

2017 年度 博士論文

**DNA-蛋白質複合体による
キネシンモーター蛋白質の運動機構解明
(Walking mechanism of kinesin motor protein:
a DNA-kinesin hybrid nanomachine study)**

新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

上田卓也研究室

宮藺 侑也

【目 次】

第 1 章 序論

1-1) 研究の背景	4
1-1-1) キネシン動作メカニズムに関する過去の研究	4
1-1-2) 運動機構の 2 つのモデル: レバーアームモデルと拡散モデル	4
1-1-3) 頭部間協調の 2 つのモデル: 促進モデルと抑制モデル	6
1-1-4) 多分子協調に関する過去の研究	8
1-1-5) DNA ナノファブリケーションの発展	8
1-2) 本論文の概要	9

第 2 章 DNA 二重鎖-キネシンを用いた

キネシン分子内の協調メカニズムの解明

2-1) 概要	18
2-1-1) 目的	18
2-1-2) 本章の構成	19
2-2) DNA 二重鎖-キネシンの作製手法の確立	20
2-2-1) キネシン蛋白質の精製	20
2-2-2) DNA 二重鎖-キネシンの作製方法	20
2-2-3) 評価したコントラストと表記方法	22
2-2-4) 生化学的手法による DNA のハイブリの確認	23
2-3) 観察方法および運動性能解析方法	26
2-3-1) 全反射蛍光顕微鏡	26
2-3-2) 運動性能解析方法	29
2-3-3) FRET の観察と解析	32
2-4) DNA 二重鎖キネシンの一分子蛍光観察への導入	34
2-4-1) 観察条件の最適化	34
2-4-2) DNA 二重鎖-キネシン一分子観察の確認	37
2-4-3) DNA 二重鎖-キネシンにおける頭部間距離	41

2-4-4)	走行性能比較による距離見積り の妥当性検証	44
2-4-5)	連続歩行距離と運動確率の整合性検証	45
2-5)	結果①：ネックリンカーの2つの機能の個別評価	46
2-5-1)	2つの機能の有無によるコンストラクト分類	46
2-5-2)	docking あり x 頭部間張力あり 評価結果	47
2-5-3)	docking なし x 頭部間張力あり 評価結果	48
2-5-4)	docking あり x 頭部間張力なし 評価結果	49
2-5-5)	docking なし x 頭部間張力なし 評価結果	49
2-5-6)	結果まとめ	51
2-6)	結果②：頭部間張力の運動への寄与	53
2-6-1)	頭部間張力見積り	53
2-6-2)	張力による速度・歩行距離変化	58
2-6-3)	頭部が張力を感じるメカニズムの探索	60
2-7)	結果まとめ	62

第3章 DNA シート-キネシンを用いた

複合体内の分子間協調の探索

3-1)	概要	112
3-1-1)	目的	112
3-1-2)	本章の構成	112
3-2)	DNA シート-キネシンの作製手法の確立	113
3-2-1)	作製方法概要	113
3-2-2)	DNA シート-キネシン作製方法評価の手法	115
3-2-3)	DNA シートとキネシンの接続方法の検証	117
3-2-4)	作製方法まとめ	120
3-3)	DNA シートキネシンの一分子蛍光観察への導入	121
3-3-1)	観察条件	121
3-3-2)	DNA シート-キネシンの一分子観察の確認	121
3-4)	結合する蛋白分子の数・種類による運動性能変化	123
3-4-1)	結合するキネシンの数による運動性能の違い	123
3-4-2)	結合するキネシン種類による運動性能の違い	124
3-5)	結果まとめ	125

第 4 章 考察および結論

4-1) キネシン 1 分子の運動メカニズムについての考察	146
4-1-1) キネシンの運動に対するレバーアームの寄与	146
4-1-2) キネシンの運動に対する頭部間張力の寄与	151
4-1-3) キネシン分子の運動メカニズムまとめ	159
4-2) DNA シート-キネシンの検証結果の解釈	161
4-2-1) DNA ハイブリダイゼーション法の効率向上	161
4-2-2) DNA シート-キネシン運動に対する 分子間協調の寄与の考察	162

第 5 章 謝辞	169
----------	-----

参考文献

第 1 章 序論

1-1) 研究の背景

1-1-1) キネシン動作メカニズムに関する過去の研究

conventional kinesin(kinesin-1; 以下キネシン)は、ATP 加水分解のエネルギーを使って微小管の上を運動し、神経細胞等で小胞輸送を担っているモーター蛋白質である(図 1-1。Vale *et al.*, 1985, Vale 2003)。キネシンは、ATP 加水分解能を持つ 2 つの頭部と、頭部間をつなぐネックリンカーからなり、あたかも人が二足歩行するように 2 つの頭部を交互に微小管に結合・解離させながら、8 nm の歩幅(微小管上の結合サイトの間隔)で 100 歩以上の長距離(>1 μm)を高速(60 歩/秒=500 nm/s)に連続歩行する。

キネシンが長距離を高速に運動するためには、2 つの頭部が協調して働く必要がある(分子内協調)。具体的には、キネシンは歩行に際して微小管と 2 つの頭部が結合した両足状態と片方の頭部だけが結合した片足状態を繰り返しているが、効率よく前に動くためには、両足状態において後ろ頭部が先に外れる必要があり、また片足状態において浮いた頭部が後ろではなく前に結合する必要がある。

単頭の頭部ドメイン自体の性質については、生化学的実験による bulk レベルでの活性評価(Hackney 1994)、結晶構造解析による静的な構造の解析(Kull *et al.*, 1996)、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) を用いた動的な構造変化の解析(Rice *et al.*, 1999)等が調べられてきた。

二量体としての歩行運動の研究は、一分子蛍光観察(Vale *et al.*, 1996; Yilditz *et al.*, 2004)、光ピンセット法(Svoboda *et al.*, 1993; Svoboda and Block 1994; Schnitzer and Block 1997; Visscher *et al.*, 1999)によって分子としての挙動は知られている。ただし、分子内の協調メカニズムについては未知の部分もある。これは、ステップサイズが 8 nm と小さく、通常の光学顕微鏡を用いた観察では、詳細な運動解析が限られていたことや、後述するように、蛋白質変異体をベースとしたアプローチでは完全に解明するには限界があったためである。

1-1-2) 運動機構の 2 つのモデル: レバーアームモデルと拡散モデル

キネシンの 2 つの頭部は、頭部の C 末側から伸びたネックリンカー(323-336 の 14 残基)と呼ばれるペプチド鎖でつながれている。分子内協調を生み出すためには、2 つの頭部をつなぐネックリンカーが何かしら重要な役割を担っていると推測

される。

ネックリンカーがキネシンの運動に方向性を生み出すモデルとして、大きくレバーアームモデル(Rice *et al.*, 1999)と拡散モデル(Okada and Hirokawa 1999)の2つが提唱されてきた(図 1-2)。レバーアームモデルは、ATP 結合に伴うネックリンカーの構造変化により、頭部位置の前方へのシフトが生じるというものであり、頭部が前方へ移動するドライビングフォースはネックリンカーの前方への構造変化である。一方、拡散モデルは、頭部とレール上の結合サイトとの結合安定性が、前後の足で何かしら異方性をもつことにより方向性が生じるというものであり、前方へ移動するドライビングフォースは拡散である。

レバーアームモデルは、まるでレバーアームが前方に倒れるように、ネックリンカーが前方に向かって頭部に結合し、そのレバーアームの振れによって一定の歩幅が得られる、というモデルである。レバーアームモデルでは、この前方へのシフトが一方向運動のドライビングフォースであると考えられる。このモデルはいくつかの実験から支持されてきた。まず、ネックリンカーがヌクレオチド状態依存的に、頭部に結合(dock)・解離(undock)する事が示された(Rice *et al.*, 1999)。続いて、ネックリンカーを頭部に架橋すると、一方向運動が方向性のない運動に変化する事が報告された(Tomishige and Vale 2000)。また、ネックリンカーをランダムな配列にすると、ATP 加水分解速度は 1/3 程度にしか落ちないものの、微小管の滑り運動が 2 桁以上低下する事が報告された(Case *et al.*, 2000)。これらの研究から、ネックリンカーがレバーアームとして働くことが運動に重要であると考えられてきた。また、レバーアームモデルでは、2 つの頭部が運動に必須であると考えられる。実際、生化学的な解析(Hackney 1995; Jiang *et al.*, 1997)や、微小管のすべり運動解析(gliding assay: モーター蛋白質を地面に固定し、その上を運動する微小管を解析)からは、1 方向運動には、双頭構造が必要である事が報告されていた(Hancock and Howard 1998)。

