

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 2 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770164

研究課題名(和文)単純な酵素から分子モーターを創ることによる分子機械の設計原理の探究

研究課題名(英文)Molecular design of motor proteins by directed evolution

研究代表者

古田 健也(Furuta, Kenya)

独立行政法人情報通信研究機構・未来ICT研究所 バイオICT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) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：研究の途中において試験管内翻訳でタンパク質の発現量がなかなか上がらないなど、様々な困難があったため、研究計画を2つに分け、1つは当初の計画通り分子を進化させるサイクルを実施し、もう一つは、DNAナノ構造を足場として利用して、複数のタンパク質の複合体を構成する事により新たな機能を創り出す研究を進めた。前者の研究では、分子進化によって興味深い性質の分子を創出することが出来た。ただし、その性質についてはさらなる分析・検討が必要である。後者の研究では、様々な分子モーターを複数結合させた複合体の機能を計測した結果、分子モーターの種類によって、その協同性が大きく異なるなどの新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：As there was a variety of difficulties in the course of the study, including a low expression level of proteins in in vitro transcription/translation system, I conducted two researches: one is a study using directed evolution as I originally planned, and the other one is the study of creating a new function by using a DNA scaffold to reconstitute a complex of several motor proteins. In the former study, I created molecules with interesting properties by directed evolution (the patent application is under consideration). In the latter study, I revealed that cooperative, collective behavior of motor protein complexes is highly dependent on the type of motor proteins.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：キネシン 進化分子工学 分子モーター

1. 研究開始当初の背景

生物は、進化を経てデザインされた生体分子モーターとよばれるタンパク質分子機械によって積極的に運動を起こすことで生命活動を維持している。この生体分子モーターの存在により、単純な拡散に比べて何桁も大きな速度で物質を輸送することが出来る。生体分子モーターの中でも、その動作機構について最も研究が進んでいるのが、筋肉を駆動するミオシンと、様々な物質を輸送するキネシンと呼ばれるタンパク質で、これらは細胞骨格フィラメントの上を、エネルギー源である ATP を繰り返し分解しながら一方向に運動する。これらの分子モーターがどのように一方向性の運動を実現しているかについて、幅広い分野の研究者によって理論、実験の両面で多くの研究が活発に行われてきたが、未だ答えは出ていない。一方向への移動を実現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、分子モーターが細胞骨格フィラメントと結合した状態で、ATP の代謝に伴い分子内に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フィラメントのどちらか一方の端へ偏って移動し、これを繰り返すことで一方向に移動する、というものである。もう一つは、熱運動による確率的なゆらぎを原動力としており、ATP の代謝エネルギーは、単にそれを一方向に偏らせるために使われている、というもので、現在までにどちらの説が正しいかを示す決定的な証拠は示されていない。分子モーターの動作原理は、本質的な部分で大きな疑問が提示されたままであると言える。

2. 研究の目的

動作原理の分からない機械を理解するには、構造と機能を対応付けて帰納的に理解していくことが必要だが、天然から得られる限られた種類の分子は、既にそれぞれの多様な役割のために進化を遂げており、ある構造が当該の機能に必要な十分な構造かどうか、という切り分けが原理上困難である。

そこで本研究では、試験管内進化法を用いて、低分子 GTP アーゼなどの比較的単純な酵素からタンパク質フィラメント上を運動することが出来るタンパク質を創る過程で、化学エネルギーを消費してタンパク質フィラメントと「結合・解離する」、「動く」という機能に対応する必要最小限の構造を獲得し、構造と機能の間に明確な対応関係を見いだす。このような方法によって、生体分子モーターの動作原理、さらには所望の機能を持つ分子機械を創るための設計原理を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

低分子 GTP アーゼを元にして試験管内で分子を進化させるために、リボソームディスプレイ法(Mattheakis et al., 1994)、ファージディスプレイ法(Smith et al., 1985)を適宜用いる。これらの手法の本質は、表現型(タンパク質)と遺伝型(DNA/RNA)を物理的にリンクさせて対応づけた膨大な種類の分子を含むライブラリを作ることにある。このライブラリから、タンパク質の活性を指標にして分子の選別を行えば、自ずとその設計図(DNA/RNA)が手に入ることになる。これらの技術を用いて試験管内で変異導入と選別を繰り返して分子を進化させることにより、新規に細胞骨格フィラメントとの結合・解離ができる、さらにはその上を運動できるタンパク質を創り出す。初期配列として、キネシン-1 のモータードメインと、small GTPase である ras タンパク質を使用し、細胞骨格フィラメントと相互作用できるたんぱく質のスクリーニングを行う。

研究の途中において、試験管内翻訳でタンパク質の発現量がなかなか上がらないなど、様々な困難があったため、研究計画を2つに分け、(1)一つは当初の計画通り分子を進化させるサイクルを実施し、(2)もう一つは、DNA ナノ構造を足場として利用して、複数のタンパク質の複合体を構成する事により新たな機能を創り出す研究も進めた。(2)では、DNA 2本鎖をモータータンパク

