

平成 22年 3月 31日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710170  
 研究課題名（和文） 低分子化合物による分子モーターEg5の作動機構及び阻害機構の研究  
 研究課題名（英文） Investigations of molecular mechanism of Eg5 and inhibitory mechanism of Eg5 inhibitors.  
 研究代表者  
 矢島 潤一郎（YAJIMA JUNICHIRO）  
 学習院大学・理学部・研究員  
 研究者番号：00453499

研究成果の概要（和文）：細胞分裂装置である紡錘体の形成には、キネシン様モータータンパク質 Eg5 が必須で、Eg5 の機能阻害により細胞分裂が中断してしまう重要な分子モータータンパク質である。紡錘体形成の仕組みの理解には、Eg5 が引き起こす微小管のふるまいを3次元空間で詳細に調べる必要があるが、通常の顕微鏡では2次元平面での振る舞いしか観察することができない。そこで微小管に結合した微小な量子ドットを3次元で観察できる顕微鏡を開発し、今回3次元空間でEg5によって駆動される微小管の運動を動画として捉えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have discovered that microtubule sliding over surface-attached to single kinesin-5 heads, which is essential for building a mitotic spindle at cell division, rotate at a fixed rate around their long axis. This remarkable observation of a corkscrewing motion of the microtubule was achieved by three-dimensional nanometer resolution optical tracking of a quantum dot attached to the sliding microtubule. The new method uses only one optical component (a prism) without any modification of other aspect of the optical setups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：バイオナノマシーン

1. 研究開始当初の背景  
 細胞分裂の分裂期特異的に機能するモータータンパク質 [Eg5] は、その分

裂期特異性から、細胞周期進行を阻害する低分子化合物の標的分子として注目され、世界中の複数のグループか

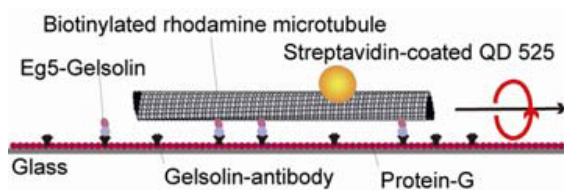
ら、複数の天然・合成化合物が発見・同定されていた。しかしながら Eg5 の運動の分子機構及び、阻害剤による運動阻害の分子機構の詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、3次元位置検出顕微鏡により、(1)ATP 駆動性のキネシン様モータータンパク質 Eg5 が、フィラメント様細胞骨格微小管と相互作用し、微小管を駆動させる分子機構の解明及び、(2) Eg5 に特異的阻害剤活性を有する低分子化合物を利用し、Eg5 の運動の阻害機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

キネシン様分子モーター蛋白質Eg5により駆動される微小管の運動を詳細に観察するために、微小管の回転の邪魔にならないサイズの小さな目印を微小管側面につけ、3次元でその目印を追跡するシステムを構築した。

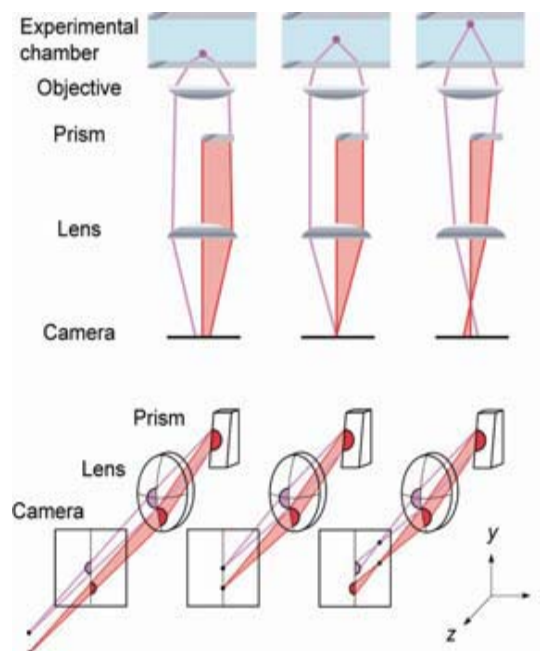


〔図1〕実験の模式図。

小さな目印には量子ドットを利用し、量子ドットをアビジン-ビオチン結合によって微小管に固定した。使用した量子ドットは紫外光により励起され青色の蛍光を発生し、微小管は赤色の蛍光のローダミンで染色した。カバーガラス上には多数のEg5分子を固定し、ATP濃度、阻害剤濃度に応じたEg5の上を微小管が滑り回転運動する様子を記録し、解析ソフト(Igor)により定量化する。阻害剤としては、微小管や他のモーター蛋白質などには作用しない、Eg5のみに阻害効果を引き起こすmonastrolを使用した。

