

輸送分子モーターを連結したシステムの一分子観察

東京大学大学院工学系研究科・准教授 富重 道雄

1. 初期の研究目標と実際の研究推進

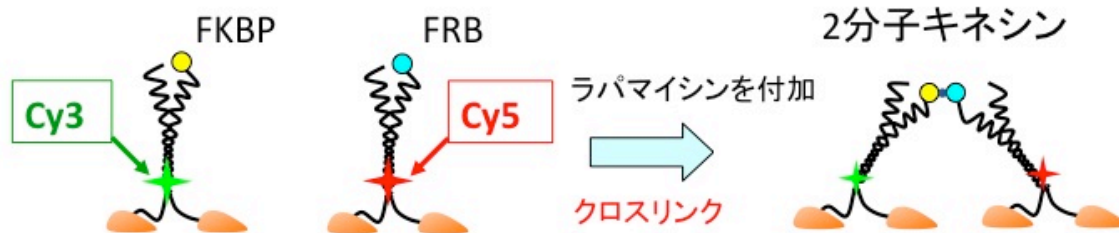
本研究は、細胞内輸送に関わる分子モータータンパク質を研究対象とし、輸送中の分子モーター間の負荷を介した協調性の仕組みを明らかにする。具体的には、輸送に関わる分子モータータンパク質が複数分子集まった集合体システムを作成し、それが微小管上を運動する様子を観察するとともに、集合体内部の個々の分子の構造状態を一分子レベルで計測することによって、輸送システム内での分子間の協調性を調べることを研究の目標とした。実際の研究成果としては、2分子のキネシンを連結した複合体を作製することに成功し、その運動を一分子のものと比較することによって、連結された2つの分子が協調し合うことによって長距離輸送を可能にすることを示した。また、片方のキネシンを微小管に固定し、もう一方のキネシン分子の構造状態を一分子 FRET 法で検出することによって、負荷がかかっている条件下でのキネシンの構造状態を観察することに成功した。それにより、外力がかかっている場合にはキネシンは片足結合状態を長く取るようになり、運動速度が低下することが示された。

2. 研究成果

2-1. 二分子を連結させたキネシン複合体の運動観察

免疫抑制剤であるラパマイシンによって誘導される FKBP と FRB の架橋反応を利用することによって、2つのキネシン分子を特異的にクロスリンクした「2分子キネシン」を作成した。それぞれの分子を区別するために、クロスリンク反応を行う前にあらかじめ異なる色素で蛍光標識を行った。全反射蛍光顕微鏡による1分子観察法を用いて、蛍光標識された2分子キネシンの運動を観察し、クロスリンクされていない1分子キネシンと比較したところ、運動速度はほぼ同じであったが、微小管に結合してから離れるまでの移動距離は1.5倍程度上昇した。これらの結果は、架橋された2分子は互いの運動を抑制することなく、何らかの仕組みで協調しあっていることを示唆するものである。

カイモグラフの例

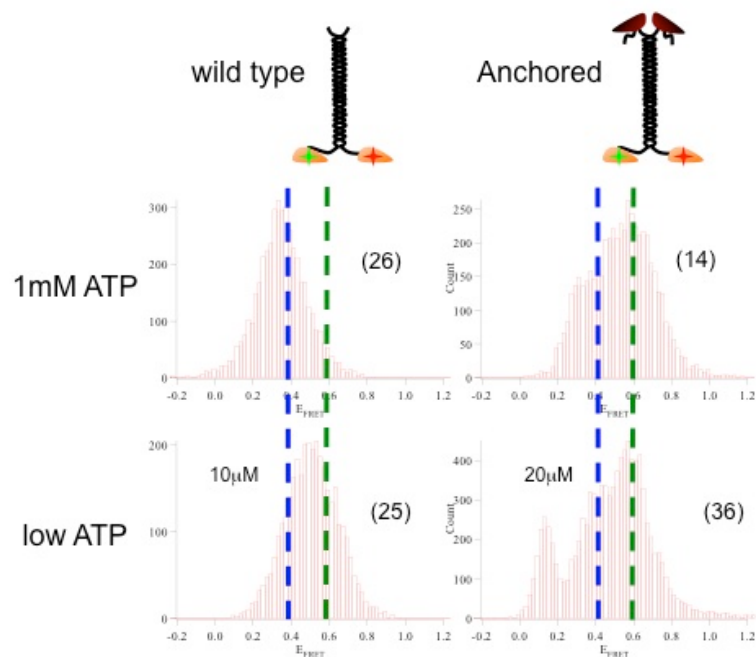


2-2. 単頭と双頭のキネシンによる協調的運動

連続的運動能を持たない単頭キネシンが双頭キネシンと協調した場合に、双頭キネシンの運動にどのような影響を与えるのかを調べるために、遺伝子組み換え技術を用いてキネシンの単頭を双頭キネシンに直接連結させた変異体キネシンを作製し、双頭キネシンに1つの単頭を連結した場合と2つの単頭を連結した場合とで運動の違いをしらべた。双頭キネシンに1つの単頭をつなげたキネシンは、双頭キネシンに比べて微小管上に停止する分子の割合が上昇し、また運動を示す分子の運動速度は低下した。それに対して、双頭に単頭を2つつなげたキネシンは、1つの場合よりも運動している分子の割合が低下したものの、運動している分子が連続的に移動した距離は双頭キネシンの2倍に上昇した。これらの結果は、双頭キネシンに単頭を1つだけつなげた場合は速度を低下させる負の効果しかないが、2つつなげた場合には微小管からの解離を抑えるプラスの効果が生まれて複合体として長距離輸送を行うことが可能になるということを示すものである

2-3. 負荷存在下でのキネシンの構造状態の一分子 FRET 観察

2分子キネシンの実験系を応用して、運動中のキネシンに負荷をかけ、そのときの内部構造状態を観察した。キネシン2量体の尾部に、微小管に結合した後解離することのできない変異体キネシン頭部を融合したキネシンを作成し、その運動を蛍光一分子イメージング法を用いて観察したところ、一部のキネシンは野生型と同じ速度で運動したものの、大部分のキネシンは見かけ上停止して微小管上に固定された。次にこのコンストラクトの野生型頭部をFRETプローブで標識し、一分子FRET法により負荷存在下でのキネシンの構造変化の検出を行った。飽和ATP濃度条件下で観察したところ、主に片足結合状態を取っていることが分かった。これらの結果は片足結合状態から両足結合状態への遷移が強い負荷依存性を持つことを示すものである。



<参考文献>

1. T. Mori, R. D. Vale, and M. Tomishige. How kinesin waits between steps. *Nature* 450, 750-754 (2007).
2. A. Yildiz, M. Tomishige, A. Gennerich, and R. D. Vale. Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134, 1030-1041 (2008).