

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15744

研究課題名（和文）光応答性キネシンによる紡錘体機能の時空間制御システムの構築

研究課題名（英文）Spatiotemporal control system of spindle function by photoreactive kinesin

研究代表者

山岸 雅彦（Yamagishi, Masahiko）

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30815501

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：紡錘体という真核細胞の運動装置の機能解明には、モータータンパク質が働く時期と場所を明らかにする必要があります。本研究はモータータンパク質に光応答性タンパク質を導入し、光照射によって運動機能を制御する実験系を構築することで、特定の時期や場所で紡錘体形成中のモータータンパク質の活性を調べることが目的です。まず、モータータンパク質キネシン（kinesin-1、kinesin-5、kinesin-14）の個別の運動機能についてin vitro実験で解明し、トルク発生や運動方向制御に関わる部位を特定した。また、運動機能を阻害しない光制御タンパク質の導入位置を検討し、表面残基の置換変異体を作成、評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紡錘体の機能解明は生物学や医学分野において重要です。細胞分裂の異常はがんや発達異常の原因となるため、紡錘体の正常な機能の理解は疾患予防や治療法の開発につながります。光制御技術を応用すると、特定の時期や場所でタンパク質の活性を制御する手法の開発が期待されます。本研究では紡錘体のモータータンパク質の活性化時期と位置を明らかにし、その機能や制御メカニズムに新たな知見をもたらすことができます。さらに、キネシンの個別の運動機能解明は細胞内の運動プロセスの理解を深める上で重要です。これらの成果は学術的に価値があり、紡錘体の機能解明による社会的な利益や疾患の予防・治療に寄与する可能性があります。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the functionality of the spindle apparatus, a universal cellular motility apparatus in eukaryotic cells, it is necessary to determine when and where motor proteins are active. This study aims to investigate the activity of motor proteins involved in spindle formation at specific times and locations by introducing light-responsive proteins into the motor proteins and constructing an experimental system to control their motility through light irradiation.

Initially, the motility functions of individual motor proteins, namely kinesin-1, kinesin-5, and kinesin-14, were elucidated through in vitro experiments, identifying the parts involved in torque generation and directional control. Additionally, the introduction sites of light-responsive proteins that do not hinder motility were examined, and mutant variants with surface residue substitutions were created and evaluated.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター キネシン 光制御

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は、生物の成長や組織の修復など、多くの生命現象において不可欠なプロセスである。特に真核細胞の分裂では、染色体が正確に分配される必要がある。この染色体の分配は紡錘体と呼ばれる構造によって行われる。紡錘体は微小管やモータータンパク質などの要素から構成され、染色体の動きや分配を制御する。紡錘体が形成・機能するためにはモータータンパク質が特定のタイミングと場所で適切な力を発揮する必要がある。しかし、紡錘体の形成・機能とモータータンパク質の働きに関する詳細な分子メカニズムはまだ十分には解明されていない。

これまでの研究では、紡錘体の構成要素であるキネシンなどの活性は、変異体タンパク質や RNAi、薬剤などを用いたアロステリック制御により明らかにされてきた。しかし、これらの手法では遺伝子の改変や分子の注入が必要であり、機能制御のタイミングや場所を正確に操作することは難しいという制限がある。特に、細胞分裂過程において紡錘体極やKファイバー、極間微小管、染色体腕、動原体など、さまざまな領域で働く分裂期キネシンのような場合には、特定の局所でどれだけの「力仕事」を行っているのか不明な状況であった。

2. 研究の目的

本研究では新たなアプローチとして、光応答性タンパク質を利用し紡錘体におけるモータータンパク質キネシンの分子メカニズムを解明することを試みた。光応答性タンパク質は光照射によって構造変化を起こし、その機能を制御することができる。この特性を利用することで、紡錘体に関与するモータータンパク質キネシンの機能を任意のタイミングや場所で光によって ON/OFF することで制御し、キネシンの挙動を詳細に観察することが可能となる。