一方、拡散モデルにおいては、蛍光一分子観察を用いて、単頭のキネシン(KIF1A)が 1 μm 以上の距離(100 歩以上に相当)に渡って方向性のある運動をする事が報告され(Okada and Hirokawa 1999)、注目を集めた。この際、ネックリンカーは結合異方性を生み出すコミュニケーションの媒体として働くと考えられる。拡散モデルでは、「後ろの頭部が微小管から先に外れる⇒外れた頭部が再結合するまで他方の頭部は微小管との結合を維持する⇒外れた頭部が後方ではなく前方の結合サイトに強く結合する⇒…」といったサイクルの繰り返しにより、一方向に運動していると考えられる。このサイクルは 2 つの頭部の結合を制御する、すなわち、2 つの頭部の結合に異方性を生じさせることにより維持されているが、その異方性を生み出す源がネックリンカーを介した頭部間のコミュニケーションであると考えられる。その際は、ネックリンカーを介して頭部間に働く張力がコミュニケーションを担う媒体

であると考えられ、実際、光ピンセットの実験結果から、モーター頭部にネックリンカーを介して張力をかける方向を変えることで、ヌクレオチドのアフィニティーが変化する事が報告されている(Uemura and Ishiwata 2003; Hirono-Hara *et al.*, 2005)。モーター蛋白質は結合しているヌクレオチドの状態では、レールに対する結合の強さが変わるため、この機構を使えば、レバーアームを用いなくても一方向の運動が可能であると考えられてきた。

これらのレバーアームモデルや拡散モデルを組み合わせたハイブリッドモデルも考えられる。キネシンと同じモーター蛋白質の1つである MyosinV の運動メカニズムに関しては、MyosinV の足に硬い微小管を結合させ、歩いている際中の足の動きを観察した実験(Shiroguchi and Kinosita 2007)や金コロイドで高時空間分解能で観察した結果(Dunn and Spudich 2007)から、単純にレバーアームのみや、拡散のみによって運動するのではなく、レバーアームと拡散の両方を上手く使って、歩いている事が示されている。キネシンも同様に、2つの機構を組み合わせている可能性があるが、2つの機構が両方ともに運動に不可欠なものなのか、もしくは片方の機構だけでも運動できるのかは結論が出ていなかった。

キネシンの2つの運動機構(レバーアームモデルと拡散モデル)を区別するためには、ネックリンカーを改変した変異体の挙動を調べる必要があるが、ネックリンカー配列の変更がキネシン頭部のATP加水分解能自体を低下させることが知られていたため、レバーアームが失われた影響とATP加水分解能が低下した影響を区別するのが困難であった。また、ネックリンカーをランダム配列に入れ替えたとしても、アミノ酸主鎖同士の弱い相互作用によって、dockingと同様の状態を取れる可能性は否定できない。実際に、ネックリンカーをランダム配列に入れ替えたキネシン変異体を筆者らが観察したところ、野生型キネシンと同様に8nmステップの運動が観察されたが、これだけでレバーアームが不可欠ではない、という結論を導き出すのは難しいと考えられた。

キネシンの運動機構を明らかにするためには、ネックリンカー配列を残したまま、レバーアームの影響や頭部間のコミュニケーションを変えるアプローチが必要だが、蛋白質変異体をベースとした手法では限界があった。

1-1-3) 頭部間協調の2つのモデル: 促進モデルと抑制モデル

上述の2つの運動機構は、いずれの場合も、長距離に渡った連続歩行のために頭部間が協調する必要がある。前述のように、その際は、頭部間にかかる張力が2つの頭部間のコミュニケーションを担っていると考えられてきた。これは、キネシンの2つの頭部は、足とコイルドコイルをつなぐ「ネックリンカー」と呼ばれる配列(14aa, 323-336番目のアミノ酸残基)によってつながっているが、ネックリンカ

一は 2 つの結合部位間をギリギリ届く程度の長さしかなく、両足結合状態においては、両足はお互いを引っ張り合っている状態にある(図 1-3)。そのため、両頭結合状態の時に働く張力が 2 つの頭部の状態を制御することにより(頭部間協調)、長距離歩行を実現していると考えられている。

具体的には、キネシンが微小管から離れず運動し続けるためには、常にどちらかの頭部が微小管との結合を維持し、また、解離の際は常に後頭が解離する、といった 2 つの頭部が協調する仕組みが必要である。これらの頭部の協調には頭部間のコミュニケーションが不可欠であり、checkpoint 機構によって、特定の結合や構造変化があるまで、歩行サイクルが一時停止(stall)されていると考えられている("gating"と呼ばれている)。gating のメカニズムとしては、様々な物が提案されているが、大きく分けて、以下の 2 つのモデルが考えられている(図 1-4、Block 2007; Hackney 2007)。

- ・ mechanical gate model:

前方頭部が dock することにより後方頭部に張力がかかり、ATP 加水分解およびそれに伴う微小管からの解離が促進される(Hancock and Howard 1999)

- ・ chemical gate model:

前方頭部にかかる張力が前頭への ATP 結合、およびそれに引き続き起こる解離を抑制する事で、結果的に後頭が先に解離する(Rosenfeld *et al.*, 2003; Klumpp *et al.*, 2004)

2 つのモデルを区別するために、ネックリンカーの長さを変えることで頭部間の張力(内部負荷)を変え、キネシン活性への影響が調べられている(図 1-5、Hackney *et al.*, 2003; Yildiz *et al.*, 2008)。ネックリンカー とコイルドコイルの間におのおの 1 - 12 個の余分なペプチド鎖を追加した実験の結果、kcat や速度(multi motor sliding velocity of axoneme)は変化しないものの、kinetic processivity(微小管に 1 回結合した際に加水分解される ATP 数)が非常に低下した(Hackney *et al.*, 2003)。野生型キネシンを用いた別の生化学実験でも、モノマー(張力が働かない)とダイマーで ATP 加水分解速度が変わらず、ダイマー化による促進効果はない、との報告があり(Rosenfeld *et al.*, 2003)、これらの生化学的な結果は chemical gate model を支持しているように見える。しかし、1 分子での研究は、それと相反する結果が報告されている(Yildiz *et al.*, 2008)。Yildiz らは 1 - 26 個の polyproline や seven repeats of glycine-serine residues(14GS)を挿入し、一分子観察した。その結果、processivity(連続歩行距離)には変化がないものの、速度が非常に低下する事を報告している。興味深い事に、この速度の低下は光ピンセットによる外部負荷で assist force をかけると、回復が観察された。assist force は後ろ頭部に力がかかると考えられるので、彼らの結果は、外部負荷が内部にかかる張力の低下を補償したと解釈する事ができ、mechanical gate model を支持している。

このように同じような蛋白質変異体を用いて相反する解釈が報告されていることから、結論を出すには新しいアプローチによる実験が求められていた。特に、ネックリンカーの長さを変えた変異体については、頭部間にかかる張力が変化するだけでなく、浮いた頭部が前方の結合サイトへアクセスする際の届きやすさ(衝突頻度)も変化してしまい、両方の原因で運動性能が変化してしまう。そのため、蛋白質変異体ベースの手法では、張力の影響のみ、あるいは、頭部間距離の影響のみを個別に評価することは困難であった。

1-1-4) 多分子協調に関する過去の研究

細胞内で、キネシンは、小胞輸送を担っている(Hirokawa 1990)。その際、キネシンは単分子で動作しているわけではなく、複数分子(~4 分子)のキネシンや、あるいは、逆方向(細胞の辺縁部から核に向かう方向)のモーター蛋白質であるダイニン(~5 分子)等と協調して運動を行っている(Shubeita *et al.*, 2008; Leidel *et al.*, 2012; Hendriks *et al.*, 2010)。多分子間の協調性を理解することは、小胞輸送を理解する上で重要である。従来、多分子のモーター蛋白質の性質は、微小管のすべり運動解析(gliding assay、Vale *et al.*, 1992)や、プラスチックビーズを用いた実験(Vale *et al.*, 1985)、あるいは、人工小胞(リポソーム)を用いて行われてきた(Tomishige and Vale 2002)。しかし、これらの手法では、分子の密度の制御は可能であるが、分子の空間配置に関しては、制御が難しい。そのため、運動の変化が分子数の変化に起因しているのか、あるいは、分子間の距離に起因しているのかは不明である。一方で、数理モデルからは、分子配置によって、小胞の輸送速度に違いが出る事が予測されており、小胞輸送の詳細を理解するためには、分子数の影響だけでなく、空間配置を理解する事が重要であり、分子数と分子配置の両方を評価できる新たな実験系が必要と考えられた。

