

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0155

研究課題名(和文) 安定かつ動的な紡錘体構造を実現する分裂期モータータンパク質の設計原理の探究

研究課題名(英文) How do mitotic motor proteins organize spindle structures that have both stable and dynamic properties?

研究代表者

古田 健也 (Furuta, Ken'ya)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：40571831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞分裂時に現れる紡錘体の形成・維持の仕組みをモデルとして、個々の分子の数のゆらぎと、全体の構造の高い安定性・再現性との間のギャップを埋め、生物特有の安定かつ動的な構造・ネットワークを自己組織的に形成するための素子の設計原理を知ることが目的とした研究である。途中、研究計画の変更を行い、分子数に応じて運動方向性が逆転することが知られているkinesin-5に焦点を絞り、これが微小管を集団で架橋しながら運動する現象を研究対象とした。その結果、DNAナノ構造体を用いてkinesin-5を集積した複数多分子複合体の作製に成功し、運動方向の逆転と分子数の間の関係を研究することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the mechanism of spindle formation and maintenance that appears during cell division as a model, filling the gap between fluctuation in the number of individual molecules and high stability/reproducibility of the entire structure. We also aimed at revealing the design principles of the each component for forming both stable and dynamic structures. On the way, we changed the research plan: we focused on bidirectional kinesin-5, which reverses the direction of movement according to the number of molecules, and studied the motility while crosslinking microtubules. As a result, we succeeded in producing multi-molecule complexes of kinesin-5 motors using DNA nanostructures as templates, which enables us to study the relationship between the directionality reversal and the number of molecules involved.

研究分野：生物物理学

キーワード：モータータンパク質 kinesin-5 微小管 両方向性

1. 研究開始当初の背景

有糸分裂時に2つの娘細胞に染色体を分配する重要な仕事を担う構造体である紡錘体は、数百個のモータータンパク質が微小管どうしを架橋してネットワーク構造を形成することで作られている。この紡錘体は、細胞分裂の時間スケールに対して素早く正確に組み上がり、摂動に対して極めて安定で、かつ、素早く解体される、という特徴を備えている。1990年頃までは、この構造体の形成メカニズムは無数の役者を必要とする複雑なものと思われていたが、1996年に、細胞抽出液とDNAをまがしたプラスチック粒子だけで紡錘体構造が試験管内で自己組織的に安定に作られることが分かり(Heald et al., *Nature* 1996)、さらには、微小管とモータータンパク質だけで紡錘体に似た構造体が自己組織的に作られることが分かった(Surrey et al., *Science* 2001)。

細胞内、試験管内にかかわらず、紡錘体が形成される時間スケールは安定しており、驚くほど正確に同じ形状が作られることが観察されている。ここで素朴な疑問として、もし、従来のモデルのように、紡錘体がモータータンパク質同士の発生する力のバランスで形成・維持されており、個々のモータータンパク質によって発生する力や運動速度が、分子数に対して単純に線形であるならば、分子数のゆらぎが大きい場合、構造形成の時間スケールや、構造そのものに大きなバリエーションが生まれるはずである。この問題の解決案の一つとして、細胞内には複雑な制御機構が存在するので、時間スケールや構造は制御因子によって制御され得る、というものがある。実際、近年の分子生物学の発展によって、細胞内の様々なイベントが、分子の発現量を制御することによってON/OFF制御されている、と一般に説明されるようになってきたが、この説明方法では、暗黙のうちに制御するものと制御されるものの二者を仮定している。ところが、もし、発現量を制御する因子があるとしたら、その因子は誰が制御するのか、という無限退行に行き着くことも良く知られている。つまり、指令者の指令者の、そのまた指令者を探す、という状況である。

そこで申請者らは、制御の方法が、個々のモータータンパク質の協同的な性質に内在している可能性を考え、一連の研究を行った。その中で、一分子の分裂期モータータンパク

質の運動性能が、微小管の密度に依存して上がるような一種の協同性(Furuta & Toyoshima, *Curr Biol* 2008)や、2~8分子のモーター同士の協同的な運動や力発生を見出した(Furuta et al., *PNAS* 2013; Torisawa, Furuta et al., *Nat Cell Biol* 2014)。このような協同性は、集団としての応答が、分子数に対して線形でない可能性を強く示唆しており、上記の疑問に大きな手掛かりを与えるものであった。

