

令和元年6月17日現在

機関番号：82636  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2018  
課題番号：17K15110  
研究課題名(和文) 生物分子モーターをリバースエンジニアリングする

研究課題名(英文) Reverse engineering of biomolecular motors

## 研究代表者

古田 茜 (Furuta, Akane)

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・特別研究員

研究者番号：10772337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物の動きを作り出す生物分子モーターはこれまでの研究で運動機能に重要な部分が多数特定されているにも関わらず、一方向性の運動を生み出す動作原理は未だに明らかになっていない。本研究では、生物分子モーターの中でもキネシンに着目し、キネシンを構成する部品をランダムに組み合わせたものから、新たな分子モーターを創るという手法を採り、多数の構造と機能の対応関係から、一方向性運動を生み出すための要件を帰納的に抽出することを目的とする。この手法でまずはキネシンを二つのモジュールに分け、ランダムに組み合わせた新規分子モーター群を多数つくったところ、元のキネシンとは運動方向が反転するものを得ることができた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生物分子モーター、キネシンの動作原理を、多数の類似物を創ることによって帰納的に理解するという新しい発想に基づくものである。この手法で、オリジナルのキネシンと同じモジュール構成でありながら、モジュール同士を組み上げ方が異なるだけで、運動方向性が逆転する新しいキネシンを得ることに成功した。分子構造のどのような要素が運動方向性を決めているのかを理解することができれば、自然界から教えられた設計原理をそっくり移植することで、タンパク質に限らず、他の有機材料を用いた新たな分子マシンの開発にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Biomolecular motors are protein machines that can drive directional movement along cytoskeletal tracks and thus produce mechanical works in the cell. Although previous studies on biomolecular motors have provided information about important features and structures for motility, the design principles for directional movement is still unknown. In this study, we focused on kinesin, one of biomolecular motors that generate directed movement toward the plus end of microtubules. To reveal the directionality determinant of kinesin movement, we took a constructive approach where components that comprise kinesin molecule are randomly permuted and assembled to create a new series of kinesin motors. To our surprise, one of these kinesins showed minus-end directed movement on microtubules, which is opposite to that of the original kinesin. Further analyses of the new minus end-directed kinesin will allow us to unveil the directionality determinants of kinesin motors.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター キネシン ダイニン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生物分子モーターの中でも、ミオシン、キネシン、ダイニンなどの細胞骨格系モーターは、細胞内でレールとなる細胞骨格フィラメントの上を、ATP (アデノシン三リン酸) のエネルギーを消費して一方向に動くことで、細胞運動や物質輸送を担うタンパク質分子である。ナノメートルスケールの分子モーターが働く空間は、水分子が激しく衝突する熱運動の嵐の中にあり、私達の身近にある人工的な機械とは全く異なる動作原理で動いていると考えられる。このような過酷な環境の中で、柔らかなポリマーが折れ畳まただけのタンパク質が、どのように熱運動に打ち勝って一方向性を生み出しているのか、という点は、生物分子モーターの研究において本質的な問いと言える。

近年発達した一分子計測技術や構造解析技術により、生物分子モーターの運動メカニズムの詳細が明らかになってきた。分子モーターは、ATP加水分解に伴って構造変化を起こすことで細胞骨格フィラメントと結合、あるいは解離できる状態になり、その際、極性のあるフィラメントのどちらか一方へ「偏って移動」し、これを繰り返すことで一方向に移動することができる。偏って移動するための原理として、大きく分けて二つの仮説が考えられている。一つは、分子モーターがATP加水分解に伴ってレバーアーム運動とよばれる大きな構造変化を起こすことで熱運動に打ち勝ってフィラメントの一方の端へ移動する、というものである。もう一つは、逆に熱運動を動力として利用し、ATP加水分解のエネルギーは、単にそれを一方向に偏らせるために使われているという説で、どちらが正しいか、ということは元より、そもそもこれらの説が互いに排他的なのかどうか、という点も含めて議論が決着していない。

