

	かめ い たかし		
氏名	亀井敬		
授与学位	博士（工学）		
学位授与年月日	平成17年3月25日		
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項		
研究科，専攻の名称	東北大学大学院工学研究科（博士課程）金属工学専攻		
学位論文題目	生体分子モーターのシステム化された高次運動の1分子解析		
指導教員	東北大学教授 鈴木 誠		
論文審査委員	主査 東北大学教授 鈴木 誠	東北大学教授 栗原 和枝	
	東北大学教授 末永 智一	東北大学教授 樋口 秀男	
			(先進医工学研究機構)

【本研究の背景】

タンパク質は、数～数十ナノメートルスケールにおいて、多様かつ高度な機能を発現する生体ナノ分子機械であり、その機能メカニズムの解明は、生命科学研究の重要なテーマである。機能メカニズム解明のため、様々な実験手法が開発されてきた。その中でも、タンパク質1分子のダイナミクスを直接観察する、蛍光標識、レーザー、顕微鏡技術を巧みに組み合わせた1分子観察技術は、近年注目されている手法の1つであり、特に、ダイナミックに動くタンパク質・モータータンパク質の運動機能メカニズム解明に威力を発揮している。

モータータンパク質には、回転運動する回転モーターと、レールフィラメント上を滑走運動する性質を持つ線形モーターの存在が知られている。例えば、線形モーターとレールの系は、(1) 相互作用する相手への分子認識機能、(2) アデノシン3リン酸 (ATP) を加水分解する触媒反応機能、(3) 化学エネルギーを力学エネルギーに変換する機能、(4) フィラメント形成におけるモノマーの自己集合機能等が、ナノメートルサイズに収まっている。そのため、高機能ナノマシン・モータータンパク質の作用機序を1分子レベルで解明することは、タンパク質一般の機能メカニズム解明へのモデル、さらに、人工ナノマシンの創製等、将来の応用研究への礎となると考えられる。

タンパク質の機能メカニズムを1分子レベルで解明することは、非常に重要であるが、それだけでは生命現象を理解出来ないことも真である。なぜならば、生命は、複数（多数）分子がシステム化された統合体であり、また、タンパク質1分子の機能も、複数ドメインのシステム化によって発現されているからである。従って、生命現象の深い理解には、1分子（素子）機能を精確に解明し、その知見を元に、複数分子（素子）のシステム化された機能を明らかにする必要がある。また、工学的な応用として、ナノマシン、ナノデバイス等の創製にも、機能発現における素子のシステム化は必要不可欠であり、1分子（単1素子）理解を起点とした分子のシステム化は、これからの生物学や（生物）工学に重要な概念である。

【本研究の目的】

キネシンは、1分子で大きな力（最大~7 pN）を出し、取扱いが比較的容易なため、モータータンパク質の運動（力発生）メカニズムを考える上で、良いモデル試料と言える。キネシンは、ATP加水分解ドメインであるモーター頭部2つによる双頭構造を有し、これらの協調作用によって、細胞内でレールフィラメント・微小管上を1方向連続運動し、主に、物質（小胞）輸送を担っている。双頭部はホモダイマーを形成し、各頭部が運動に果たす役割の判別が困難であるため、単頭部の運動特性について未解明の点が多い。双頭キネシンの1方向連続運動は、単頭部の機能のシステム化によって発現されると考えられ、運動メカニズムの精確な記述には、単頭モーター部の運動特性に関する知見が必要不可欠である。また、生体内では双頭、或いは単頭モーター複数分子が小胞と結合すると考えられ、単頭キネシン複数分子の運動は、物質輸送等を担うシステム化された高次な運動として、非常に興味深い研究対象である。

本研究の目的は、（1）キネシン単頭モーター単1分子の運動特性と（2）単頭キネシン複数分子による運動を、システム化された運動と捉え、その特性を明らかにすることである。

【実験系】

（1分子力学測定）

単頭キネシンの運動特性は、レーザートラップナノ計測装置によって評価された。赤外レーザーでトラップした単頭キネシンビーズを、蛍光標識した微小管と相互作用させ、動いたビーズの位置変位を、4分割フォトダイオードで検出した（分解能 1 nm、1 ms）。

