

微小管を介した情報伝達の1分子イメージング

「形とはたらき」領域 武藤 悦子

1. 背景と目的

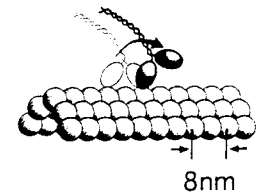
キネシンは細胞内輸送に関与するモーター蛋白質として知られ、神経細胞内で ATP の加水分解エネルギーを使って軸索の上を滑りながら細胞質顆粒を細胞体から軸索末端へと運んで行く。キネシンがどのようにして ATP の加水分解エネルギーを運動という機械的エネルギーに変換しているのか、そのメカニズムは謎である。筋肉のモーター分子であるアクチオン系や鞭毛・繊毛運動のダイニン・微小管系なども、キネシンと共通の原理で働くと考えられているが、多くの科学者の長年の努力にも関わらず、生物分子モーターの動作原理は未だ解明されていない。

キネシンの運動で特徴的なことは、1個のキネシン分子が微小管の上を μm というオーダーの長距離にわたって連続的に運動できること (Processivity) である。このような運動は、キネシンが双頭構造をしていることから、人が2足歩行をするように2つのキネシンヘッドが交互に微小管と相互作用することによって行われると考えられてきた (図1 a、Hand-over-hand model)。

この運動モデルでは、ATP の加水分解によって2量体であるキネシン分子の片方のヘッドに構造変化が起こり、もう1つのヘッドが次のチューブリン結合サイトへ移動するのを誘導する。このモデルは電子顕微鏡による構造解析、ATPase 反応の速度論的解析、運動アッセイの結果等とも合致するので、長いこと有力と考えられてきた。しかし最近になって天然に単頭キネシン (1量体) が発見され、構造的に二足歩行が絶対不可能であるにもかかわらず、その運動は双頭キネシンと同じように Processive であったため、モデルの再考が必要となった。

その結果新しく登場したのが岡田らによって提案されたラチェットモデル (図1 b) で、このモデルでは、キネシンはもともと静電的な力によって微小管上に緩く拘束され、その状態で μm という長距離にわたって1次元のブラウン運動を行うことができると考えられている。ATP 存在下では、この本来両方向性であるブラウン運動を1方向に制御する何らか

(a) Hand-over-hand model



(b) Thermal Ratchet Model



図1 キネシンの運動モデル

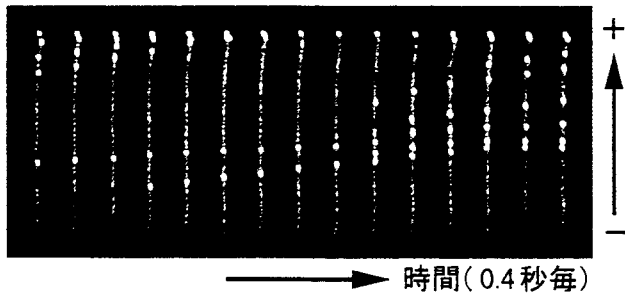


図2 キネシンの微小管への協同的結合

キネシンが微小管の+端へ向かって進むにつれ、その近傍で新たなキネシンの結合が協同的に起きる。写真は1秒ごとの連続写真で、新たに結合したキネシンは赤で示している。微小管の長さは16 μm 。

協同的に起きていることを発見した。上の連続写真に示すように、1つ目のキネシンが微小管上を+端へ向かって動いて行くと、2つめ、3つめと結合がその近傍で起き、次第にキネシンの集団が増えて行くのが観察される。このような結合の協同性は、微小管がキネシンに対して親和性の高い活性化状態と、親和性の低い不活性化状態の二状態を取り得ると考えると説明できる。もともとキネシンが結合していない状態では、微小管はキネシンに対する親和性の低い不活性化状態にあるが、最初のキネシンが微小管に結合するとその近傍で微小管に活性化状態が誘起されるため、近傍での結合レートが増加するのだろう。微小管やは単なる「レール」ではなく、能動的にモーター分子の運動に関わっている可能性がある。