1-1-5) DNA ナノファブリケーションの発展

DNA は生物の遺伝情報を担う物質であるが、配列情報を持つため、工学的にも有用な物質である。1982 年にアメリカの Ned Seeman は、Holliday junction にヒントを得て、DNA のナノ構造の作製を提唱した(Seeman 1982)。この方法では、複数の短い DNA 鎖を混ぜ合わせ、10 nm 程度のサイズの motif を作製する。motif 同士が連結する事でより大きな構造を形成できる。この方法は、少ない数の DNA 鎖で、高次構造を形成できるという利点がある。しかし、個々の DNA 鎖の量比を厳密に制御する必要があったり、構造の大きさを制御できないといった欠点があった。2006 年にアメリカの Paul Rothemund は、発想を逆にし、大きな 1 本鎖 DNA(Scaffold と

呼ばれる)を短い DNA 鎖(Staple と呼ばれる)で折りたたんでいく DNA origami という手法を提唱した(Rothemund 2006)。この方法では、DNA ナノ構造の大きさは、scaffold の塩基数(通常、用いられる M13 ファージ由来の M13 mp18 ssDNA では、7,249 塩基)によって規定されるが、staple の量比を厳密に制御する必要がなく、より簡便に DNA ナノ構造を構築することが可能となった。DNA ナノ構造では、scaffold と staple の結合が設計通りに起こるので、コンピューターで設計した構造を、溶液中で再現することが可能である。その際、staple が組み込まれる場所が 3 次元的に決まっているので、特定の場所に特定の分子を配置することが可能であり、この性質を用いて、分子の個数と空間配置を制御し、その影響を調べるということが可能であると期待される。

1-2) 本論文の概要

本論文では、分子間の空間配置に着目し、キネシンの運動機構を、分子内ならびに、分子間の協調性を軸に調べた。まず、分子内協調性を調べるために、短い 1 本鎖 DNA にキネシンの酵素部位(頭部)を共有結合し(DNA-キネシン)、2 本のキネシンを混ぜあわせる事で、2 量体を作製し、運動を解析した(図 1-6A)。短い 2 本鎖 DNA は堅い棒とみなすことが可能であるので、柔らかい紐であるペプチド鎖でキネシン頭部をつなげた場合とは違い、分子間の距離を設計することが可能であり、分子間距離の影響を評価する事が可能であった(図 1-7)。また、DNA とキネシン頭部をつなげるリンカー部分の堅さを変化させることで、張力の影響も評価することが可能となり、蛋白質変異体ベースの実験で問題であった、張力と距離の影響を区別して評価することが可能となった。この実験系を用いて、運動機構を評価したところ、前足の後頭部に分子間張力がかかることが、長距離運動には重要であり、また、張力は、前足の解離を抑制している事を明らかにした。また、キネシンは、レバーアームモデルと、拡散モデルのハイブリッドな機構で運動していることを明らかにした。

続いて、分子間の協調性を明らかにするために、シート状の DNA ナノ構造(60x90 nm、高さ 2 nm)に、キネシン分子を共有結合させ、分子数がどのように運動に寄与するのかを調べた(図 1-6B)。その結果、分子数が多くなるにつれ、連続歩行距離(Run length)は伸びたが、一方で速度に変化は観察されなかった。この結果は、DNA ナノ構造-キネシン複合体がレールである微小管から解離しにくくなったと解釈された。また、DNA ナノ構造の分子配置技術を用いると、特定の場所に特定の分子種を配置する事が可能である。そこで、ATP 加水分解変異体を、野生型と一緒に配置した。全部で 9 分子のキネシンのうちの、1 分子を ATP 加水分解変異体に置換した所、速度が 1/5 に低下した。また、3 分子を置換したところ、ほとんど運動が

観察されなかった。これらの結果は、ATP加水分解変異体が負荷として働き、周りの分子が、その負荷に打ち勝って運動することが難しいことを示している。本研究で数と配置を制御することが可能なことが示唆されたが、この実験系を発展させることで、より詳細に多分子による運動を解析することが可能となると考えられた。

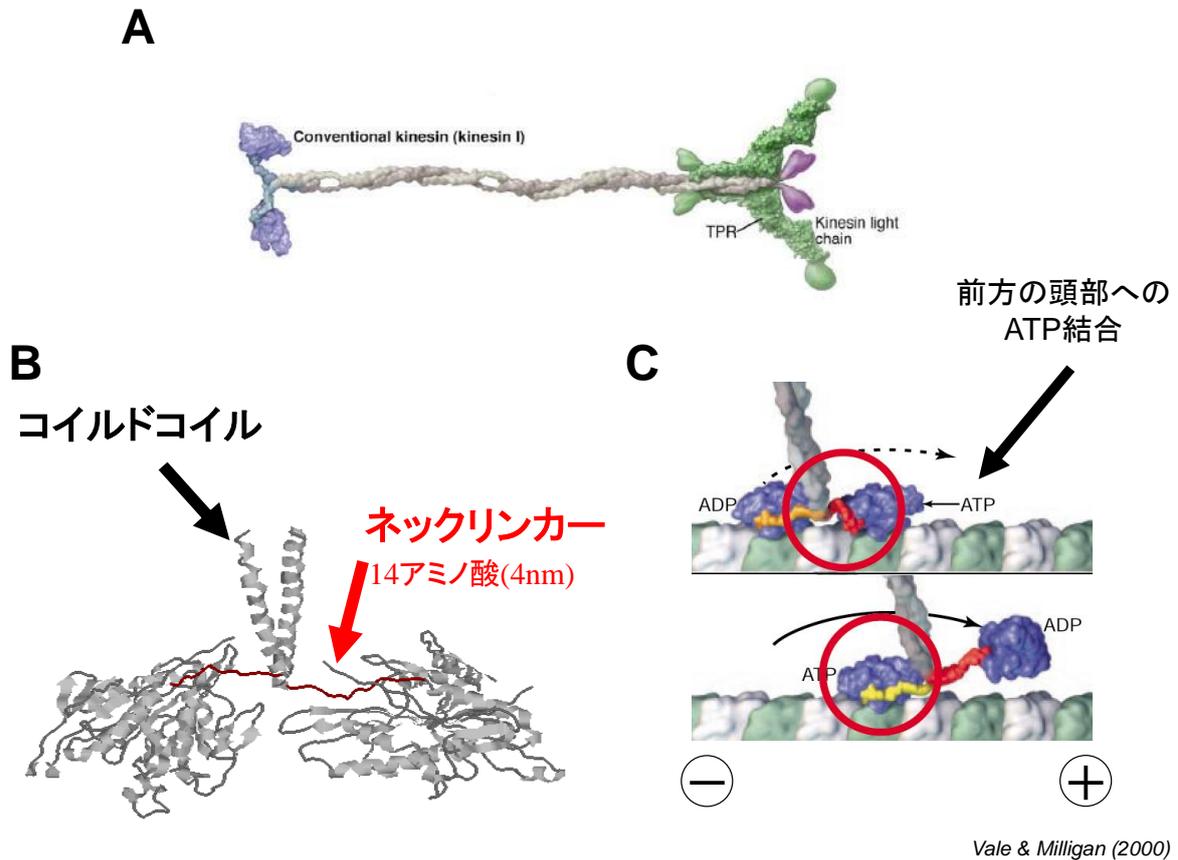


図 1-1 キネシンの概略図

A)野生型の全長のキネシン。実際には荷物と結合する尻尾の部分を切断し(切断箇所は 490 番目のアミノ酸残基)、頭部付近のみにしたキネシンを用いた。Vale 2003 より転載許可を得て転載。

B)キネシン頭部付近の構造。キネシンの構造(3KIN)を改変。2 つの頭部がネックリンカーとよばれるペプチド鎖でつながれた構造である。2 つのモノマーがコイルドコイル部でより合いダイマー化している。