（タンパク質の調整）

単頭キネシンのコンストラクトは、モーター頭部と BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein) から構成され、BCCP のビオチンとストレプトアビジンを介して、直径 200 nm のポリスチレンビーズと結合させた。微小管はローダミンによって蛍光標識され、その極性はマイナス端側を強く標識することによって判別した。

【単頭キネシン単1分子の運動特性；非連続的な運動とバイアス結合】

様々な濃度の単頭キネシン溶液と一定濃度のビーズ溶液を混合し、単頭キネシンビーズを作製した。ガラスチャンバー内でレーザートラップされたビーズを、微小管と相互作用させ、その様子を観察した。まず、AMP-PNP (γ -Imidoadenosine 5'-triphosphate) 存在下で、単頭キネシンが微小管と長時間強く結合する性質を利用し、観察した全ビーズ中、微小管と結合したビーズの割合を求め、ビーズ上の単頭キネシン平均分子数を、ポアソン分布を考慮して決定した（図1、四角と点線）。

1 mM AMP-PNP、6 μ M ATP 両条件において、ビーズが微小管と相互作用した割合は一致した (図1、四角と三角)。また、ビーズ上の単頭キネシン平均分子数が1以下の時、6 μ M ATP 条件において、連続的に運動したビーズは観察されず、結合・解離のみの相互作用が観察された (図1、三角と菱形; 図2、a)。従って、単頭キネシン単1分子は、結合・解離のみを示し、連続的な運動をしないと結論付けた。

次に、単頭キネシン単1分子の微小管への結合を解析した。結合直後、解離直前における50 ms間の微小管プラス端方向への平均変位 X_1 、 X_2 と、結合から解離までの変位 X_2-X_1 、さらに、結合時間 t_b の値を求めた。この結果、 $X_1=3.4\pm 0.8$ nm (mean \pm s.e.)、 $X_2=3.5\pm 0.9$ nm、 $X_2-X_1=0.18\pm 0.6$ nm となり、単頭キネシン1分子は、微小管のプラス端方向に ~ 4 nmの偏りを持って結合(バイアス結合)し、結合中の有意な変位は認められなかった。 t_b のヒストグラムは1次の自然関数減少型を示し、時定数の値にATP濃度依存性が認められたことから、ATP1分子の加水分解サイクルに結合・解離が1回生じることが示された。さらに、生化学的な研究で明らかにされた反応スキームから、バイアス変位は単頭キネシンがアデノシン2リン酸(ADP)を放出し、微小管と強く結合する間に生じると考察された。

【単頭キネシン2分子の運動特性; システム化された1方向性連続運動】

双頭キネシン、または、単頭キネシン複数分子の微小管上における1方向連続運動は、単頭モーター一部の機能がシステム化された運動と捉えられ、このメカニズムを明らかにする必要がある。

まず、1方向連続運動(図2、b)に必要な単頭キネシン最小分子数を求めた。微小管上を連続的に運動するビーズの割合は、ビーズ球体上の単頭キネシン2分子が微小管と同時に相互作用する曲線と一致し、1方向連続運動に必要な単頭キネシン最小分子数は、2であることが示された(図1、円、菱形、実線)。

単頭キネシン2分子において、一方の分子は、微小管と結合し、完全に解離することを防ぎ、他方の分子は、単頭キネシンのバイアス結合によって、方向性を生み出す役割を果たしていると考えられる。これらの役割は、単頭キネシンにかかる負荷等の伝達によって、各単頭間で交換され、1方向連続運動が生じると考えられる。単頭キネシン2分子による力と速度は、共に小さく、これは、ビーズ上の単頭キネシン2分子の方が、コイルドコイルを有する双頭キネシンの2つのモーターより、微小管への相互作用、運動制御に対する厳密性が低下したためだと考えられる。