この結果を前述のモデルと合わせて考えると、ラチェットモデルの「ブラウン運動を1方向に制御するしくみ」は微小管にその鍵があるのかもしれない。もしも活性化された微小管で、キネシンに対する親和性が進行方向前方に向かって増大していれば、この親和性の勾配がキネシンのブラウン運動を1方向に誘導することが可能である。その場合ATPの加水分解エネルギーは、微小管を活性化してキネシンに対するポテンシャルの勾配を発生させることに使われているのだろう。以上のような背景に立って本研究は、微小管の動態がキネシンの運動のメカニズムにどう関わっているのか、明らかにすることを目的としている。2章ではキネシンの協同的結合を解析した結果を、3章では蛍光プローブによる微小管の構造解析の結果を報告する。

の「しくみ」が働いて、キネシンは微小管の+方向に向かって進むことができる。このモデルでは、具体的にどのようなかは述べられていないが、ATPの加水分解エネルギーは「ブラウン運動を1方向に制御する」ことに使われる。

一方私は1996年に、光学顕微鏡のもとでキネシンが微小管1本の上を動く様子を観察し、その結合が

Thermal Ratchet Model 2



図3 第二のラチェットモデル
微小管に発生した、キネシンに対するポテンシャル勾配が、運動方向を誘導している。

2. 研究方法と成果(1)：キネシンの結合を測る

実験系とねらい

キネシンの結合を測る実験系は図4に示すような In vitro motility assay system である。キネシンをコートした蛍光性のラテックスビーズ（直径 $0.2\ \mu\text{m}$ ）を、ローダミンで蛍光標識した微小管と混ぜ、1本の微小管にキネシンビーズが結合する様子を蛍光顕微鏡で観察する。この実験系を用いて次の2つのことを調べた。1つは協同的結合が起こるのに ATP の存在が必要かどうか？もしもキネシンの運動が微小管の状態変化にカップルしているのであれば、ATP 非存在下では微小管に状態変化が起きていない可能性がある。もう1つは、協同的結合の方向性を調べた。もしも前章で述べたように、キネシンの1方向性の運動が微小管による誘導の結果だとしたら、協同的結合は進行方向の前方で増大していることが期待される。

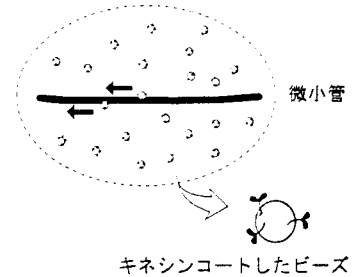


図4 実験系

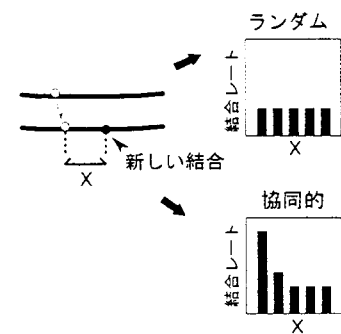


図5 結合の解析

既に微小管上に居るキネシン（黄色）からの距離（X）の関数として、新たなキネシンの結合レート（緑色）を計算する

結果1：協同的結合には ATP が必要である

上の実験系を用いて ATP のない時にキネシンビーズが微小管へ結合する様子を観察したところ、その結合は遅く、一見ランダムのように見える。結合がランダムであることを統計的に確認するには、既に微小管上に結合しているキネシンからの距離の関数として、新たなキネシンの結合が起こる

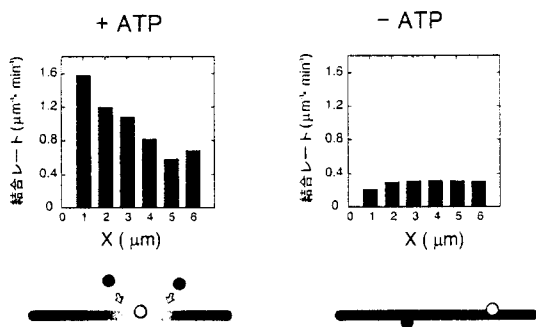


図6 実際の解析結果

ATP 存在下でのみ、結合は協同的に起きる。

るレートを求めればよい（図5）。実際にこのようにして結合レートを計算してみると、図6に示すように、ATP 存在下では微小管上を動いているキネシンの近傍数 μm という広い範囲で結合の増加が見られるのに対し、ATP がない時のキネシンの結合は、結合レートが低くランダムであることが確認された。

加水分解されない ATP アナログである

AMPPNP の場合も、結果はヌクレオチドを入れない場合と同じで、結合はランダムであった。これらの結果は、微小管の活性化には ATP の加水分解、つまりエネルギーの入力が必要であることを示唆している。