C)ATP 加水分解により運動する。Vale and Milligan 2000 より 転載許可を得て掲載。

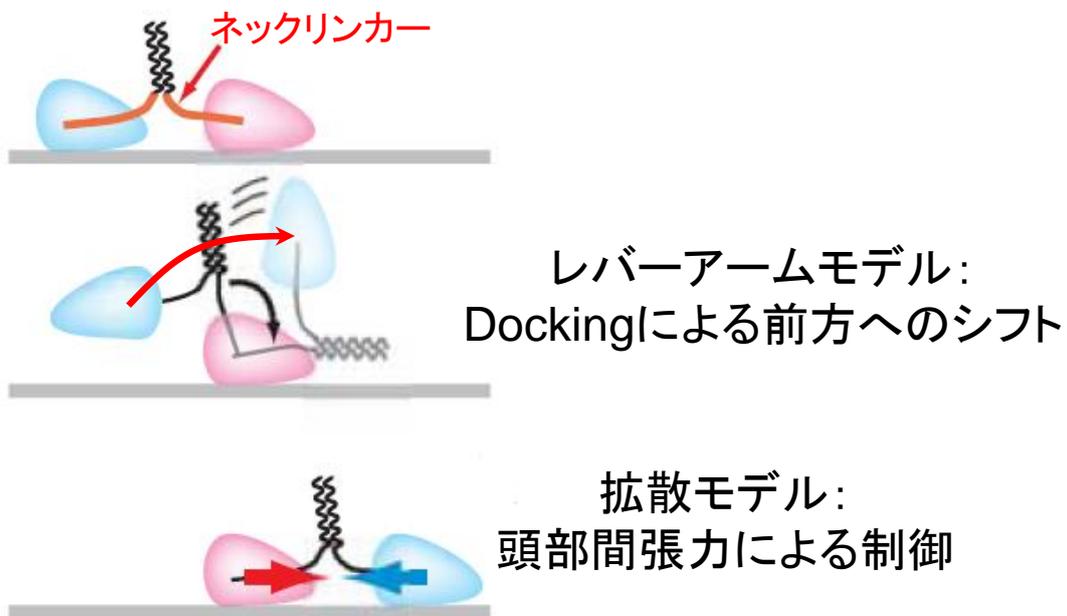
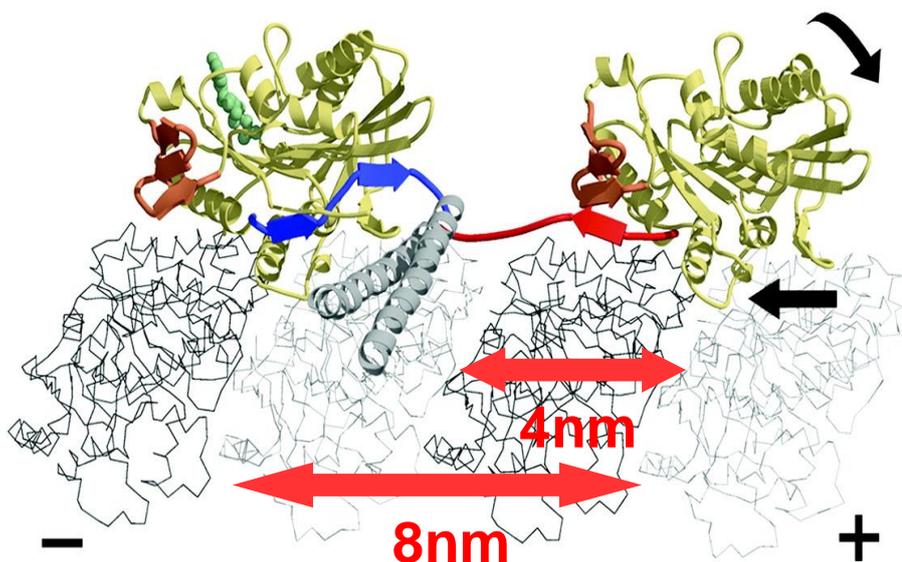


図 1-2 レバーアームモデルと拡散モデル

キネシンの運動に方向性を生み出すモデルとして、大きくレバーアームモデル(Rice *et al.*, 1999)と拡散モデル(Okada and Hirokawa 1999)の2つが提唱されてきた。レバーアームモデルは、ATP結合に伴うネックリンカーの構造変化により、頭部位置の前方へのシフトが生じるというものであり、頭部が前方へ移動するドライビングフォースはネックリンカーの前方への構造変化である。一方、拡散モデルは、頭部とレール上の結合サイトとの結合安定性が、前後の足で何かしら異方性をもつことにより方向性が生じるというものであり、前方へ移動するドライビングフォースは拡散である。



ネックリンカーの長さ(4nm) x 2
≐
両足結合時の両足の距離
(8nm)

図 1-3 両足間の距離とネックリンカーの長さはほぼ等しい

ネックリンカーは2つの結合部位間をギリギリ届く程度の長さしかなく、両足結合状態においては、両足はお互いを引っ張り合っている状態にある。このため、両頭結合状態の時に働く張力が2つの頭部の状態を制御することにより(頭部間協調)、長距離歩行を実現していると考えられている。Sablin and Fletterick 2004 より 転載許可を得て掲載

促進モデル(Mechanical gate model)



抑制モデル(Chemical gate model)



図 1-4 促進モデルと抑制モデル

キネシンの 2 つの頭部が協調する仕組みとして、大きく分けて、2 つのモデルが考えられてきた。1 つは、促進モデル(mechanical gate model)で、前方頭部のネックリンカーが dock することにより後方頭部に張力がかかり、ATP 加水分解およびそれに伴う微小管からの解離が促進されるというものである(Hancock and Howard 1999)。他方は、抑制モデル(chemical gate model)で、前方頭部にかかる張力が前頭への ATP 結合、およびそれに引き続き起こる解離を抑制することで、結果的に後頭が先に解離するというものである(Rosenfeld *et al.*, 2003; Klumpp *et al.*, 2004)。

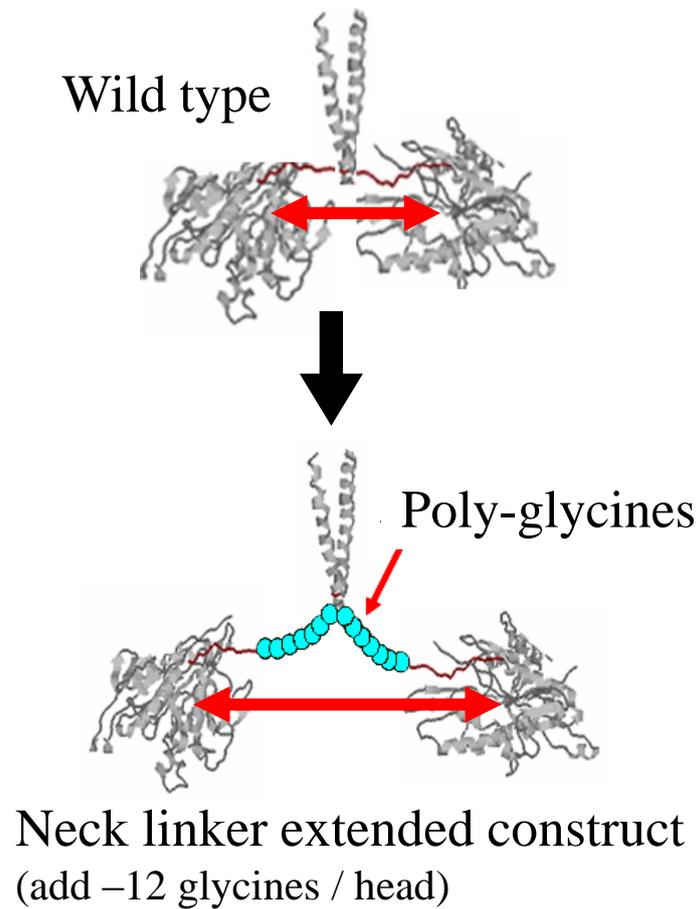


図 1-5 ネックリンカー伸長変異体

頭部間張力が寄与すると考えられている 2 つの歩行モデルを区別するために、ネックリンカーの長さを変えることで頭部間の張力(内部負荷)を変え、キネシン活性への影響が調べられてきた。図は、2 つの頭部のネックリンカーとコイルドコイルの間におおの 12 個の余分なペプチド鎖を追加した場合。キネシンの構造(3KIN)を改変。