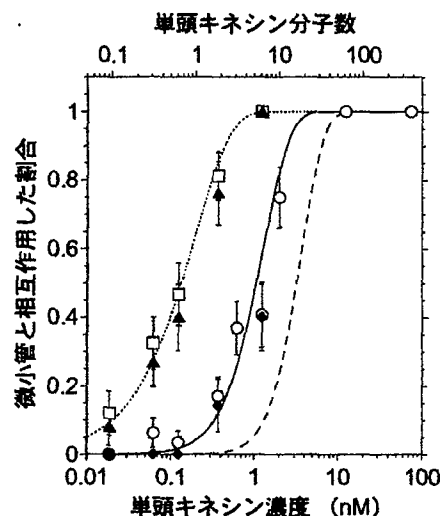


図1 微小管と相互作用した単頭キネシンビーズ

縦軸は、計測した全ビーズ中微小管と相互作用した単頭キネシンビーズの割合。四角、三角は、それぞれ1 mM AMP-PNP、6 μ M ATP条件下において微小管と相互作用した単頭キネシンビーズの割合を示す。1 mM AMP-PNP条件でのデータは、ボアソン分布を考慮した曲線(点線)に近似出来、ビーズ上の単頭キネシン平均分子数を求めることが出来た(上部横軸)。連続的に運動する割合は、円(1 mM ATP)、菱形(6 μ M ATP)で示した。エラーバーは $\pm p(1-p)/n$ で表した(p は相互作用した割合、 n (=19-42)は測定したビーズの数)。実線、破線は、それぞれ、ビーズ上の2またはそれ以上、3またはそれ以上の分子が同時に相互作用する割合を示す理論曲線。

【単頭キネシン 3 分子以上の運動特性；多数分子による振動】

細胞内における物質輸送機能は、複数（多数）のキネシン分子によって、果たされていると考えられる。そのため、単頭キネシン複数分子系の運動特性を明らかにすることは、素子（単頭）機能のシステム化と、それによる細胞内輸送運動等の生命現象を考える上で重要である。

ビーズ上のモーター数を増やすと、力発生が頻発し、大きな力、また、ランダムな結合・解離を伴う力発生が観察された。また、ビーズ上に単頭キネシンが平均 60 分子存在する時、驚くべきことに、~30%のビーズに、連続的な前進と後退の 2 方向性を持つ運動が観察された（図 2、c）。この運動を示したチャートを周波数解析すると、固有の周波数にピークが認められた。これは、単頭キネシン複数分子が振動することを示したもので、キネシンの運動特性における新知見である。

単頭キネシン複数分子の振動において、前進・後退運動は、共に ATP 濃度依存性があり、後退運動もエネルギー消費することが明らかになった。また、振動は前進・後退運動、これらの運動の転移から構成されるサイクルで表され、時間と変位の関係は 1 次の自然関数で近似出来た。振動メカニズムの記述は複雑になると予想されるが、本研究では、ビーズ上の単頭キネシン分子の負荷のかかり方（微小管上の配置に影響されると考えられる）等を考慮した運動モデルを考察した。

【本研究の結言】

(1) 生体分子モーター、キネシンの単一モーター頭部の運動特性を明らかにした。単頭キネシン単 1 分子は連続的に運動せず（図 2、a）、微小管に対して進行方向（プラス端）に~4 nm の変位を伴うバイアス結合をする。(2) 単頭キネシン 2 分子の運動特性について明らかにした。1 方向連続運動するために（図 2、b）、単頭キネシンは最低 2 分子必要である。単頭キネシン