微小管に結合した量子ドットの3次元の位置を検出するために採用した光学系を簡単に図2に示す。この顕微鏡システムは、特殊なプリズムを通して撮影された一枚のビデオ画像から、対象となる物体の位置情報を3次元的に時間とともに追跡でき、原理的に単純で画期的な顕微鏡システムである。さらに、光

源を量子ドットの励起に有効なキセノンランプを用い、これによりプローブの光強度を増し、かつ、安定性・再現性を高めた。そして、励起光をファイバーから照射することでノイズとなるレーザー本体を除振台から取り除き、位置精度を増した。ステージのz方向のドリフトを取り除くために perfect focus system (ニコン社)を導入し、z方向のナノメートル計測を長時間可能とした。



〔図2〕3次元の位置を検出する光学系。像が顕微鏡内に挿入したプリズムにより2つに分割された後カメラに投影されると(図2のx-y平面)、溶液中の量子ドットの高さの位置に応じて像の重心位置が異なる。この2次元平面での2つの像の重心位置から、従来では得ることができなかった高さ(z)の位置情報を精度よく得ることができる。

## 4. 研究成果

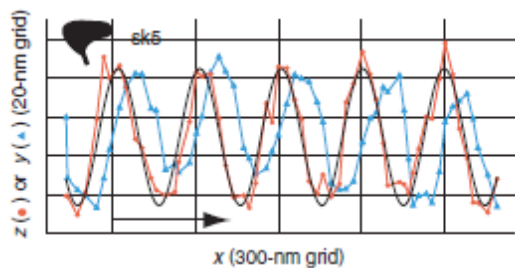
(1) Eg5の基本的運動能の定量的な計測と、(2)低分子化合物によるEg5の運動阻害、特に回転運動に対する効果の定量を行った。(1)では、キネシンのモータードメインによる微小管のコークスクリュウ運動のピッチ(微小管が1回転毎に直進する距離)は、溶液中のATP濃度や塩濃度、微小管の長さなどによらずほぼ一定であることが分かり、微小管を直進させる速度と回転させる速度の比がよく保存されていることが分かった。(2)

では、Eg5に対する低分子化合物の阻害は、直進方向への運動よりも、回転方向への運動に対する効果の方が強い傾向が見られた。以下、詳細に研究成果について説明する。

研究方法で述べたように、実際には1個の量子ドットが結合した1本の微小管がカバーガラス上に固定された複数のEg5により駆動されているが、光学系に挿入したプリズムにより像を2つに分割し、この2枚の画像から、従来では得ることができなかった高さ(z)の位置情報も得られるようになった。

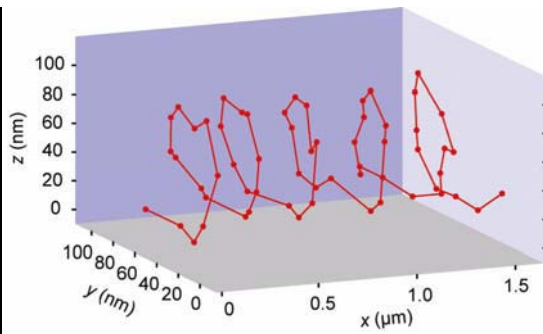


[写真]実際の撮影された蛍光微小管像と量子ドットの像。カバーガラスの上に敷き詰められた分子モーターEg5が量子ドット(写真内ではピンクの点、直径約20nm)を結合した微小管(青、直径は25nm)を矢印の方向にすべり運動させつつ回転運動させている様子。回転運動は解析後初めて分かるほど微小な動きとして検出される。



[図4] XY平面(青)、XZ平面(赤)での微小管に結合した量子ドットの軌跡。新規光学系により、z方向への動きもナノメートルの精度で検出でき、xyプロットばかりかxzプロットも同時に検出できた。

Eg5により駆動される微小管の運動を3次元で観察することに初めて成功した(3次元プロット、図5)。量子ドットをxyz方向でナノメートルの精度でイメージしたところ、微小管は左巻きの螺旋を描いていることを示し、Eg5によって微小管が左巻きコックスクリューのように運動し、回転する力(トルク)を発生することが世界で始めて明らかになった。