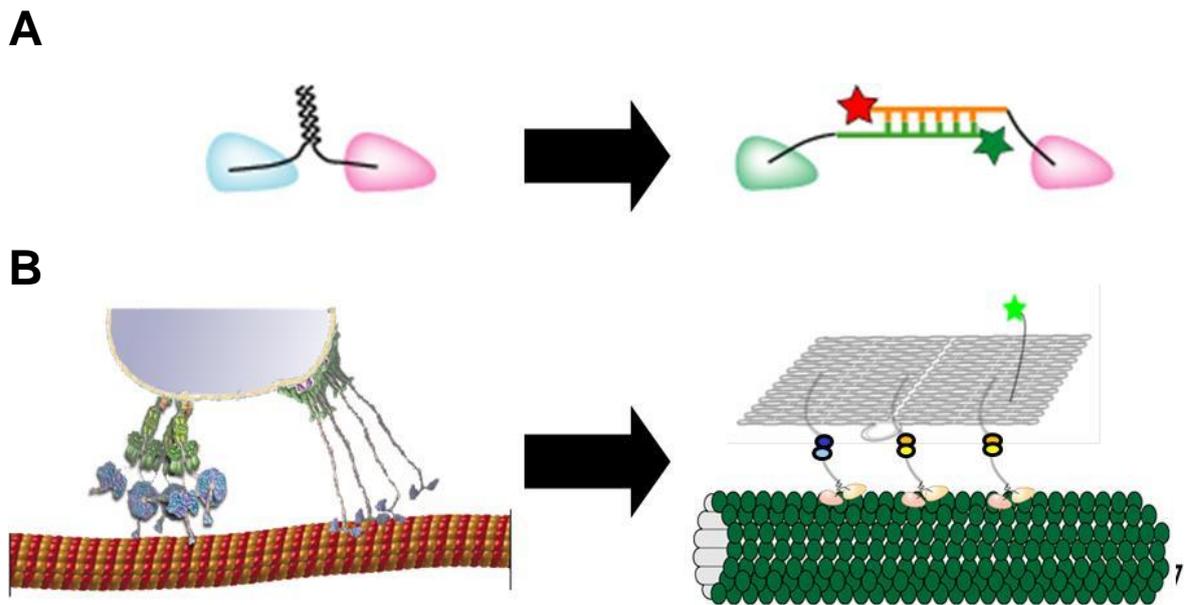


図 1-6 DNA 二重鎖-キネシンと DNA シート-キネシン

(A) キネシンの分子内協調を調べるために、短い 1 本鎖 DNA にキネシンの酵素部位(頭部)を共有結合し(DNA-キネシン)、2 本のキネシンを混ぜあわせることで、2 量体を作製し、運動を解析した。堅い棒である DNA を用いることで、頭部間距離の影響を評価した。また、DNA とキネシンの間のリンカーを調整することで、頭部間の張力を調整し、距離と張力の影響を個別に評価することに成功した。(B) 分子間協調を調べるために、DNA ナノ構造の分子配置技術を用いて、分子の数と配置を制御した。下図左は、Vale 2003 を改変。転載許可を得て掲載。

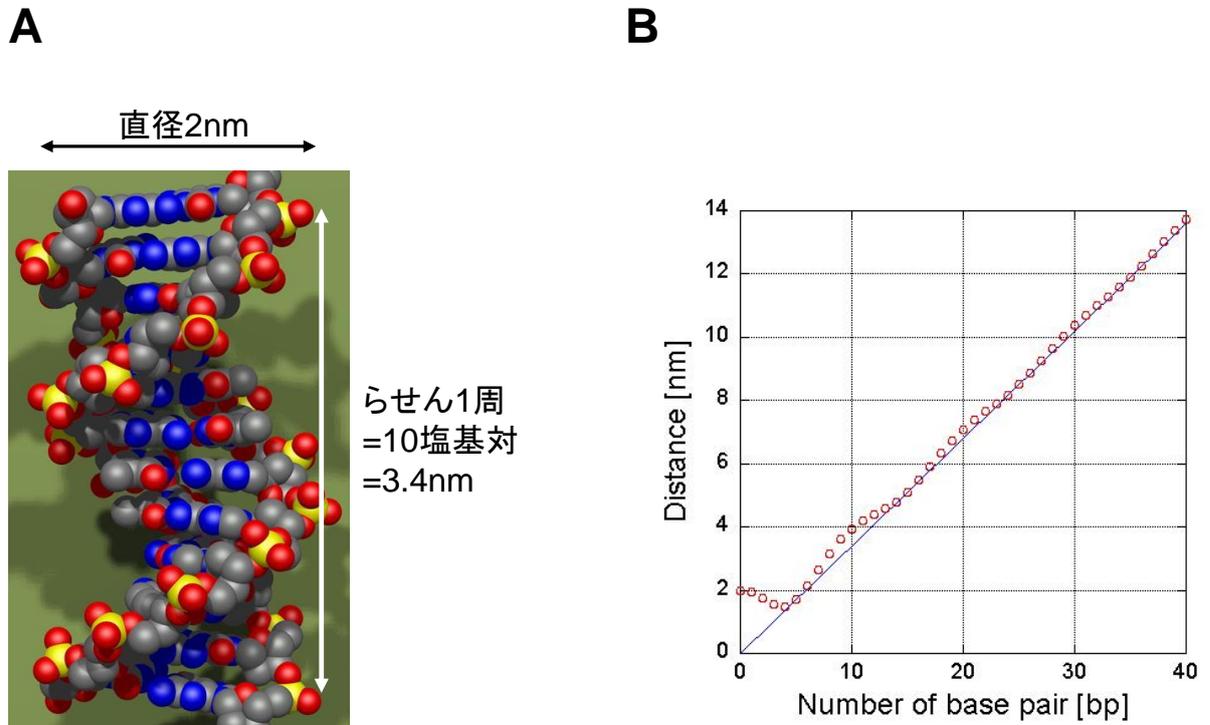


図 1-7 DNA の構造

(A) DNA 二重鎖のらせん構造。Wikipedia より転載(<https://en.wikipedia.org/wiki/DNA>)
 (B) 赤:センス鎖とアンチセンス鎖の 3'末端同士、5'末端同士の螺旋構造における距離。
 青:DNA の長さ。DNA の長さは塩基数 $\times 0.34$ nm で計算した。末端間の距離は、
 dsDNA が直径 2 nm の円柱で、1 bp 増えるごとに片方の端が 36° 回転すると仮定して
 計算した。(計算式は Clegg *et al.*, 1993 より)

第 2 章 DNA 二重鎖-キネシンを用いた

キネシン分子内の協調メカニズムの解明

2-1) 概要

2-1-1) 目的

2-1-1-1) 目的① ネックリンカーの 2 つの機能の切り分け

ネックリンカーの 2 つの機能である、ネックリンカーの構造変化による位置シフト(レバーアームモデル)と、ネックリンカーを介したコミュニケーション(拡散モデル)について、片方のみで運動できるのか、あるいは両方を上手く使っているのかを明らかにすることを目的とした。

そこで、DNA-蛋白質複合体の「蛋白質の接続場所が制御できる」という特徴を生かし、メカニズムの切り分けを試みた。DNA を介して 2 つの頭部をつなげる方法により、ネックリンカーの配列は残したまま任意の場所間を連結できる。Cys 残基の導入さえできれば、ネックリンカーの根元や、頭部の特定の場所同士を接続することが可能である。ネックリンカーの途中で接続することにより、酵素活性を阻害することなくレバーアームによる位置シフトを減らすことができる。また、ネックリンカー以外で接続することによりネックリンカーの影響を大きく減らすことが可能であると考えた。

2-1-1-2) 目的② 頭部間張力の運動への寄与の検証

頭部間コミュニケーションを担う頭部間張力が、キネシンの歩行を制御するメカニズムのより詳細な解明を目指した。具体的には、後ろ頭部が前に引っ張られることで、後ろ頭部の解離を促進するという「促進モデル」と、前頭部が後ろに引っ張られることで解離が抑制され、結果的に後ろ頭部が先に解離するという「抑制モデル」のいずれのモデルが歩行の中で用いられているのかを検証した。

それぞれのモデルが成り立っていると仮定した場合、頭部間張力を弱めた時に生じる影響を考えると、促進モデルでは解離の促進が失われるため、運動速度に影響すると考えられる。一方、抑制モデルは、前方頭部の解離を抑制することで、結果的に 2 つの頭部が同時に微小管から解離するのを抑制していることから、歩行速度よりも連続歩行距離への影響が大きいと考えられる。そのため、頭部間張力を

弱めた時に運動速度・連続歩行距離のどちらに対する影響が大きいかを見ることにより、2つのモデルの検証ができると考えられる。

従来の蛋白質の変異体ベースのアプローチでは、運動性能に重要な影響を与える、「頭部間張力」と「浮いた頭部が前方の結合サイトへアクセスする際の届きやすさ」の2つを個別に制御することは難しかったが、DNA 二重鎖-キネシンの特性を利用することで、頭部間張力のみ影響の検証を目指した。

もう1つの残された課題は協調がどのような構造に由来するのかである。最近、Yildizらはmechanical element(neck linker)やfuel(ATP)がなくても、外力によってキネシンがstepできる事を示し、キネシンの頭部(motor domain)そのものが、張力を感じ、応答する、という仮説を提唱している。張力を感知している場所がわかれば、作用機構の糸口となる可能性があるが、従来はネックリンカーを変異させた変異体を用いて解析していたので、頭部に対する張力は、常にネックリンカーを介してかかっていた。そのため、キネシン頭部全体で張力を感じているのか、あるいは、特定の部分のみで感じているのかは明らかでなかった。そこで、さまざまな場所で接続できるというDNA 二重鎖-キネシンの特性を生かし、キネシン頭部のどの部位が張力を検知するのかの推測を試みた。

2-1-2) 本章の構成

本章では、まずDNA 二重鎖-キネシンの作製手法について(2-2節)、続いて運動観察方法概要および、得られた画像から運動性能を解析する方法を述べる(2-3節)。DNA 二重鎖-キネシンは新たなアプローチであったことから、メカニズムを検証する前に蛍光一分子観察が可能であることを確認した(2-4節)。続けて、ネックリンカーの機能の2つのモデルである、レバーアームモデルと拡散モデルのキネシン運動に対する寄与を検証した(2-5節)。最後に、拡散モデルにおける頭部間コミュニケーションの担い手である頭部間張力が機能するメカニズムについて、過去に提唱されている促進モデル、抑制モデルの2つのモデルのうち、どちらが支配的なのかを検証した(2-6節)。

