

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06635

研究課題名(和文) 光応答性分裂期キネシンを用いた紡錘体統御機構の解明

研究課題名(英文) Spindle function and formation regulated by opt-controllable 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・教授

研究者番号：00453499

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)：細胞分裂期後期に機能するキネシン-6について、*in vitro*実験系によって外部負荷が低い条件では、2量体型キネシン-6単一分子は細胞骨格・微小管上をある程度連続的に移動できることが明らかとなった。また、キネシン-6分子は丸太橋様に配置した微小管の表面に沿って螺旋運動することが明らかとなった。一方、外部負荷がある条件では、運動連続性が低かった。分裂期中期に機能するキネシン-5に対して光応答性タンパク質を用いて、特定波長の光照射の有無によって、キネシン-5の微小管への結合と解離の制御条件を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モータータンパク質キネシンは多種類存在し、各種キネシンは微小管上で力を発生し、細胞分裂等の物理的な現象に関わる酵素である。細胞分裂の分子機構を理解するには各種キネシンの力学的特性を明らかにしておくことも重要であり、本研究ではキネシン-6の力学特性の一端を明らかにした点で学術的意義がある。また、キネシンの力発生を従来法よりも迅速かつ局所的に制御可能な可視光照射で行う手法の開発を進めた。今後、キネシン機能の光制御法の確立によって細胞分裂中の各種キネシン機能が明らかになることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：For kinesin-6 functioning during anaphase, it was found, in an *in vitro* experiment, that single kinesin-6 molecules in dimeric forms were able to move processively on the microtubules under conditions of very low external load. We also found that kinesin-6 molecules move helically along suspended microtubules. On the other hand, in the presence of external load, their processivity were low. With a light-responsive protein for human kinesin-5 functioning during metaphase, we investigated the conditions regulating the binding and dissociation of kinesin-5 to microtubules with and without light irradiation at specific wavelengths.

研究分野：細胞生物学

キーワード：モータータンパク質 分裂期キネシン 光応答性タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂では、細胞骨格微小管や微小管依存性モータータンパク質キネシンやダイニンを構成タンパク質とする紡錘体が自律的に構築され、紡錘体によって染色体の分離や細胞膜の変形等物理的仕事が統御される。染色体の分配では、紡錘体が微小管やモータータンパク質分裂期キネシン(Kinesin Spindle Proteins)の相互作用を通して3次元空間に構築される必要がある。紡錘体形成初期過程における紡錘体極の分離には kinesin-5 が、中央紡錘体の形成には kinesin-6 が必須であるため、これらの分裂期キネシンを特異的に阻害することで、分裂期特異的に細胞増殖を阻害できる。分裂期キネシンをターゲットした阻害剤は多数報告され、従来の微小管作用薬でみられた中枢・末梢神経系への副作用が少ない次世代の抗腫瘍剤として見込まれているが、分裂期キネシンの力学特性は間期細胞質や神経細胞で働く kinesin-1 に比べるとまだ理解が十分に進んでいない。例えば、研究開始当初では、kinesin-6 MKLP1 や MKLP2 が微小管上を連続的に運動できる(processive)かどうかという基本的な運動特性を含め、単一タンパク質分子での力学特性の報告は皆無であった(本研究課題開始後、2020年にオランダのグループから MKLP2<sup>1</sup>、2022年に米国のグループから MKLP1 および MKLP2 単一分子に関してほぼ外部負荷の無い状態における運動連続性、及び、多分子での力学特性<sup>2</sup>に関する報告がされた)。他方、in vivo における紡錘体に必須な分裂期キネシンの活性は、低分子化合物を使った制御による機能阻害によって明らかにされてきた。しかしながら、機能制御(主に阻害)するタイミングや場所をピンポイントでは行えないという制限があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、可視光照射により分裂期キネシンの力学機能の制御を可能とする「メカノ-オプトジェネティクスアプローチ」を開発することを中長期的な目標とし、細胞分裂時に力学的機能を果たす分裂期キネシンを対象とし、(1) in vitro 再構成実験における分裂期キネシン単一分子レベルの力学特性の定量、(2) in vitro 再構成実験における分裂期キネシンの力学特性の光照射による制御系の開発、(3) 分裂過程の任意のタイミングで局所的に分裂期キネシンを光照射により不活性化させることを目的とした。これらの研究および開発を通じ、標的分裂期キネシンの力学的機能を定量し、動的な構造体である紡錘体を巧みに統御する生命独特の分裂システムの分子機構の一端を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分裂期キネシンの力学/運動特性の定量