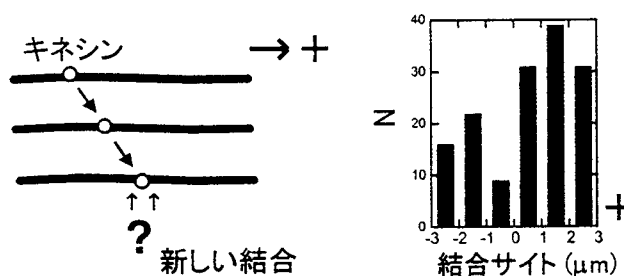
結果 2：協同的結合は運動の進行方向前方で起こりやすい

次に ATP 存在下における協同的結合の方向性を調べるため、(1)微小管上にキネシンビーズが 1 個だけ動いている場合、(2)化学架橋剤を用いて微小管上にキネシンビーズを 1 個だけ固定した場合、の 2 つの場合について、その最初に結合したキネシンビーズの近傍+/-どちらの側で新たな結合が起きているのか、結合の数を数えた (図 7)。ただし化学架橋剤を用いた実験では、架橋剤によってキネシンの運動能が失活していないことを確かめてある。結合の分布は、興味深いことに最初のキネシンが動いている場合と静止している場合とは異なり、静止している場合には進行方向前方に 1 つだけシャープなピークが現れるのに対し (図 7 b)、運動中のキネシンでは進行方向前方で結合は増大しているものの、後方にも小さな結合ピークのコブができていた (図 7 a)。

この結果については色々な解釈が可能であるが、その 1 つは微小管の状態変化に履歴があるとする考え方である。静止しているキネシンはその運動進行方向前方で微小管の活性化を誘起する。しかしその活性化状態はキネシンが前方へ移動した後もしばらくの間維持されるので、結果的に運動中のキネシンでは後方にも活性化状態が分布している。

この仮説を検証するため、次の章では履歴について調べてみた。

(a) 最初のキネシンが微小管上を動いている場合



(b) 最初のキネシンを微小管上に架橋剤で固定した場合

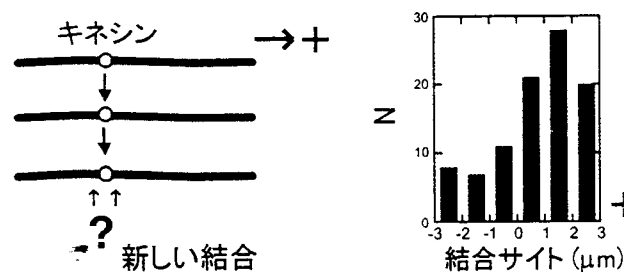


図 7 協同的結合の分布
最初のキネシンが動いている場合も、架橋剤で微小管上に固定されている場合も、協同的結合は+方向で増加している。

結果3：協同的結合には数秒の履歴がある

協同的結合の様子を観察していると、複数のキネシンが集団となって微小管上をその+端へと移動し、その全てが+端で溶液中へ解離して、たまたま微小管上にキネシンが1つもない時がある（図8左）。このような場合、もしも微小管の状態変化に履歴があるとすれば、最後の1つのキネシンが解離してからしばらくの間、新たにやってくるキネシンは+端の近傍に結合しやすいことが期待される。このような〈キネシンの集団運動→微小管からの全キネシンの解離→新たな結合〉という場面に着目し、新たな結合が微小管上のどこに起きるか調べてみると、最後のキネシンの解離後数秒以内には、その圧倒的多数が+端の近傍で起こっていた（図8右上のグラフ）。しかし最後のキネシンが解離してから10秒以上経過してしまうと、+端指向は消えうせて、結合は微小管上でほとんど一様に起きるようになる（図8右下のグラフ）。最後のキネシンが解離した後、拡散によって同じ微小管に再結合することも考えられるので、その確率を計算してみると、直径 $0.2\mu\text{m}$ のビーズでは1%に満たないことが判明した。従ってこの結果は、キネシンによる微小管の状態変化には数秒というオーダーの履歴があることを示している。