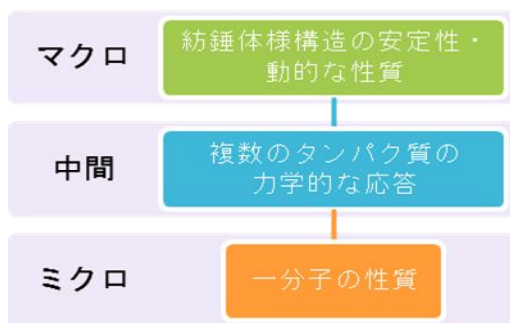
さらに重要なことに、紡錘体は安定であると同時に動的であることも分かってきている。2000年代までは、紡錘体の形成・維持のモデルは非常にシンプルで、中心体から生えた微小管が染色体に結合して形を作り、この形を、お互いに反対向きのモータータンパク質が発生する力のバランスで維持している、という静的なものであった。ところが、最近になって、微小管を架橋しているモータータンパク質のターンオーバーは考えられていたより大幅に速いことや(Goshima et al., *JCB* 2005)、紡錘体を形成する微小管についても、赤道面から極に向かって微小管の構成要素が常に動いて入れ替わっていることがわかっており(Kwok & Kapoor, *Curr Opin Cell Biol* 2007)、従来の静的な描像は覆りつつある。

2. 研究の目的

細胞内の構造形成過程には数多くの役者が関わっているため、従来の細胞・分子生物学的な手法だけでは、何が本質的な要素なのかどうしても分かりにくい。本研究では、これらの問題に対して、制御可能な最小限のコンポーネントを用い、マクロに観られる構造の安定性やダイナミクスが、ミクロな各要素同士の協同性によってどのように規定されているか、という点に焦点を絞る。そのために、制御可能な材料で作ったマクロな構造を様々な条件で観察することと並行して、これまで技術的に困難であったマクロとミクロの中間の階層においても力学的な測定を行う。このような構成的な実験で得られた膨大なデータから、生物が採用している構造・ネットワーク形成の戦略を帰納的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

マクロな階層において観られている協同的な現象が、分子と分子の間の協同的な性質に起因する可能性を考え、マクロとミクロの階層



をつなぐ性質を探究するために、3つの階層について研究を進める。

- マクロな階層: 試験管内で最小限のコンポーネントで紡錘体様の構造を自己組織的に作製する。その際、モータータンパク質の分子数、種類を少しずつ変えたときに出来る紡錘体構造の変化を観察する。
- ミクロな階層: 一分子のモータータンパク質、一本の微小管の力学的な応答を光ピンセット法で詳細に測定する。ただし、分裂期に働くモータータンパク質の多くは一分子では微弱な力しか出せないため、ノイズすれすれの測定になり、解釈に曖昧さが残る。
- 中間の階層: 分子数を制御して配置した分裂期モータータンパク質の力学応答を、光ピンセット法を用いて計測する。人工的なDNAナノ構造体の上に、モータータンパク質を、その数、種類を制御して配置する技術を用い、これまで個々の一分子計測では微弱過ぎて検出できなかった力学的な応答や、摂動を与えるとすぐに解離してしまうような相互作用を測定する。

紡錘体は多数の素子が参加している複雑なシステムである。このようなシステムでは、参加している役者の種類が増えた時に、結果を決定論的には予測できないような複雑さを持つことが知られている。従って、素子単体の性質と、それがシステムとして働く時の性質との関係が自明でない、という事態がしばしば発生する。そこで、このような複雑なシステムを理解するためには、素子のミクロな性質が、システム全体のマクロな性質とどのように関連しているかを繰り返し調べることが必要である。そのために、素子を改変してはその集合体の機能を観察する、という実験サイクルを迅速に行えるような実験系が必須である。このような問題意識から、本研究では、曖昧さを残さずパラメ

ータを精密に制御するため、マクロな階層からミクロな階層まで、基本的にどの階層においても高度に精製された少数のコンポーネント(キネシン-5, キネシン-14, 細胞質ダイニン, 微小管)を用い、非自明なミクロ-マクロ相関を実験的に明らかにするための新しい実験系を構築する。