2-2) DNA 二重鎖-キネシンの作製手法の確立

本章では、観察試料としてキネシンおよびその変異体にオリゴ DNA を標識させた後、ハイブリさせた DNA 二重鎖-キネシンを用いた。本セクションでは、まず DNA 二重鎖-キネシンの作製方法を説明した後、生化学的手法により、DNA 二重鎖-キネシンの DNA がハイブリしていることを Bulk レベルで確認した結果を示す。

2-2-1) キネシン蛋白質の精製

キネシンの特定の位置にオリゴ DNA を標識する手法として、CLM(Cystein Light Mutant)を用いている。これは、野生型の蛋白質の表面に露出したシステイン残基を別のアミノ酸に置換し(C7S, C65A, C168A, C174S, C294A, C330S, C421A の 7 残基)、標識したい位置のみにシステインを導入する、という手法である。また、キネシンには、精製時に溶液から不要な物質を取り除きキネシンのみを分離回収するために、特定のカラムに吸着するタグ、本章では His タグと呼ばれるものをつけている。

こうした所望の蛋白質を得るためにはアミノ酸の配列を変える必要があり、アミノ酸の配列を変えるためには DNA を組み換えることが必要となる。組換え DNA から、目的の蛋白質をコードしている領域の DNA(インサート DNA)を切り出し、蛋白質発現を目的としたプラスミド(自己複製能を持つ DNA)に組み込む。こうすることによって、目的の蛋白質を発現させることが可能なプラスミドを得ることができる。遺伝子操作によって得られたプラスミドを DNA 受け入れ能の高い大腸菌(大腸菌コンピテントセル)の中に導入し、プレート上で培養することによって、単一のプラスミドをもつ大腸菌由来のコロニーが形成できる。

プレート上で少量培養された大腸菌を液体培地で大量に培養した後、目的の蛋白質を発現させる。そして、超音波によって大腸菌を細胞破碎して、目的のモーター蛋白質を含む溶液を得る。このようにして得られた溶液には、目的以外の物質が多く含まれているため、精製を行う必要がある。まず、溶液を遠心分離することによって重い不要な凝集蛋白などを取り除く。その後、カラムを用いて His タグのついた目的のモーター蛋白質を得る。

表記方法として、例えば K349CLM の 342 残基にシステインを導入したコンストラクトは K349CLM 342C と表記する。

2-2-2) DNA 二重鎖-キネシンの作製方法

DNA 二重鎖-キネシンは、キネシンの単量体にオリゴ DNA を標識し、DNA

のハイブリを利用することにより、多量体化したものである(図 2-1)。

DNA 二重鎖-キネシンの評価、ラベルに使用した試薬の評価、およびキネシンに DNA が標識されているか確認した実験を行ない、目的のコンストラクトが得られていることを確認した。

2-2-2-1) DNA 二重鎖-キネシンの作製

末端標識オリゴはシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社に注文した。このオリゴ DNA は、一方の端に色素(Cy3 or Cy5 or Rhodamine)、他方の端にアミノ基を導入してある。マレイミド化オリゴ DNA はアミノ基をマレイミド化して得た。

マレイミド化反応に用いた試薬は、マレイミド基と N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを分子の両端に持つものである。アミノ基に対しては活性エステルが反応し、SH 基とはマレイミド基が選択的に反応する。本実験では二つの反応基間のスペーサー構造が違う EMCS(同仁化学社、cat#344-05051)、AMAS(Pierce 社、cat#22295)、KMUS(同仁化学社、cat#345-06201) の 3 種類の試薬を用いた(図 2-2)。これらの試薬は水に溶けにくいことから、有機溶媒である DMF (N,N-Dimethylformamide、和光社 cat#048-24501)に溶かして用いた。反応は、まず 30 分間室温反応させた後、NAP-5 column(GE Healthcare 社、code#17-0853-02)でゲルろ過精製を行ない、buffer 中の塩と未反応の架橋剤を取り除いた。

得られたマレイミド化オリゴ DNA を、以下の手順によりキネシンに標識した。まず、キネシンのモノマー(5 μ M)をマレイミド化オリゴ DNA とモル濃度比 1:1 で混合し、氷上で 3 時間程度反応させ、キネシンのシステイン部位に DNA を標識した。反応溶液は FRET buffer(PIPES 25 mM, EGTA 1 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM)を用いた。続いて、未反応の遊離オリゴ DNA をスピンカラム精製で取り除いた。遊離オリゴ DNA は、キネシン頭部と上手く結合したオリゴ鎖同士の結合を競争阻害する上、蛍光色素がついているので、背景光を上昇させる。スピンカラムとしては、CHROMA SPIN+TE-30(BD 社、cat#636069)を用いた。CHROMA SPIN+TE-30 は、30 bp 以下のオリゴ DNA を効率的に取り除く事ができるカラムである。精製の結果、未反応のオリゴ DNA はカラム中に残るが、キネシンと結合した DNA は分子量が大きくなっているため、遊離溶液として回収できる。ただし、CROMA SPIN は蛋白を吸着しやすいので、初めに 1 mg/ml のカゼイン溶液もしくはジメチルカゼイン溶液(DNA 分解酵素を失活させるために滅菌したもの)を流し、カラムに吸着させてから、精製を行なった。この方法により、未反応の遊離オリゴ DNA を取り除くことができ、所望のオリゴ DNA キネシンを高い精製度で得ることができた(2-3-2-6 参照)。

2-2-2-2) DNA 二重鎖-キネシン作製手法の確認

以上の手順で所望のオリゴ DNA-キネシンが精製度高く精製できているか、下記の①②のとおり評価を行ない、問題ないことを確認した。

① オリゴ DNA キネシンの精製度評価

検討初期段階では、オリゴ DNA をゲルろ過した後、マレイミド化 DNA の精製度をさらに高めるため、HPLC⇒乾燥して濃縮・バッファ交換を行っていた。しかし、10 nt 以下のオリゴ DNA において、乾燥後の溶解時にうまく溶解せず沈殿してしまうという問題が生じた。この問題への対処および操作の簡便さを考慮して、前述のとおり、ゲルろ過後のマレイミド化オリゴ DNA をそのままキネシンに標識することとした。この方法によって、目的の DNA 標識キネシンを得られているか、また未反応の遊離オリゴ DNA を取り除いているかの確認を行なった。

10 nt の Cy3 ラベル DNA と K349CLM 342C を用いて、標識を行ない、CHROMA SPIN により精製した。DNA やキネシン頭部を CHROMA SPIN にかけてサンプルと、電気泳動の泳動度、および吸光度を比較したところ、DNA 標識キネシンを高い精製度で得られていることが確認できた(図 2-3)。

② CLM の確認

本研究では、2-1-1 で述べたように CLM(Cystein Light Mutant)とよばれる表面のシステインを取り除いたキネシン変異体を用いている。DNA を標識したい位置にシステインを導入した CLM を用いることにより、所望の位置に選択的に DNA を標識することが可能である。しかし、システイン以外にも、マレイミド基と反応性をもつ残基も存在し、それらの位置に DNA が標識されてしまう可能性がある。その可能性を評価するために、表面に露呈したシステインのないキネシン(K349CLM)のラベル率と表面にシステインを残したキネシン(K349CLM 342C)のラベル率を比較した。

①と同様、電気泳動と吸光度測定により評価を行なったところ、K349CLM のラベル率は K349CLM 342C の 10 分の 1 程度になった(図 2-4)。この結果から、本研究で用いたシステイン導入キネシンを DNA 標識した場合、ほとんどの DNA はシステインの位置に選択的に標識されていると考えられる。

2-2-3) 評価したコントラストと表記方法

キネシン蛋白質は、コイルドコイルと呼ばれる 2 つの α ヘリックスが疎水的相互作用により重なり合ったような構造をもっており、コイルドコイルによってキネシンはダイマー化し、二足歩行できるようになっている。DNA 二重鎖-キネシン

はコイルドコイルの代わりに DNA のハイブリを利用して、キネシンをダイマー化したコンストラクトである。

DNA 二重鎖-キネシンは、DNA をハイブリさせる方向によって大きく 2 つのタイプに分かれる(図 2-1 参照)。DNA を parallel にハイブリさせると、2 つの頭部が同じ端にくるが、これを野生型のキネシンと比較すると、キネシンの C の部分を二重鎖 DNA に置き換えた形になっている。そこで、このタイプのコンストラクトを「コイルドコイル置換型」と呼ぶことにした。それに対し、DNA を anti-parallel にハイブリさせると、2 つの頭部が別々の端にきて、二重鎖 DNA が両頭部の間のスペーサーとなる。このタイプのコンストラクトを「ネックリンカー伸長型」と名付けた。