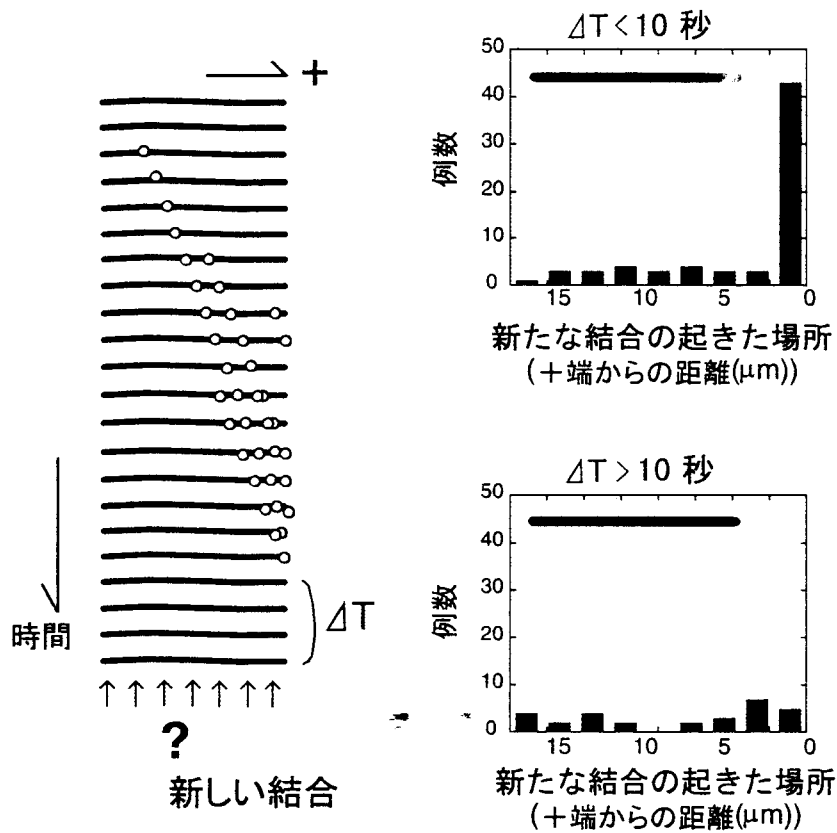


図8 履歴の解析
最後のキネシンが解離してから10秒以内に起きる結合は、圧倒的に+端の近傍で起こりやすい。

これらの結果をもたらす意味

ここまでの結果をまとめると、微小管の状態変化の特徴は図9のようになる。キネシンの協同的結合にATPが必要であったことは、微小管の状態変化が運動に本質的なものである

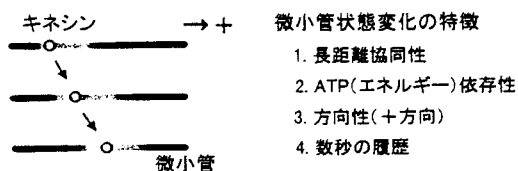


図9 まとめ

可能性を示唆している。さらに結合が運動の進行方向前方で増加していたことから、微小管とキネシンの相互作用におけるポテンシャル勾配が、キネシンのブラウン運動を1方向に誘導しているのかもしれない(図2参照)。

いずれの結果も、これまで単に受身のレールと考えられてきた微小管が、モーター分子のエネルギー変換に重要な役割を果たしている可能性を強く示唆している。

これらの特性はまた、微小管による情報伝達という観点からも非常に興味深い。一次感覚細胞(聴覚、視覚、嗅覚、触覚)、あるいは脳や神経細胞で、微小管は構造変化を伝播することによって細胞内情報伝達の機能を果たしているのではないか?という考え方がある。これまでこの考えを間接的に裏付ける細胞生物学的あるいは生理学的実験事実は数多く提出されてきたが、その実体であるはずの微小管の構造変化(コンフォメーション変化)の証拠は長いこと得られていなかった。本研究で明らかにされた長距離協同性や1方向性、さらに履歴と言った特徴は、微小管を情報の媒体として考えた時に期待される特性とよく一致する。状態変化にATPが必要であるということも、微小管にエネルギーや情報を伝える能力が備わっていることを示唆しているのかもしれない。

3. 研究方法と成果(2): 蛍光分光法による微小管の構造解析

微小管の動態をより詳細に解析するためには、キネシンの結合という間接的な手段ではなく、その構造変化を直接検出する必要がある。そこで我々は、微小管の構造変化を蛍光スペクトルからモニターできる実験系の開発を行った。