具体的には、以下の目的を持って研究を行った。

1. 分裂期キネシンの機能部位の特定：紡錘体の機能に関わるキネシンの運動活性を制御するために、運動活性を担う部位を特定する。変異体を作成し *in vitro* 実験によりキネシンの機能を制御する部位を特定する。
2. 光応答性タンパク質の構造変化を利用したメカノオプトツールの開発：分裂期キネシンの機能部位に光応答性タンパク質を導入することで、分裂期キネシンの活性を光によって任意のタイミングや空間で制御するシステムを構築する。
3. 分裂期キネシンの時間的・空間的な分子プロセスの解明：メカノオプトツールを用いて、生細胞内で分裂期キネシンが紡錘体形成の初期過程から収縮環の収縮までの時系列的な分子プロセスや空間的な挙動を明らかにする。

以上により、モータータンパク質という力を発生する分子の光による活性制御ツール（メカノオプトツール）の開発・実装といった新たな切り口で、紡錘体形成過程における分裂期キネシンの機能の解明を目指す。

3. 研究の方法

1. 細胞分裂に関わるキネシン kinesin-1, kinesin-5 および kinesin-14 に対して、遺伝子操作によりキネシンの運動活性（運動速度・運動方向・トルク発生など）を制御すると考えられる部位にアミノ酸変異を導入した変異単量体を作成し、大腸菌で形質転換・発現させ、キネシンタンパク質を高純度で精製する。得られたタンパク質を用いて *in vitro* gliding assay 実験により運動をナノメートルレベルで3次元位置検出が可能な蛍光顕微鏡で観察する。変異の有無や変異体間の運動活性を比較することで制御に関わる部位を特定する。
2. キネシンの運動機能を光によって任意のタイミングや任意の場所で制御するため、分裂期キネシンの活性制御部位に光照射に応じて性構造変化（結合・解離）するタンパク質（LOV2 と Zdk1 または iLid と SspB）を融合し光制御キネシン（メカノオプトツール）を作成・精製する。光の非照射による光応答タンパク質の結合（活性 OFF）と光の照射による解離（活性 ON）で光制御キネシンが（不）活性化するか

どうかを *in vitro* で検証する。光制御の効果は、光照射の有無の条件下で 1 分子レベルのキネシンを対象に行う。全反射顕微鏡を用いて、それぞれのコンストラクトの運動速度、processivity (微小管上での運動連続性) の定量及びモノマー/ダイマー/テトラマーの検証を行う。

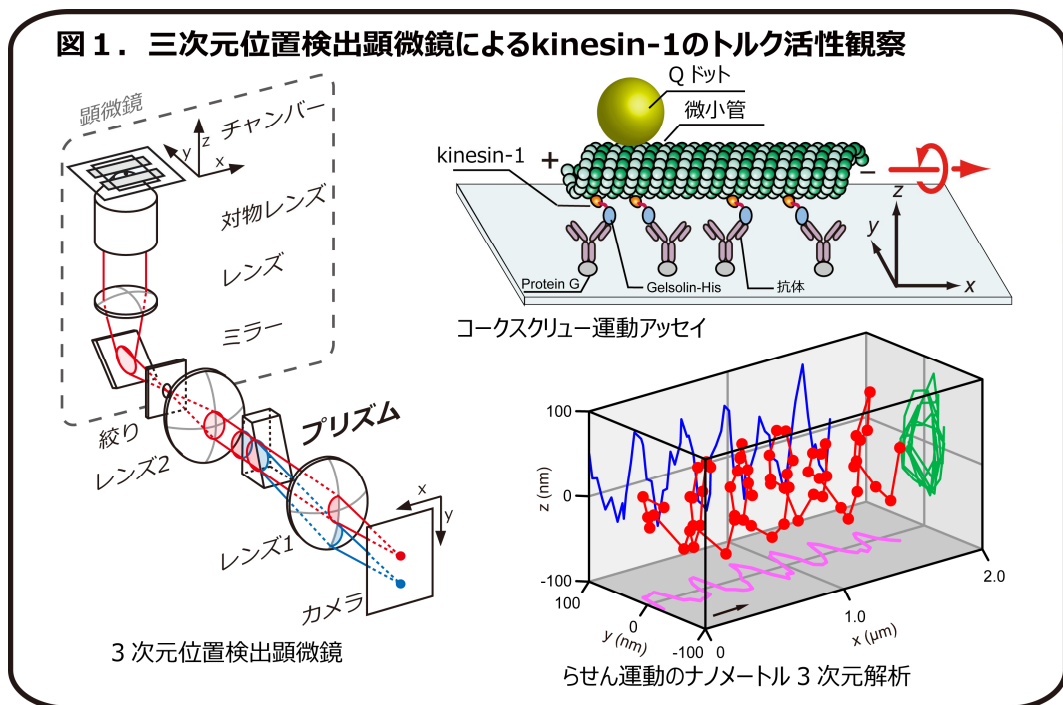
3. HeLa 細胞に光制御キネシンを遺伝子導入し一過性発現させ、活性化状態で内在性キネシンと同様に機能することを確認する。細胞分裂期の紡錘体形成の各過程、および、局所において、導入した光制御キネシンの活性を光によって不活性化し、紡錘体の動態を共焦点顕微鏡によりリアルタイムイメージングすることで、紡錘体内の各種分裂期キネシンの各過程および各局在場所における機能を解明する。