コンストラクトの表記方法については、用いたキネシンコンストラクト(K349CLM、K336CLM…)・標識場所(=Cys 導入部位、342、333…)・DNA 配列(DNA の長さ、センス配列かアンチセンス配列か、付加されている蛍光色素)・標識に用いた架橋剤(EMCS、AMAS…)などが、表記から識別できる必要があるため、本論文ではその識別が可能な表記方法を用いた。

キネシン頭部にオリゴ DNA を標識させた、DNA をハイブリさせる前の DNA-キネシンモノマーについては、「K349CLM 342_20GS」のような表記法を用いた。K349CLM は用いたキネシンコンストラクト、342 は標識位置、20 は標識したオリゴ DNA の長さ、G は Cy3 が付加されていることを表し(R は Cy5)、S はセンス配列であることを表す(A はアンチセンス配列)。また、DNA をハイブリさせた後の DNA-キネシンダイマーについては「K336CLM 337_20bp」のように表記した。これは K336CLM の 337 の位置に DNA が標識され、20 bp の DNA でダイマー化したコンストラクトを表している。なお、標識に用いた架橋剤については、特に明示されていない場合については EMCS を用いており、他の架橋剤を用いた場合はその旨を言及する(主に 2-6)。

キネシンの頭部として K349CLM と K336CLM の両方を利用したが(図 2-5)、K349CLM にはコイルドコイル部分が少し残っていて(343-349)、(DNA のハイブリではなく)この配列の相互作用によりダイマー化している可能性が完全には排除できない。また、アミノ酸鎖の立体障害の違いや電荷による微小管とのアフィニティーの違いなどにより、同様の接続方法の DNA 二重鎖-キネシンでも運動性能が異なる可能性がある。そこで 2-4)の一部検討を除き、本章ではキネシン頭部に K336CLM を用いた。

2-2-4) 生化学的手法による DNA のハイブリの確認

DNA-キネシンは、DNA のハイブリによって二量体化するようにデザインされている。しかし、キネシンに標識した DNA は、蛋白質が近傍に存在することによ

る立体的障害や静電的相互作用により、通常のオリゴ DNA と比べてハイブリしにくくなっている可能性がある。そのため、二量体が観察されなかったり、DNA の結合定数から期待されるよりもハイブリする DNA-キネシンが少ない可能性がある。そこで、DNA 二重鎖-キネシンを一分子観察の系に導入する前に、キネシンに標識した DNA が期待通りハイブリするかを、生化学手法を用いて bulk レベルでの確認を行なった。具体的手法としては SDS-PAGE 電気泳動およびゲルろ過を用いた。

①SDS-PAGE による DNA のハイブリの確認

まず、SDS-PAGE 電気泳動により、ハイブリの確認を行なった。

試料は 20 nt のセンス鎖・アンチセンス鎖を結合させた DNA-キネシンを用いた。2-4)で後述する蛍光一分子観察でのサンプル調製法と同様に、100 μ M@ハイブリ溶液(BRB12 + 10 mM(f. 12 mM) MgCl₂)で 10 分反応させた後、Mg5 Buffer(BRB12 + 3 mM MgCl₂(f. 5 mM))で試料を希釈して、コントロールのモノマーの DNA-キネシンと共に電気泳動にかけた。その結果、反応させたサンプルでは、モノマーと異なる位置にダイマーと思われるバンドが現れた。このバンドが、DNA がハイブリしたものなのか、もしくはハイブリ以外の相互作用により結合したものなのかを確認するために、制限酵素を用いた検証実験を行なった。

制限酵素は、二重鎖 DNA の特定の配列を認識し、切断する酵素である。今回は KpnI と呼ばれる制限酵素を用いた。20 bp DNA には KpnI の認識配列が含まれているため、DNA がハイブリしていた場合、KpnI により切断され、ダイマーのバンドは現れないはずである。上の実験と同様、ハイブリ溶液で反応させた後、KpnI の反応溶液である L buffer で 4 μ M に希釈し、室温で 1.5 時間反応させた。比較のため、L buffer で希釈して KpnI を加えないサンプルも 1.5 時間置いた後に泳動にかけたが、そのサンプルには非特異吸着防止のために Triton X を 0.015%加えた(KpnI を加えた溶液にも KpnI 保存溶液由来の Triton X が同濃度含まれる)。反応させた後電気泳動にかけた結果を見ると、KpnI と反応させたレーンではダイマー由来のバンドが見られないことから、キネシンに標識したオリゴ DNA はハイブリ可能であることが確認できた(図 2-6A)。

②ゲルろ過による DNA のハイブリの確認

SDS-PAGE によって、センス鎖とアンチセンス鎖がついた分子が、ハイブリしている事はわかったが、期待している分子ができていないか不確定であったので、ゲルろ過を用いた確認も行った。SDS-PAGE では、以下の点で問題がある。まず、ハイブリダイズ効率塩濃度等の溶液条件に影響されるが、電気泳動時の溶液条件

は、実際の観察溶液との違いが大きい。また、DNAの存在により電気泳動度が変わるため、ハイブリしてできた複合体の分子量の評価ができないという欠点がある。

実験には、AKTA explorer(GE Healthcare)に分光器(日本分光、FP2050)を組み合わせた装置を用いた。まず、ハイブリ溶液で5分反応させた後、泳動溶媒(HKM buffer(25 mM HEPES(pH7.4), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl) + f. 0.1 mg/ml BSA(Sigma A2058) + f. 1 mM ATP)で24倍に希釈し、ゲルろ過カラム(Superdex 200 10/300 GL, GE healthcare 社, code#17-5175-01)にかけた。検出はCy5の蛍光を用いた(ex:635 nm, em:665 nm, gain: x1000)。試料はSDS-PAGEと同様に20 bpのDNAを結合させた物を用いた。コントロールとしては、ダイマーキネシン(K490CLM 416C)、モノマーキネシン(K336CLM 337C)をCy5標識した物を用いた。ゲルろ過の結果から(図 2-6B)、60%程度のアンチセンス鎖付キネシン頭部はセンス鎖付キネシン頭部と上手くハイブリしている事、また、アンチセンス鎖付キネシン同士ではほとんどハイブリをしていない事が示された。

③ 短いDNAでの確認

上の2つの実験は、比較的長めの20 bpのDNAを標識したDNA-キネシンを用いた。DNAは長さが短くなるほど結合が弱くなり、ハイブリが不安定になる。一分子観察では、最も短いもので6 bpのものまで使用しているが、6 bpのDNA-キネシンが安定的にハイブリするのかを調べた。

まず、SDS-PAGEで確認したところ、ハイブリのバンドは観察されなかった。一方、ゲルろ過でサンプル濃度を上げて測定したところ、二量体のピークが観察された(図 2-7)。ゲルろ過で観察されてSDS-PAGEで観察されなかった原因としては、1)低濃度で泳動するため、2)泳動中は泳動溶液の温度が上がり、解離が促進されたため、などが考えられる。

一分子観察を行なうような低濃度条件での衝突頻度と6 bpのDNAの解離速度を基に、単量体と二量体の平衡を考えると、一分子観察の条件では二量体はほとんど観察されない計算となる。しかし、後述するように6 bpの二量体と思われる蛍光像が観察されている。また、後述の 2-4-2)にて、軸系上に結合した分子のうちハイブリした分子の割合を6 bpのDNA二重鎖-キネシンにてカウントしたところ、7%と高くはないものの一定の割合が得られている。これは、キネシンと親和性の高い軸系が存在することにより、軸系周辺のDNA二重鎖-キネシンの実効濃度が高くなっているためではないか、と推測される。

2-3) 観察方法および運動性能解析方法

主に DNA 二重鎖-キネシンの運動速度や連続歩行距離を測定するために、全反射蛍光顕微鏡を用いて蛍光一分子観察を行なった。基本的にはハイブリさせた 2 つのコントラストを別々の蛍光色素で標識して、2 色が同時に光った分子のみをハイブリした分子として解析に用いたが、一部の測定で FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)を用いた。得られた動画から、DNA 二重鎖-キネシンの運動速度や連続歩行距離の解析を行なった。

本節では、各々の観察法について観察系、測定系および観察により得られた画像データの解析方法を説明する。

2-3-1) 全反射蛍光顕微鏡

測定系には全反射蛍光顕微鏡 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscope, TIRFM)を用いた。TIRFM とは、光を水とガラスの境界で全反射させたときに、表面の反対側に染み出すエバネッセント波を蛍光の照明として用いる顕微鏡である。照明に全反射光を用いるとガラス表面の蛍光色素のみを局所的に励起することができるので、微小管をガラス表面に吸着させることで、軸系上に結合したキネシンのみを選択的に観察することが可能となる。