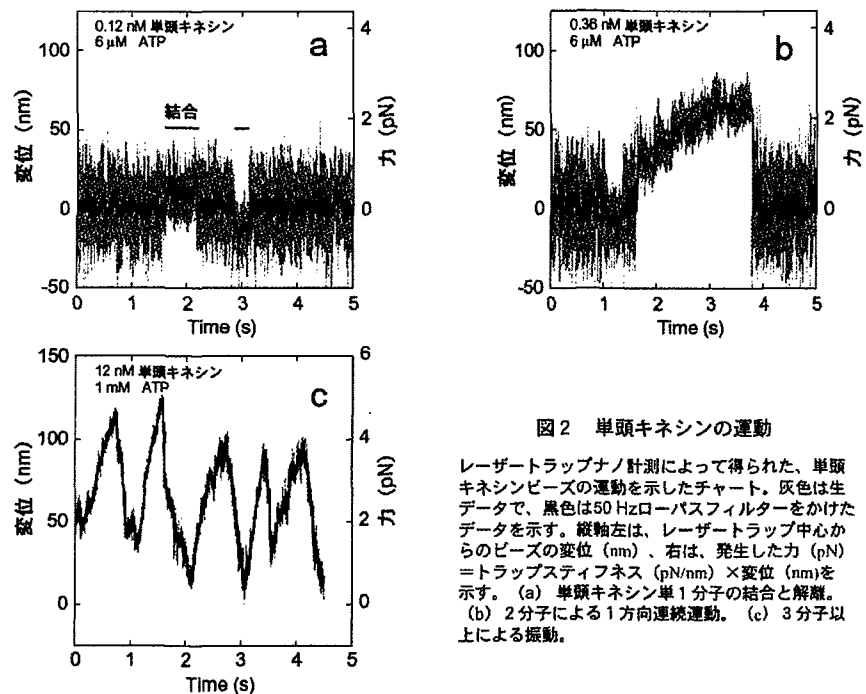


図 2 単頭キネシンの運動

レーザートラップナノ計測によって得られた、単頭キネシンビーズの運動を示したチャート。灰色は生データで、黒色は 50 Hz ローパスフィルターをかけたデータを示す。縦軸左は、レーザートラップ中心からのビーズの変位 (nm)、右は、発生した力 (pN) = トラップスティフネス (pN/nm) × 変位 (nm) を示す。(a) 単頭キネシン単 1 分子の結合と解離。(b) 2 分子による 1 方向連続運動。(c) 3 分子以上による振動。

2 分子、双頭キネシンは、共にバイアス結合を通して、一方のモーターは進行方向へのバイアス、他方は結合によるレールからの解離・拡散を防ぐ役割を担うことで、1 方向連続運動を生み出している。

(3) 単頭キネシン 3 分子以上の運動特性を明らかにした。単頭キネシン複数分子は、発振機構を持

つことが明らかにされた。複数モーター分子による振動は、高次にシステム化された協調的な運動と捉えられる。

本研究は、単1モーター素子から運動機能がシステム化される過程（単頭キネシン単1分子のパイアス結合、2分子の1方向連続運動、3分子以上の振動）を、明確に示した。この過程は、ミオシンやダイニン等のモータータンパク質の運動機能発現にも適用される可能性がある。本研究の成果は、将来、タンパク質間相互作用の一般原理に拡張され、さらに、ナノマシンの設計やナノデバイスのシステム化等のモデルとして参考にされることが期待できる。

論文審査結果の要旨

本研究は、タンパク分子機械として近年急速に研究が進んでいる生体分子モーターの1つであるキネシンと微小管の運動機構を1分子計測手法を応用して調べたものである。

第1章では、研究の背景としてキネシン・微小管システムのこれまでの実験的研究の総括をおこない、1分子計測によって期待される知見の可能性と、工学的な意義について述べ、本研究の意義と目的および本論文の構成を記述している。

第2章では、実験に使用した装置と解析手法について述べている。とくに本論文の中核となる1分子・2分子・3分子以上のモータータンパクの結合を確認するためのポアソン分布を応用した手法について述べている。この手法によって1分子の特性か2分子以上のシステムの特性であるかを判別することが可能になったことは、本研究の大きな成果である。

第3章では、単一キネシン分子の運動特性、とくに変位と力の時間変化を中心に測定して得た結果についてまとめている。実験の結果、キネシン1分子が微小管に結合するとき結合直後に必ず3.5nmほど一方向にずれるバイアス結合をすること、いったん結合すると移動はしないことを発見した。これはキネシンが一方向に運動する基本過程としてきわめて重要な発見と考えられる。

第4章では、2分子系の運動特性について述べている。ここでは2分子になると連続した運動が起こることを示した。これにより連続運動のしくみを説明するモデルを提案し運動特性を議論している。ここでの成果は、連続した運動をする最小単位は2分子であることを明らかにしたことである。

第5章では、キネシン分子が多数存在するときの運動特性について述べている。ここでは、多数存在することで力が増強されるのではないかとの期待に反し、鋸歯状波の振動運動を示すことを発見した。これは、負荷の向きによって結合定数が変化するこれまでの知見をあわせると定性的に説明のつく現象であることを簡単なモデルを用いて述べている。

第6章は総括である。本研究の結果、タンパク分子機械のしくみとしてバイアス結合がはばひろく生体系で利用されている可能性と工学的に応用する可能性について述べている。

このように、本研究は、1分子計測を独自の手法で発展させ、モータータンパクの1分子運動機構の重要なプロセスを明らかにしたもので、工学的にも新たな局面を切り開く可能性を示している。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。