##### ・分裂期キネシン kinesin-6 の力学特性を計測可能な光ピンセット顕微鏡の構築

本研究グループでは、これまで赤外レーザーで捕捉したマイクロビーズの位置を撮影した画像から計測していたが、時間分解能が低く、また、リアルタイムで微小管に沿ってキネシン分子によって駆動されるマイクロビーズの変位を計測することができなかった。改良するため、捕捉レーザーのマイクロビーズの後方散乱との干渉像を4分割フォトダイオードで検出し、マイクロビーズの位置を測定できる系を導入し、100 kHz でパワースペクトル密度を計算して捕捉力の校正に用い、0.9 kHz 程度でデータの取得が可能となり、捕捉したマイクロビーズの位置をリアルタイムで計測が可能となった。分裂期キネシンとしてヒト kinesin-6 MKLP1/MKLP2 を用い、大腸菌内で2量体型のタンパク質を発現させ、単離した。蛍光微小管はアミノシラン化ガラスにグルタルアルデヒド処理して強固にガラス基板に結合させ、微小管の揺れを低減させた。キネシンはC末端側をビオチン化し、アビジンが修飾されているマイクロビーズに固定して、計測に用いた。

##### ・分裂期キネシン kinesin-6 の新規運動特性の定量

本研究グループがこれまで開発してきた3次元位置検出顕微技術<sup>3</sup>を用いて、微小管に沿って移動する分裂期キネシン kinesin-6 の3次元軌跡を得て、その運動特性を解析した。分裂期キネシンとして線虫 kinesin-6 Zen4<sup>4</sup>を用い、大腸菌内で2量体型、または、単量体型の kinesin-6 を発現させ、単離した。蛍光微小管は一部ビオチン化し、アビジン化した凸凹ガラスチャンバの凹の部分に結合して丸太橋状に配置し、微小管のあらゆる側面に kinesin-6 が相互作用できるようにした。キネシンはC末端側に SNAP-tag を融合し、SNAP-tag 抗体を介してマイクロビーズに固定して、計測に用いた。

#### (2) 分裂期キネシンの運動性の光照射制御

##### ・生体試料の調整

特定波長の光照射の照射状態と非照射状態とを切り替えることでキネシンの活性を可逆的に制御するため、phototropin の光感性部位である LOV2 ドメインを利用した LOVTRAP ツール<sup>5</sup>を用いた。相対的に小さなサイズの Zdk をキネシン-5、-6 のモータードメインのN末端側、もしくは、ネックリンカー付近に融合して大腸菌内で発現させ、単離した。LOV2 は大腸菌内で発現さ

せて精製し、加えて青色光に対する反応性を失った変異体 LOV2(C450A)も得た。Kinesin-6 Zen4 のネックドメインと結合して Zen4 の活性を制御する結合タンパク質 CYK4 にも LOV2 を融合した。チューブリンは Castoldi らが開発した High-Pipes 法<sup>6</sup>を用いて豚脳から精製した。

#### ・光照射によるキネシンの運動制御の検討

LOVTRAP ツールを用いてキネシンの運動活性の制御条件を検討するため、a) 微小管をガラス基板に結合し、その微小管上でのキネシンの動態を観察、b) ガラス基板上にキネシンを固定し、その上を微小管が動かされる様子を観察できるような運動アッセイ系を適宜用いた。青色光は LED 光源を用い、全反射顕微鏡のステージ上に磁気台座によって固定しチャンパーに照射した。

## 4. 研究成果

### (1) 分裂期キネシン kinesin-6 とその結合タンパク質による運動制御

微小管をガラス面に固定する従来のキネシンの運動観察方法では、微小管の長軸に対して横方向にキネシンが移動した場合にはガラス基板に衝突して運動に影響を与えていたが、本研究方法では、微小管のあらゆる側面でのキネシンの運動を観察できる。3次元位置検出顕微鏡を用いて、kinesin-6 が微小管のあらゆる側面に沿って動く軌跡を3次的に取得した(図1)。定量的結果、kinesin-6 は微小管長軸方向に沿って一方に進むだけでなく、左方向にも移動し、微小管に沿って螺旋運動をすることが明らかになった。それらの軌跡を隠れマルコフモデルを用いて2状態に分類し、拡散係数、及び、高次の共分散との関係によりベイズ推定法に基づいて全方向へのステップ確率を推定した結果、kinesin-6 は微小管表面を前後左右方向へふらふらと移動しながら、全体としては前左方向に移動することが明らかになった。Kinesin-6 のネック部位への結合タンパク質 CYK4 の結合によって、左右方向へのステップ頻度の揺らぎが増大することがわかった(図2中央)。