4. 研究成果

a. kinesin-1 のトルク制御部位の特定

分裂期キネシンは *in vitro* の実験で微小管をらせん状に回転させる動き (トルク発生) をすることが知られている。このらせん状の回転ピッチは、微小管のらせん構造ピッチより小さくなっており、キネシン自体が持つ固有の特性であるが、その発生機構および紡錘体における機能は不明である。トルク発生する kinesin-1 のモータードメインの N 末側部位 cover-strand がトルク発生に与える影響を調べるため、cover-strand に変異を導入した変異体を複数種作成し、単量体 kinesin-1 によって運動する微小管の並進速度・トルク活性を定量した。(図 1)

その結果、キネシンの濃度やイオン強度・ATP 濃度が、並進速度や回転速度に影響を与えるが、らせん運動のピッチにはほとんど影響を与えず、ATP 濃度が低い場合にわずかな増加が見られるだけでした。さらに、キネシンタンパク質の N 末端にある cover-strand に特定の変異を導入することで、らせん状のピッチが減少することが確認できた。これらの結果は、キネシンのトルク発生は N 末部位により制御されることを示した。



b. kinesin-5 の運動方向制御

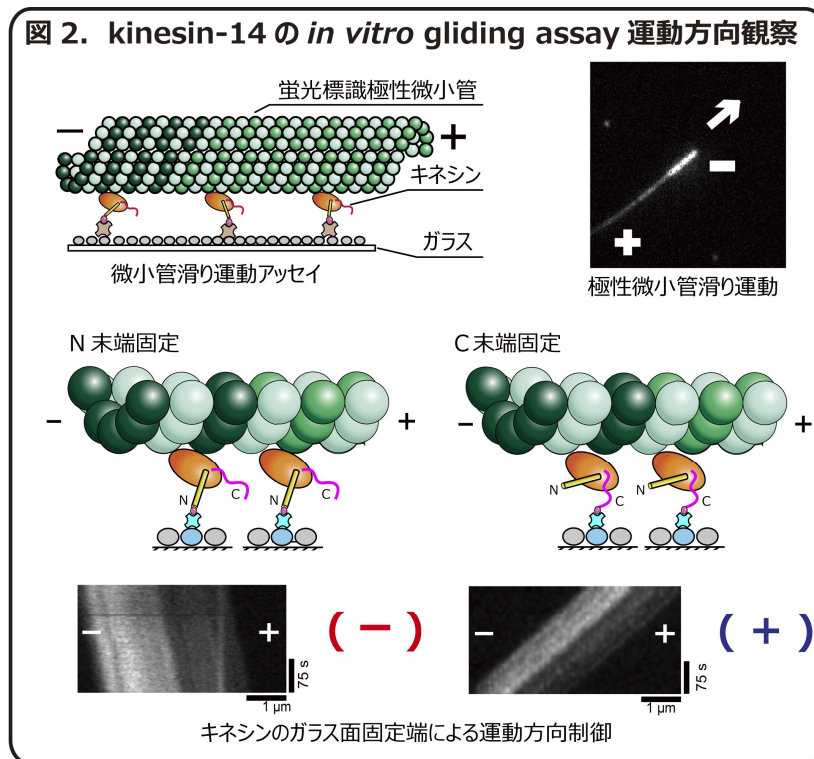
分裂期キネシン kinesin-5 は四量体構造をとり、紡錘体形成において重要な役割を果たしている。*Saccharomyces Cerevisiae* の kinesin-5 である Cin8 は *in vitro* 運動実験ではイオン強度やモーターの密度に応じて双方向の運動性を示すことが報告されているが、その双方向性運動活性がどのように制御されているかは不明である。この Cin8 特有な loop-8 ドメインの約 99 アミノ酸残基を保持した単量体と欠損させた単量体を作製し、極性標識された微小管を用いた *in vitro* gliding assay 実験により運動方向を調べた。