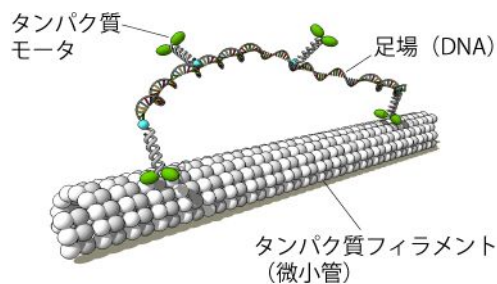
質が結合する“足場”として用い、従来のようにプローブに平均X個の分子が付いている、という実験系ではなく、例えばきっかり2, 3, 4分子の分子がプローブに結合している状況を作るような新しい実験系を開発することを旨とした。足場となるDNA構造は、二種類の方法で作成した。一つはDNA二重鎖で、もう一つは、DNA origami と呼ばれる技術である (Rothemund, 2006)。前者では、1~68 nm 間隔で、5分子までのモータータンパク質を結合したものを作製した。後者では、58 nm 間隔で、8分子までのモータータンパク質を結合した筒状のDNA origamiを使用した。モータータンパク質とDNAとの間のインターフェイスは、SNAP-tag あるいは HaloTag と呼ばれる酵素タグをモータータンパク質に融合して用いた。酵素タグはDNAに結合させておいた基質と共有結合をつくるので、複合体は安定であり、分子数の確認が SDS-電気泳動によって簡便に行えることが大きなメリットである。

作製したDNA-モータータンパク質複合体の活性は、微小管上での一分子蛍光観察と、光ピンセットと呼ばれる微小力学測定装置を駆使して行う。

4. 研究成果

(1) 前者の研究では、分子進化によって細胞骨格と相互作用できる興味深い性質の分子を創出することが出来た。ただし、その性質についてはさらなる分析・検討が必要である。(2) 後者の研究では、様々な分子モーターを複数結合させた複合体の機能を計測した結果、分子モーターの種類によって、その協同性が大きく異なるなどの新たな知見が得られた。まず、一分子で連続的に運動できるキネシン-1に関しては、数を増やしても速度が変わらないが、連続運動距離は飛躍的に伸びるという結果が得られた。一方、1分子で連続的に運動できないキネシン-14 と呼

ばれるモータータンパク質に関しては、対照的な結果が得られた。キネシン-14は、分子数を2分子に増やすと連続的な運動が可能になり、速度は2分子でプラトーに達した。また、光ピンセットによってこれらのモータータンパク質が発生する力を測定したところ、キネシン-1は分子数を増やしても平均の最大力は横ばいだったのに対し、キネシン-14では分子数に応じて発生できる力の大きさが大きくなっていくことが明らかになった。これらの結果は、集団で動作することに適したモーターとそうでないモーターを、細胞が細胞内の区域や目的に応じて使い分けていることを示唆しており、細胞内輸送や細胞骨格ネットワークの形成において、モータータンパク質の集合離散が担う役割を考える上で重要である。



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 3件)

1. 「Coupling of Two Non-processive Myosin 5c Dimers Enables Processive Stepping along Actin Filaments」
 Laura K. Gunther, 古田 健也, Jianjun Bao, Monica K. Urbanowski, Howard D. White, 小嶋 寛明, Takeshi Sakamoto
 2014年5月9日 Scientific Reports, Vol. 4, page 4907, DOI: 10.1038/srep04907, 査読有り
2. 「バイオイメージングと光ピンセットを用いた微小管系モータータンパク質の協

同的活性化に関する解析」

古田 健也, 鳥澤 嵩征, 豊島 陽子

2014 年 4 月 25 日, 生化学, Vol. 86 No.2
page 184-191.

<http://www.bioweb.ne.jp/content/seika/seika1402.html>, 査読なし

3. 「Measuring Collective Transport by Defined Numbers of Processive and Nonprocessive Kinesin Motors」

古田 健也, 古田 茜, 豊島 陽子, 網野 美
紗子, 大岩 和弘, 小嶋 寛明

2012 年 12 月, Proc Natl Acad Sci U S A
(米国科学アカデミー紀要), 2013.

110(2): p. 501-6. doi:

10.1073/pnas.1201390110, 査読有り

[学会発表](計 16 件)

1. 「Self-regulation of cytoplasmic dynein」

古田 健也, 鳥澤 嵩征, 古田 茜, 市川 宗
蔵, 斎藤 慧, 大岩 和弘, 小嶋 寛明, 豊
島 陽子

2013 年 12 月 17 日, 2013 ASCB Annual
Meeting, New Orleans Ernest N. Morial
Convention Center, New Orleans, LA, USA

2. 「Self-regulation of cytoplasmic dynein」

古田 健也

2013 年 11 月 1 日, Dynein 2013
International Workshop, 神戸ファッション
ン美術館, 兵庫県神戸市

3. 「COOPERATIVE TRANSPORT BY DEFINED
NUMBERS OF PROCESSIONAL AND NONPROCESSIONAL
KINESIN MOTORS」

古田 健也, 豊島 陽子, 小嶋 寛明, 大岩 和
弘

2011 年 7 月 12 日, ゴードン研究会議,
Colby-Sawyer College, New London, USA

4. 「RECONSTITUTION OF COLLECTIVE
TRANSPORT BY DEFINED NUMBERS OF
KINESIN-1 AND KINESIN-14, TWO OPPOSING
MOTOR PROTEINS」

古田 健也, 豊島 陽子, 小嶋 寛明, 大岩 和
弘

2011 年 3 月 6 日, 米国生物物理学会 第 55
回年会, Baltimore Convention Center,
Baltimore, Maryland, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 健也 (FURUTA, Ken'ya)

独立行政法人 情報通信研究機構・未来 ICT
研究所 バイオ ICT 研究室・主任研究員

研究者番号: 40571831