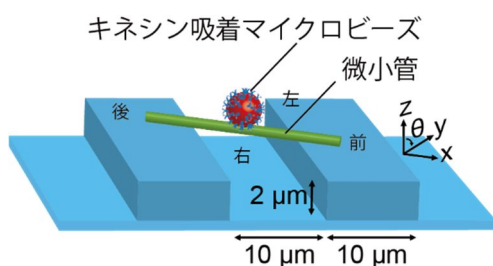


図1 細胞内の環境を模した実験系の模式図

微細加工技術による凹凸の繰り返しパターンを持つ加工ガラスを用いた。アビジン-ビオチン結合を利用して丸太橋状に配置した微小管に沿って kinesin-6 が吸着したマイクロビーズ(直径 200 nm)が微小管のあらゆる側面を運動することができる。

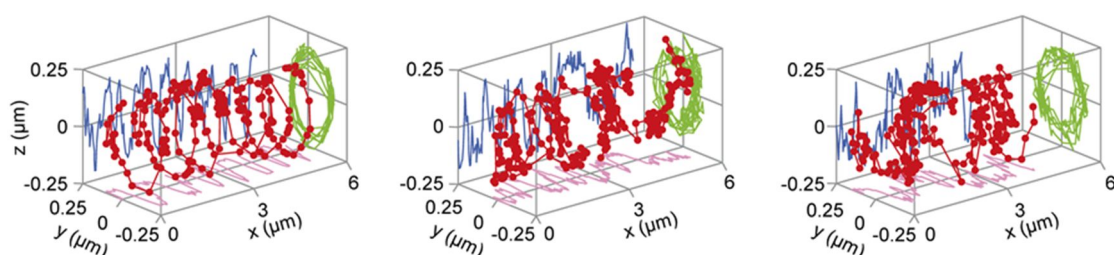


図2 微小管表面上を前後左右方向に移動するキネシン-6 の3次元軌跡。ピンク;xyプロット、青;xzプロット、緑;yzプロット、赤;3次元プロット。左図:2量体型 kinesin-6 の3次元軌跡。微小管に沿って左ねじの螺旋運動を示した。中央図および右図:kinesin-6 と結合タンパク複合体及び単量体型 kinesin-6 の3次元軌跡。微小管に沿ってふらふらとしながら主に左・前方向に運動することが分かった。

### (2) 分裂期キネシン kinesin-6 の力学特性の定量

光ピンセット光学系を構築し、kinesin-6 MKLP2 の力学特性を定量した。大腸菌内での発現量を改善した MKLP2 を用い、赤外レーザー(1064 nm -Yb-YAG)捕捉用マイクロビーズにアビジン-ビオチン結合を利用して MKLP2 を固定した。ビーズに固定された MKLP2 分子において、微小管と相互作用する MKLP2 が1分子程度の場合は、外部負荷下で微小管上を移動するシグナルは現行の検出系においては得られなかった。微小管と同時に相互作用する MKLP2 分子が複数分子の場合は、外部負荷下でも微小管上を連続的に運動することができたが、kinesin-1 と比較した場