蛍光標識法の開発

我々の目的のためにはチューブリンの特定アミノ酸に共有結合で蛍光色素を導入する必要があるが、チューブリンではシステイン残基へ蛍光色素を導入すると重合が阻害されてしまうため、それは容易ではない。またこれまで一般に利用されてきたリジン残基への蛍光標識法では、複数箇所のリジン残基が同時に修飾されてしまうので構造解析の目的には使えない。そこで本研究では新たにトランスグルタミナーゼによる酵素反応を利用して、チューブリンのグルタミン残基に特異的に蛍光色素を導入する方法を開発した。

蛍光修飾サイトの同定

蛍光修飾したチューブリンを蛋白分解酵素サブチリシンで処理すると、蛍光色素は β -チューブリンに由来する4kDほどの断片と電気泳動的挙動を共にする(図10 a)。この断片は β -チューブリンのC末から約38残基のポリペプチド(図10 b)であることが知られており、ここに含まれるグルタミン残基433、434、436、443のどれか1つが修飾を受けているものと考えられる。興味深いことにC末最後の部分(図10 b 下線部)はキネシンの結合部位であることが知られている(図10 c)。キネシンとの相互作用部位の近傍に蛍光色素を導入すると、相互作用そのものを阻害してしまう危険性も考えられるが、この点については1分子運動アッセイを行って、蛍光標識がキネシンと微小管の相互作用は阻害していないことを確認した。

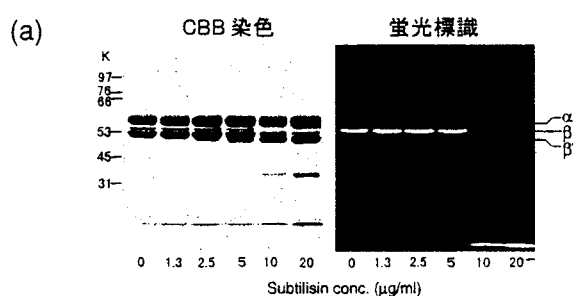


図10 蛍光標識サイトの同定

(a) サブチリシンによるペプチドマッピングの結果 (b) サブチリシンで切り取られた β 鎖C末のポリペプチドのアミノ酸配列 (c) チューブリンの3次元構造上の蛍光標識部位

キネシンの結合に伴う蛍光スペクトル変化

この方法でグルタミン残基に蛍光色素 Dansyl (図11 a) を導入し、ATP 非存在下でキネシンの結合によるスペクトル変化を調べたところ、図11 b のようにキネシンの rigor 結合に伴う蛍光強度の増加およびスペクトルのピークシフトが認められた。ATP 存在下でのキネ

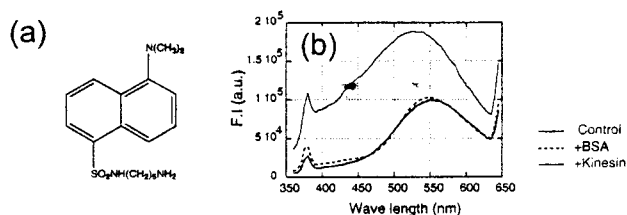


図11 蛍光色素 Dansyl の化学式と蛍光スペクトル

(a) Dansyl の化学式 (b) Dansyl で標識した微小管の、キネシンの結合に伴うスペクトル変化

シンによるスペクトル変化は残念ながらまだ検出されていないが、ひとまずキネシンの結合部位近傍を蛍光プローブでモニターできる実験系が確立できた。今後この標識サイトに他の蛍光色素を導入したり、あるいはクエンチングや蛍光エネルギー移動などの実験を試すことによって、ATP 存在下での状態変化も検出できるようになることを期待している。

4. 今後の展望

活性化された微小管では何が起きているのだろうか？ キネシンの協同的結合に関しては、まだ解析の手をつけることができずにいる現象が幾つかある。その1つは活性化された微小管とキネシンの間に働く不思議な引力の存在である。ATP 存在下のキネシンと微小管は拡散による衝突で結合するのではなく、どうも溶液中のキネシンが数10nm から100nm 近い距離を、活性化された微小管に引き寄せられて結合するらしい。現在実際に高感度の分子間力顕微鏡を使って、この長距離分子間引力を直接測定することを試みているのだが、もしもこのような引力が実在するとしたら、活性化した微小管ではいったい何が起きているのだろうか？ これは単にチューブリンの構造変化だけで説明できるものではなく、溶液中にまで影響力を持つ、ある種の「場」のようなものでないだろうか？