その結果、いずれの単量体も測定可能なイオン強度・分子密度の範囲で双方向性活性を示さないことが判明した。この結果は Cin8 による双方向性の運動には多量体構造が必要であることが示された。さらに、*in vitro*での微小管らせん運動実験により、単量体 Cin8 が微小管をらせん状に回転させ、一定の左巻きピッチを持つことも明らかにした。

c. kinesin-14 の運動方向制御

紡錘体形成時に紡錘体極に局在する kinesin-14 には微小管マイナス端方向運動活性が重要である。N 末端 neck 部位の保存されたアミノ配列の欠損により、kinesin-14 はプラス端方向運動に切り替わることから、N 末端の固定ではプラス端方向運動と互換性があることが先行研究で示されている。しかし、マイナス端方向運動における固定端位置の役割については、体系的な研究が行われてはいない。そこで、ガラス面での固定端のみが異なる単量体 kinesin-14 の運動性を調べた。(図2)

その結果、C 末端の固定により kinesin-14 はプラス端方向に運動方向が変化するとともに、微小管らせん回転の方向とピッチは kinesin-1 と類似していることを示した。これは、マイナス端方向運動性 kinesin-14 とプラス端方向運動性 kinesin-1 が高度に保存された触媒コアの機能を共有し、固有のプラス端方向へのバイアスを持つことを示唆している。したがって、N 末端の固定は kinesin-14 におけるマイナス端方向運動の要件の一つであることが明らかとなった。



d. キネシンに対する光制御タンパク質の導入自体が運動機能を阻害しないような導入部位の検討のため、kinesin-14 の表面残基のシステイン置換変異体の作成を進め、*in vitro*で評価を進めた。

e. 生細胞内でのキネシン運動活性の光制御を実現するため、遺伝改変をした分裂キネシン遺伝子を HeLa 細胞に導入し一過性発現させ、実際に細胞分裂時に内在性キネシンと共に機能していることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamagishi Masahiko, Fujimura Shoko, Sugawa Mitsuhiro, Nishizaka Takayuki, Yajima Junichiro	4. 巻 77
2. 論文標題 N terminal strand of single headed kinesin 1 can modulate the off axis force generation and resultant rotation pitch	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytoskeleton	6. 最初と最後の頁 351 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cm.21630	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 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 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masahiko Yamagishi, Shoko Fujimura, Mitsuhiro Sugawa, Takayuki Nishizaka, Junichiro Yajima
2. 発表標題 The N-terminal -strand of single-headed kinesin-1 is involved in the off-axis force-generation and resultant rotation pitch
3. 学会等名 第58回生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiko Yamagishi, Junichiro Yajima
2. 発表標題 Plus-end directionality is present in the catalytic core of kinesin-14 minus-end directed motors
3. 学会等名 第59回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸 雅彦
2. 発表標題 何がキネシンを一方に運動させるのか？
3. 学会等名 THE ToKYo Molecular Motor Show
4. 発表年 2023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

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