合、発生できる出力が小さいことがわかった。これらの結果は細胞内で推定された複数分子の力学特性と一致した<sup>2</sup>。

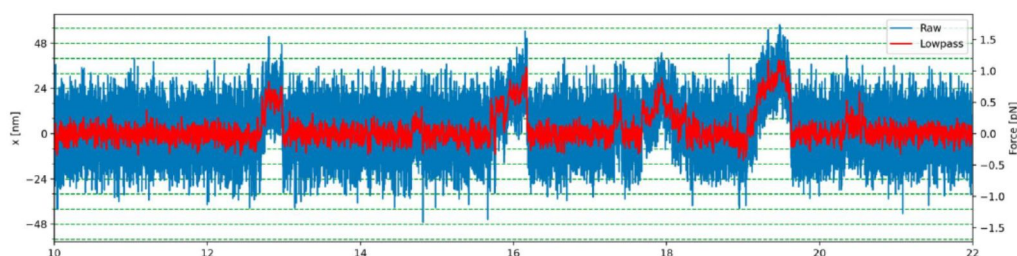


図3 複数 kinesin-6 分子による外部負荷下での力学特性。青：取得軌跡データ、赤：平均化軌跡。

### (3) 光照射によるキネシンの運動制御の検討

研究の方法の項(2)aの実験系において、微小管上の Zdk1\_Eg513\_eGFP に対し mRuby3\_LOV2 の光照射に応じた結合・解離反応を定量した。青色光照射後、微小管に沿った mRuby3 の輝度が急激に低下し、青色光が消えると低下した輝度が回復することが分かった。非光照射下で輝度が回復する速さは約 2.6 Int(A.U.)/s であった。二回目の青色光照射時にも輝度が急激に低下し、青色光が消えると低下した輝度が回復することが分かった。変異体 mRuby3\_LOV2C450A を用いた場合は、青色光が消えても(非光照射下)低下した輝度は回復しなかった。微小管上に結合しているキネシンの Zdk1 に対し、光照射で LOV2 が解離し、光の非照射で LOV2 が結合することがわかった。

研究の方法の項(2)bの実験系において、Kinesin-5 Eg5-Zdk1 を用い LOV2 濃度を変えて微小管の運動速度を計測した。同一の微小管の非光照射下での運動速度に対する青色光照射下での運動速度を解析すると、8割の微小管が青色光の照射によって運動速度を上昇させた。

### (参考文献)

1. Adriaans, I. E. *et al.* MKLP2 Is a Motile Kinesin that Transports the Chromosomal Passenger Complex during Anaphase. *Current biology: CB* **30**, 2628-2637.e9 (2020).
2. Poulos, A., Budaitis, B. G. & Verhey, K. J. Single-motor and multi-motor motility properties of kinesin-6 family members. *Biology open* **11**, (2022).
3. Yajima, J., Mizutani, K. & Nishizaka, T. A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. *Nature structural & molecular biology* **15**, 1119-1121 (2008).
4. Maruyama, Y. *et al.* CYK4 relaxes the bias in the off-axis motion by MKLP1 kinesin-6. *Communications Biology* **4**, 180 (2021).
5. Wang, H. *et al.* LOVTRAP: an optogenetic system for photoinduced protein dissociation. *Nature Methods* **13**, 755-758 (2016).
6. Castoldi, M. & Popov, A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expression and Purification* **32**, 83-88 (2003).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamagishi Masahiko, Maruyama Yohei, Sugawa Mitsuhiro, Yajima Junichiro	4. 巻 555
2. 論文標題 Characterization of the motility of monomeric kinesin-5/Cin8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 115 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.134	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 Marumo Akisato, Yamagishi Masahiko, Yajima Junichiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Three-dimensional tracking of the ciliate Tetrahymena reveals the mechanism of ciliary stroke-driven helical swimming	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02756-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Yohei, Sugawa Mitsuhiro, Yamaguchi Shin, Davies Tim, Osaki Toshihisa, Kobayashi Takuya, Yamagishi Masahiko, Takeuchi Shoji, Mishima Masanori, Yajima Junichiro	4. 巻 4
2. 論文標題 CYK4 relaxes the bias in the off-axis motion by MKLP1 kinesin-6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01704-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sugawa Mitsuhiro, Maruyama Yohei, Yamagishi Masahiko, Cross Robert A., Yajima Junichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Motor generated torque drives coupled yawing and orbital rotations of kinesin coated gold nanorods	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04304-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamagishi Masahiko, Sumiyoshi Rieko, Drummond Douglas R., Yajima Junichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Anchoring geometry is a significant factor in determining the direction of kinesin-14 motility on microtubules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19589-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Shin, Yamagishi Masahiko, Yajima Junichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Torque generating properties of Tetrahymena ciliary three-headed outer-arm dynein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21001-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Junichiro Yajima
2. 発表標題 A chiral torque component present in bio-nanomachine kinesins.
3. 学会等名 第46回分子生物学会年会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rieko Sumiyoshi, Masahiko Yamagishi, Mitsuhiro Sugawa, Junichiro Yajima
2. 発表標題 The movement of kinesin with the neck linker hanging free in solution
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	須河 光弘  (Sugawa Mitushiro)  (80626383)	東京大学・大学院総合文化研究科・助教   (12601)	光学顕微システムの高度化

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
---------	---------