今後の展望としては第1に、この「場」の物理的実態を解明したい。長距離におよぶ協同的な変化では、蛋白分子そのものが大きな構造変化をしているのではなく、蛋白質表面の水（結合水）の構造が協同的に変化している可能性がある。微小管溶液の誘電スペクトルや近赤外ラマンスペクトルを測定し、微小管表面の水分子の運動状態について調べていきたい。第2にキネシンの力を借りずに、このような「場」を人為的に微小管に発生させてみたい。「場」がモーター分子の運動の原因であるとしたら、ATP のエネルギーを使わなくても他の手段で「場」を発生させてやれば、微小管上をブラウン運動できる物質なら何であれ、その運動を1方向に誘導できるようになるかもしれない。第3に生き物の中で、この「場」がどういう機能を果たしているのか観察してみたい。結果の後半で述べた蛍光分光の実験は、将来的に1分子蛍光顕微鏡と組み合わせて、溶液中の微小管の状態変化を可視化することを目指している。生きている細胞の中で微小管はどのようにその状態を変化させているのだろうか？ それは Atema らが予言したように細胞内情報伝達のケーブルとして機能しているだろうか？

5. 論文リスト

- 1) Miyamoto Y, Muto E, Mashimo T, Iwane AH, Yoshiya I, and Yanagida T. Direct inhibition of microtubule-based kinesin motility by local anesthetics. *Biophys.J.* 78 : 940-9 (2000)
- 2) Nishiyama M, Muto E, Inoue Y, Yanagida T, and Higuchi H. Sub-steps within the 8nm step per ATPase cycle of single kinesin molecules. Submitted.
- 3) Inoue Y, Iwane AH, Miyai T, Muto E, and Yanagida T. Movement of single one-headed kinesin molecules along microtubules. Submitted.
- 4) Muto E, Miyamoto Y, Funatsu T, Harada Y, Iwane AH, Ishijima A, and Yanagida T. Long-range cooperative binding of kinesin to a microtubule in the presence of ATP. Submitted.

口頭発表

Muto E, and Yanagida T.

Cooperative binding of kinesin molecules to a microtubule in the presence of ATP.

COE International Conference "Molecular mechanism of intracellular transports: The roles of kinesin and dynein superfamily proteins". (1998)

Muto E, and Yanagida T.

Cooperative binding of kinesin molecules to a microtubule in the presence of ATP.

Third congress of the Asian-pacific organization for cell biology (1998)

西山雅祥、樋口秀男、武藤悦子、井上祐一、柳田敏雄

キネシンの sub-8nm ステップの検出

日本生物物理学会第36回年会 (1998)

Muto E, and Yanagida T.

Evidence for the long-range cooperative transformation of microtubule.

Towards a Science of Consciousness: Tokyo '99 (1999)

Muto E, and Yanagida T.

Cooperative binding of kinesin molecules to a microtubule in the presence of

ATP.

The 7th JST International symposium: molecular processes and biosystems.
(1999)

西山雅祥、樋口秀男、武藤悦子、井上祐一、柳田敏雄

光補足を用いた分子モーターの1分子力学測定

第60回応用物理学会学術講演会 (1999)

斎藤祐子、石井由晴、武藤悦子

新しい微小管標識法の開発

日本生物物理学会第37回年会 (1999)

武藤悦子、斎藤祐子、岩根敦子、石井由晴

微小管のダイナミクスを蛍光プローブで探る

日本生物物理学会第37回年会 (1999)

Nishiyama, M, Higuchi H, Muto E, Inoue Y, and Yanagida T.

The rising phase of kinesin's 8nm step.

The 45th annual meeting of Biophysical Society USA. (2000)

武藤悦子

微小管はキネシンの運動方向を誘導しているか？

日本生物物理学会第38回年会 (2000)

西山雅祥、武藤悦子、井上祐一、柳田敏雄、樋口秀男

キネシンの高速4nmサブステップ

日本生物物理学会第38回年会 (2000)

曾和義幸、青木高明、喜多村和郎、武藤悦子、柳田敏雄

タンパク質間長距離相互作用の高感度力検出

日本生物物理学会第38回年会 (2000)