運動方向性を決めるメカニズムに関しては、重要な実験結果が示されている。例えば、特定の部位の長さを変えたり (Bryant et al., 2007 *PNAS* など)、順方向性と逆方向性のモーターのキメラ分子を作ったり (Schliwa et al., 1997 *Nature*; Endow et al., 1998 *Science*; Yamagishi et al., 2016 *Structure*) などの方法で、分子モーターの運動方向性を逆転させることに成功した例がある。しかし結局のところ、これらの研究から分かったことは、図1を見ても分かる通り、モーター部位 (フィラメント結合とATP加水分解機能をもつ部位) と荷物を結合する尾部との接続部分であるネックの部分が「重要である」ということである。しかし、このように変異を導入して結果的に運動方向性が逆転したり失われたりすることで、ある特定の部位が「重要である」ということが分かっても、**どのようにデザインすれば一方向に動くのか、という設計原理を得ることは原理的に難しい**。未知の機械の仕組みを知りたいとき、作ってみてその動きを見るのが近道である。人工の機械に対する「リバースエンジニアリング」を例に取れば、仕組みの分からない機械の設計原理を知るために、まず、その機械をバラバラに分解して、各 부품の機能を理解することから始めるが、実際はそれだけでは全体の設計方法まで到達しない。次のステップとして、それらの部品を雑に組み上げては結果を観察する実験を繰り返しながら設計原理を漸次的に理解する、という過程が必要になる。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来のように、「変異を入れて応答を見る」ような分析的な方法とは逆の方法論、つまり、既知の部品を組み上げ、「つくことで機能と構造の対応を調べる」という、構成的な方法によって、**一方向性を生み出す要件**を理解することを目指す。既に申請者らは、既知のタンパク質部品を組み合わせ、微小管上を動くダイニンというモーターから、アクチン繊維上を動く新たな分子モーターを創ることに成功している (Furuta et al., 2016 *Nature Nanotechnology*)。この研究では、ダイニンのコアモジュールをベースにして、これに元々の微小管と結合するモジュールではなく、アクチン繊維に結合するアクチン結合タンパク質モジュールを融合した。その結果、本来は結合する相手ではないアクチン繊維と結合して、それを一方向に運動させる能力を発現することが分かった。さらに単に機能モジュールの組み合わせ方を変えることで運動方向を逆転させることができることを発見した (図2)。ここまで思い切ったモジュールの組み換えを行っても運動機能を維持しているということと、全く同じモジュール構成でありながら、モジュール同士の組み合わせ方を変えるだけで運動方向が逆転したことは、一方向性運動を生み出すためにモジュール間の厳密な連携は必ずしも必要ではないことを示唆している。つまり、単純に前に進むというシンプルな機能を実現するには、エネルギーを使ってモーターのブラウン運動を一方向に制限するような仕組みがあれば良い、という極めてシンプルなメカニズムが推測される。ここから我々は、分子がフィラメントの極性に対して**結合しやすい方向、あるいは解離しやすい方向、のように、ある一定の異方性を持つならば、一方向性運動が生じうる**、という作業仮説を立てた。これは、生物分子モーターよりも少しだけ小さなスケールの、有機合成技術で作製された分子マシンの設計原理と同一であり、個々の生物分子モーターの特殊性に依らない、一般的な設計原理を見据えたものである。

そこで本研究では、「モジュールの組み合わせ方」に焦点を当て、モジュール構成は同じでも組み合わせ方が異なる分子モーターを多数作り、それらの運動方向性と構造との対応を数多く取得することで、分子構造のどのような要素が運動方向を決めているのかを、帰納的に理解することを目指す。ただし、上記のダイニンの結果は重要な示唆ではあるが、ダイニンのモーター部位は複雑で大きいいため、まだまだブラックボックスが多い。そこで本研究では、より単

純な構造をもつキネシンのモーター部位を使用する。すでに我々の予備実験で、たった1種類ではあるが、順方向性キネシンの部品だけを用いて逆方向性のモーターの作製することに成功している。そこで、上述した作業仮説に基づいて、モーターのフィラメントへの結合しやすさ、あるいはフィラメントからの解離しやすさを、それぞれ、金粒子を用いたナノメートル計測技術と、本研究のために新たに開発している超高精度な光ピンセット装置を用いて測定することで、分子構造と運動方向性の間にある一貫したルールを導きたい。

### 3. 研究の方法

生物分子モーターの中で、最も単純な構造を持つキネシンを用い、これを「モーター部位」と「ネック」の2つのモジュールに分け、円順列変異法によってモーター部位のランダムな位置にネックが結合した新規分子モーター群を創る。得られた多数のモーターについて、フィラメントとの結合あるいは解離のしやすさが、フィラメントの極性に対しどのように変わるのか(たとえば順方向には解離しにくく、逆方向には解離しやすい、など)を、金粒子を用いたナノメートル運動計測や、光ピンセットを用いた力学測定、分子動力学シミュレーションによって調べ、運動方向性と分子構造の間の対応を明らかにする。さらに、クライオ電子顕微鏡を用いて微小管と変異キネシンの複合体の構造を解き、構造変化の詳細と運動方向性との関係を理解する。