[図5]微小管に結合した量子ドットの3次元での軌跡。

この微小管の回転はおよそ300ナノメートル前進すると1回転し、左巻きであることがわかった。溶液中のATPや塩の濃度、ガラス面に付着したキネシンの数、微小管の長さを変えても微小管の回転速度と前進速度の相関はほぼ一定で見事に約300ナノメートルのピッチを示した。また、阻害剤monastrolの効果の指標である $K_i$ 値は直進運動よりも回転運動で小さく、回転運動の分子機構と直進運動の分子機構がそれぞれ独立であることが示唆された。これら単頭キネシンによる微小管の回転のピッチは、微小管の基本らせん構造とは異なり、単頭キネシンが微小管のらせんを辿るように微小管を滑らしているのではないようである。面白いことに、この300ナノメートルというピッチの値は、微小管のプラス端に移動し小胞を輸送するキネシン(kinesin-1)の単頭や細胞分裂時に紡錘体形成に関わるキネシン(kinesin-5)の単頭、マイナス端に移動するキネシン(kinesin-14)など複数のキネシンファミリーで共通であり、キネシンファミリーにおいて共通のトルク生成のメカニズムが存在する可能性がある。このことから、分子モーターキネシンの運動メカニズムを詳細に理解するには、直進方向の運動機構のみならず、回転方向への運動機構を含めて検討する必要があることが示唆された。さらに、M期特異的キネシンのモータードメインがトルクを発生する事実から、細胞分裂時に紡錘体微小管にトルクが生じていることが予想され、細胞分裂過程解明の手がかりとなりうる。

## 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 矢島潤一郎、水谷佳奈、西坂崇之、A torque component present in mitotic

kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. Nature Structural and Molecular Biology, 査読有、15巻、2008、1119-1121

②矢島潤一郎、生体分子機械・キネシンによる微小管のコークスクリーモーション、生物物理、査読有、49巻、2009、137-138

〔学会発表〕(計12件)

①矢島潤一郎、Three-dimensional tracking reveals a torque component in kinesin 5 head. 第7回ウェバー国際シンポジウム、平成20年6月10日、米国・ハワイ州

②矢島潤一郎、Corkscrew motion of kinesin-driven microtubule in a synthetic environment revealed by 3D tracking. 第4回Handai Nanoscience and Nanotechnology 国際シンポジウム、平成20年9月29日、大阪府吹田市

③矢島潤一郎、Characterisation of a torque component in the kinesin power stroke, 第17回Center for Developmental Biology 会議、平成20年10月14日、兵庫県神戸市

④矢島潤一郎、A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. 第2回Bio-nanosystems 国際シンポジウム、平成20年10月31日、東京都文京区

⑤矢島潤一郎、A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. 第48回米国細胞生物学会、平成20年12月17日、米国・サンフランシスコ

⑥矢島潤一郎、Eg5による微小管の回転の3次元トラッキング、第46回日本生物物理学会、平成20年12月4日、福岡県博多市

⑦寺島勲、光ピンセットを用いた3次元力学計測の分子モーターへの応用、第46回日本生物物理学会、平成20年12月4日、福岡県博多市

⑧矢島潤一郎、単頭キネシンによる微小管のコークスクリーモーションの3次元観察、生体運動研究行動班会議、平成21年1月9日、東京都目黒区

⑨矢島潤一郎、Three-dimensional nanometer resolution optical tracking reveals a torque component present in single-headed kinesin. 第53回米国生物物理学会、平成21年3月2日、米国・マサチューセッツ

⑩HMJ Carstairs、A kinesin-based molecular shuttle、英国細胞生物学会 (the dynamic Cell)、平成21年4月2日、

英国・エジンバラ

⑪矢島潤一郎、キネシン分子による微小管のすべり運動に内在するトルク成分に関する研究、第47回日本生物物理学会、2009年10月30日、徳島県徳島市

⑫矢島潤一郎、光学顕微鏡によるキネシン分子モーターの回転運動の直接観察、第35回日本生体エネルギー研究会・ブレイクスルー講演、2009年12月19日、北海道旭川市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢島潤一郎 (YAJIMA JUNICHIRO)

学習院大学・理学部・研究員

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：

### (3) 研究協力者

西坂崇之 (NISHIZAKA TAKAYUKI)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：40359112