4. 研究成果

当初の研究実施計画のうち、マクロな階層の実験計画に関しては、平成27年度の段階で他の研究グループや、ごく近い研究者が同様の趣旨の実験を行っていることが分かったため、研究計画の変更を行った。ミクロ、中間の階層の実験計画について、「一分子と多分子の間のルールを知る」というポイントは変更せずに進めたが、取り組む問題を明確にするために研究対象を絞り、分子数に応じて運動方向性を逆転させる両方向性のkinesin-5をクローニングして、これが微小管を集団で架橋しながら運動する現象を研究対象とした。

平成28年度までに、酵母の両方向性kinesin-5の発現・精製と、DNAナノ構造体を用いた多分子複合体の作製に成功した。平成29年度には、複数分子複合体のテンプレートとして、SSTと呼ばれるDNAナノチューブを用いた場合と、DNA origami法で作製した長さ約400ナノメートルのナノチューブを使用した場合の実験を行った。運動の観察はDNAテンプレートの一部に導入した蛍光色素を用い、全反射蛍光顕微鏡下で行った。kinesin-5は2本の微小管を架橋しながら運動する性質があるため、微小管2本と、kinesin-5自身、DNAテンプレートの4種類の蛍光プローブを同時に観察する必要がある。そのため、蛍光波長のことなる4種類の蛍光プローブを同じ1台のカメラで記録するための光学系を構築した。

運動観察の結果、どちらのテンプレートを用いた場合でも、kinesin-5の分子数に依っては運動方向が逆転するケースがあることを確認したが、再現性が低く、この点は現状では不明瞭である。引き続きこれらの運動観察と解析を続行し、分子数と運動方向の関係を明らかにしたい。並行して、運動方向性決定と方向性逆転のメカニズムを理解するために、kinesin-5に外部負荷を掛けた時の応答を光ピンセット装置を用いて計測する実験系の構築を行った。予備実験の結果、

kinesin-5 では，従来型キネシン (kinesin-1)の計測で使われるような pN レベルの力ではなく，もっと小さな力のやり取りによって運動方向の逆転が起きている可能性が考えられた．この結果から，従来よりも小さな力を計測できる新しい光ピンセット装置を開発する必要性が出てきた．これを実現するためには，従来よりもプローブを小さくするか，あるいはプローブの形を工夫したり，複数のビーズをトラップして回転自由度を無くす必要がある．後者の回転自由度を無くす方法は実験系が複雑であり，ただでさえ複雑な複数分子複合体の測定が，さらに複雑化するため，前者の小さなプローブを使うシンプルな方法を選んで開発を進めた．この方法は，もし実用化すれば汎用性が高く，様々な力学測定に応用できる可能性がある．小さなプローブを使用する場合，トラップが難しい直径 200 ナノメートルより小さなプローブを光トラップする方法を開発することと，小さくなったプローブから得られる散乱光が極めて小さいため，プローブの位置の検出感度を实用レベルまで高めることが大きな課題となる．すでにこれらの問題を解決するための新たな光学系を試しており，近い将来に弱い力のやり取りの実測による，運動方向逆転のメカニズムの解明が進むと期待される．

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 1 件)

#Krementsova EB, #Furuta K, Oiwa K, Trybus KM, Ali MY: “ Small teams of myosin Vc motors coordinate their stepping for efficient cargo transport on actin bundles ” , J Biol Chem 2017, 292:10998-11008. doi: 10.1074/jbc.M117.780791 (# は共同筆頭著者), 査読有り

[学会発表](計 1 件)

Kaneko Taikopaul, Kazushi Sasakura, Ken 'ya Furuta, Kazuhiro Oiwa, Hirofumi Shintaku, Hidetoshi Kotera, Ryuji Yokokawa, “ Integration of Au nano-pillars and SAM enables protein patterning with designed spacing at single molecule level ” , 17th IEEE International Conference on Nanotechnology, Pittsburgh, USA, July 25-28, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 健也 (FURUTA, Ken 'ya)

国立研究開発法人 情報通信研究機構・未来 ICT 研究所 フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：40571831