#### -新しい分子モーターを創る

我々の過去の研究では、ダイニンをベースに、既存のタンパク質モジュールを組み合わせて新しいモーターを作製することに成功したが、ダイニンのモーター部位は、モジュール構造こそ明確に分かれているものの、分子量約40万と巨大であり、ATP加水分解部位を4つも含む複雑な構造を持つ。そこで本研究では、分子量約4万で、1つのATP加水分解部位しか持たない単純な構造のキネシンを使用する。ダイニンは微小管結合部位とATP加水分解部位が明確に分離しているが、キネシンはこれらが渾然一体となってモーター部位を形成しており、キネシンはこのモーター部位からなる頭部と尾部の2つのモジュールに分けられる。本研究では、この頭部モジュールをベースとして、キネシンの尾部のかわりにFLNa1という棒状の構造タンパク質をモジュールとして用いることにした。FLNa1は、アクチンフィラメントを架橋するフィラミンAを構成するサブユニットで、安定な棒状構造をとることが明らかにされている。キネシンのモーター部位とネックとの間にはネックリンカーという領域があり、頭部に直接相互作用して効率の良い運動を作り出す重要な領域であることが知られている。本研究ではあえてネックリンカーごと尾部を取り除き、まったく無関係なタンパク質部品(FLNa1)に置き換えることで、特定のアミノ酸間の相互作用などによる複雑さを排除した。キネシン頭部モジュールとFLNa1モジュールのつなぎ方は、円順列変異法という技術を用いて頭部のランダムな箇所FLNa1を結合する、という方法を用いる。このような方法で作った新規タンパク質の集団から、既存の運動測定法を用いて、微小管上を運動する活性を持つものをスクリーニングする。

#### -ナノメートル計測により新しい分子モーターのフィラメント結合・解離特性を調べる

モジュールの組み合わせ方を様々に変えて得られた新しい分子モーター群について、運動方向性と分子構造との間の関係を調べる。作業仮説(研究目的に記述)によると、分子がフィラメントの極性に対して結合しやすい方向、あるいは解離しやすい方向、のように、ある一定の異方性を持つと予想される。結合しやすい方向に異方性を持つ場合と、解離しやすい方向に異方性を持つ場合のそれぞれを高精度で計測するため、それぞれ、金粒子を用いたナノメートル計測と、光ピンセットを用いた力学計測を行う。

### 4. 研究成果

まず、キネシンを、「モーター部位」と「ネック」の2つのモジュールに分け、円順列変異法という技術を用いてモーター部位のランダムな位置にネックが結合した新規分子モーター群を作製した。計40種類からなる新規分子モーター群の中から既存の運動測定法を用いて、微小管上を運動する活性を持つものをスクリーニングしたところ、元のキネシンとは運動方向性が逆転し、マイナス端方向性を示すモーターを得ることができた。得られた新しいキネシンは、元のキネシンと全く同じ構造をもつモジュールで構成されていながら、モジュール間のつなぎ方を変えただけで本来の運動方向性が逆転しており、これらを用いることで、運動方向性と分子構造との関係を調べることができる。この新規分子モーターと、オリジナルのキネシンの運動活性を比較することで、運動方向性を決めるメカニズムを明らかにする目的で研究をすすめている。お互いに反対の運動方向性をもつ2種類の分子モーターの、微小管への結合様式の違いを光ピンセットを用いて調べたところ、運動方向性が反転した新規分子モーターは、そもそも微小管への結合が非常に弱いために、シグナルを検出できないという問題が生じた。この問題に対し、測定系の改良と共に、ビーズと分子モーターの結合の方法を検討した。ビーズと分子モーターのスペースをできるだけ取った方が、高いシグナルが得られるという、過去の論文での実験結果を参考に、ビーズと分子モーターの間のスペーサーを検討しているところである。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ken 'ya Furuta, Akane Furuta, Re-engineering of protein motors to understand mechanisms biasing random motion and generating collective dynamics, Current Opinion in Biotechnology, June 2018, Volume 51, Pages 39-46

〔学会発表〕(計 3 件)

指宿良太、古田茜、大岩和弘、小嶋寛明、古田健也、生物分子モーターの再デザイン、日本生物物理学会 第 65 回年会、2018 年

Ryota Ibusuki, Akane Furuta, Tatsuya Morishita, Kazuhiro Oiwa, Hiroaki Kojima, Ken 'ya Furuta, Engineering motor proteins to move along DNA nanotubes, 日本生物物理学会 第 56 回年会、2018 年

Yuka Matsuda, Akane Furuta, Hiroaki Kojima, Kazuhiro Oiwa, Ken 'ya Furuta, DNA-templated assembly of axonemal outer arm dynein complexes in vitro, 日本生物物理学会第 56 回年会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。