～9月24日 名古屋大学、愛知県
- ⑫ Junichiro Yajima, Microtubule corkscrewing motion driven by multiple non-processive motors. 第50回日本生物物理学会年会、2012年9月22日～9月24日 名古屋大学、愛知県 【シンポジウム招待講演】
- ⑬ Masahiko Yamagishi、Yoko Toyoshima、Junichiro Yajima, The kinesin catalytic motor domains possess a plus-end directionality. 第52回米国細胞生物学会年会、2012年12月13日～12月18日 サンフランシスコ、米国
- ⑭ 佐藤秋彦、山岸雅彦、山口真、矢島潤一郎、キネシンの運動方向決定機構 生体運動合同班会議、2013年1月12日～1月14日 広島大学、広島県
- ⑮ 藤村章子、大和田慎介、西坂崇之、矢島潤一郎、N末端領域変異体キネシンによる微小管の3次元コークスクリュー運動 生体運動合同班会議、2013年1月12日～1月14日 広島大学、広島県
- ⑯ Shin Yamaguchi、Yoko Toyoshima、Junichiro Yajima, MECHANICAL COORDINATION AMONG THREE DIFFERENT HEADS OF *TETRAHYMENA* 22S OUTER ARM DYNEINS. 第57回米国生物物理学会年会、2013年2月3日～2月7日 フィラデルフィア、米国
- ⑰ 矢島潤一郎、生体分子機械・キネシンの運動方向決定機構 第68回日本物理学会年会 2013年3月25日～3月29日 広島大学、広島県 【シンポジウム招待講演】

〔その他〕

ホームページ等

<http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/laboratories/yajima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢島潤一郎 (YAJIMA JUNICHIRO)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00453499

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：