2-3-1-1) エバネッセント波

ガラスの屈折率を n_1 、水の屈折率を n_2 とし ($n_1 > n_2$)、図 2-8A のように x-z 平面内を光が進むと考える。入射角を ϕ_1 、屈折角を ϕ_2 とするとスネルの法則により、

$$\sin \phi_1 = \frac{n_2}{n_1} \sin \phi_2 \quad (2-1)$$

である。入射角が臨界角より大きく、光が全反射している場合、 ϕ_2 は存在しないが、式 2-47 から数学的に、

$$\cos \phi_2 = \pm i \sqrt{\frac{\sin^2 \phi_1}{(n_2/n_1)^2} - 1} \quad (2-2)$$

と求められる。ガラス表面 ($z = 0$) での電場振幅を T_0 、角周波数を ω 、試料中の波数を $k_2 (= 2\pi n_2 / \lambda$: λ は波長) とすると、 $z > 0$ でのエバネッセント波の電場ベクトルの大きさ $E(x, z)$ は、

$$E(x, z) = T_0 \exp[i\{\omega t - k_2(x \sin \phi_2 + z \cos \phi_2)\}] \quad (2-3)$$

と表され、この式に式 2-1、式 2-2 を代入すると、

$$E(x, z) = T_0 \exp\left[i\left(\omega t - k_2 x \frac{n_1}{n_2} \sin \phi_1\right)\right] \times \exp\left(-k_2 z \sqrt{\frac{\sin^2 \phi_1}{(n_2/n_1)^2} - 1}\right) \quad (2-4)$$

となり(2-2 式のプラスの値は $z \rightarrow \infty$ で $E \rightarrow \infty$ となるため除く)、エバネッセント波の電場ベクトルの大きさは指数関数的に減少する。式 2-50 から、エバネッセント波の浸み出しの深さ d (光の強度が $1/e$ になる距離。光の強度は電場の平方に比例)は、

$$d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \phi_1 - n_2^2}} \quad (2-5)$$

で与えられる。この式に、ガラスの屈折率 n_1 (カバーガラス:1.52, 石英:1.45)、水の屈折率 $n_2 = 1.33$ 、本実験で用いた入射角 $\phi_1 = 69^\circ$ を代入すると、 $d = 0.32 \lambda$ と求められる。したがって、本研究で用いたレーザー(波長は 514 nm、635 nm) の浸み出しの深さは 180 nm 程度となり、エバネッセント波はガラス表面付近のみに浸み出していることがわかる。

2-3-1-2) 観察条件

本研究では、モーター蛋白質を走らせるレールとして、微小管の束であるべん毛軸系を用いた。軸系はウニの精子から精製した。ガラス上に吸着した軸系(axoneme)上を歩くキネシンを観察するため、観察用セルを作製した(図 2-8B)。

スライドガラスはガラスの自家蛍光を抑えるために、Matsunami 社の石英ガラス(26 mm × 56 mm、厚さ 1 mm)を、カバーガラスは Iwaki 社の code#2918(18 mm × 18 mm)を用いた。モーター蛋白質がガラスに吸着するのを防ぐために casein(Sigma 社、C-5890)を、活性酸素を除去するために酸素除去剤として glucose(Sigma 社、G-5767)、glucose-oxidase(Sigma 社、G-2133)、catalase(Sigma 社、C-40)を、還元剤として β -メルカプトエタノール (Sigma 社、M-6250)を加えた。

2-3-1-3) 光学系・測定装置

倒立型顕微鏡(OLYMPUS 社、IX70 ないし IX71)を使用して、プリズム型 TIRFM による観察装置を組み立てた(Funatsu *et al.*, 1995; Taguchi *et al.*, 2001; Tomishige *et al.*, 2006)。本研究で用いた装置と光学系の概略図を図 2-9 に示す。基本的には TIRF 顕微鏡に高感度・高時間分解能のカメラを組合わせたものである。

励起照明として、波長 514 nm のレーザー(Melles Griot 社、35LAP321、40 mW)

および波長 635 nm のレーザー(Coherent 社、Radius635、25 mW)を用いた。レーザーはまず $\lambda/4$ 波長板(Sigma Koki 社製)に通したあと、集光レンズ(Sigma Koki 社、PLB-15-100PM)、直角プリズム(Sigma Koki 機社、20 mm × 20 mm × 6 mm)を通過して試料面に入射する。プリズムにはレーザー光を約 32° で入射させ、試料面へ約 69° で入射させてガラスと試料の界面で全反射させる(臨界角は約 66°)。全反射した界面からは、前述したようにエバネッセント波が浸み出し、約 160 - 200 nm の領域が励起される。励起された試料から出た蛍光を 100 倍 (OLYMPUS 社、PlanApo 100x Oil / N.A. 1.40)、ないし 150 倍(UApoN150XOil / NA1.45) の対物レンズで集め、適当な光学フィルターを通した後、カメラで観察した。

カメラは、高感度カメラとして背面照射型 EMCCD カメラ(Electron Multiplying CCD, Andor DV860DCS-BV)を用いた。EMCCD は、受光部にて光子を電子に変換した後、A/D 変換する前に 10^3 倍程度の電子増倍を行なえる、という特徴がある。通常の CCD や CMOS では A/D コンバータでシグナルを読み出した後に信号を増幅するため、読み出し時に発生するノイズも増幅されてしまうが、EMCCD だと読み出し前の増幅により読み出しノイズを小さくすることができることから、蛍光一分子観察のように微弱光の観察に適したカメラである。一方、CCD の欠点、特に CMOS カメラに対する欠点の 1 つとして、各画素が物理的に大きくなってしまいうことが挙げられる。100 倍対物物を使っても通常であれば、ピクセルサイズに対して蛍光色素由来の輝点の大きさが同程度になってしまうが、本研究では、CCD テレビコンバーター(酒井ガラス MC-03)で 3 倍に拡大して各輝点が十分分解する条件で観察した。

本研究では、センス鎖・アンチセンス鎖がハイブリしてダイマー化した DNA 二重鎖-キネシンのみを観察するため、2 波長の光(Cy5 蛍光、Cy3 蛍光)を同時に観察しなければならない。本実験では、Dual View(Photometrics 社)という分光装置を EMCCD カメラの前に設置し、2 波長同時観察を行った。顕微鏡から来た蛍光は、まずダイクロイックミラー(Chroma 社、635DCXR)によって低波長成分は反射され、高波長成分は透過するので直進する。直進した高波長成分は、Cy5 フィルター(Chroma 社、HQ700/100m)を通り、反射された低波長成分は Cy3 フィルター(Chroma 社、HQ580/80m)を通る。このようにして、CCD カメラの右側には Cy5 蛍光が、左側に Cy3 蛍光が映し出され、異なる 2 種類の蛍光を 1 つのカメラで同時に観察することができる。

撮影したデジタル映像は、画像ボードを通じてパソコンに取り込まれ、Andor 社のソフトウェアによって 32 ビット階調の `sif` ファイルとして保存される。観察手順は以下の通りである。

1. セルのカバーガラスの上に、イメージジョンオイル(OLYMPUS 社製、

- $n_d=1.516$)を少量乗せる。
2. セルをカバーガラスが下になるようにステージに乗せて、テープでステージに固定する。
 3. レーザーをセルに照射し、エバネッセント波であることを確認する。
 4. 画像を見ながら照射領域とピントの調整を行い、適当な観察領域を視野中心にもってくる。
 5. Emission filter を使用するレーザーに合わせて変更し、レーザーを照射する。
 6. 部屋の照明を落とし、撮影、解析を行う。

2-3-2) 運動性能解析手法

実験によって得られた `sif` ファイルは、画像解析ソフト”ImageJ”により解析を行った。各々の解析方法について説明する。

2-3-2-1) 運動速度・連続歩行距離

キネシンの運動の速度および連続して歩行した距離を定量的に解析するために、カイモグラフを以下の手順で作成した。カメラで取得された画像から、微小管に沿った直線部分のみを抜き出し、それをフレームごとに積み重ねることにより、カイモグラフを作成した(図 2-10A)。カイモグラフの横軸は微小管に沿った距離、縦軸は時間を表しており、微小管上を動いているキネシンの軌跡は、斜めの線としてカイモグラフ上に現れ、斜線の傾きがキネシンの速度に、横軸方向の幅が連続歩行距離に相当する(図 2-10B)。

複数のコンストラクトの間で比較するために、1つのコンストラクトに対して多数の分子の速度と連続歩行距離を計測した後、ヒストグラムをとって分布の比較を行なった。さらに定量的な比較のため、平均速度と平均歩行距離を算出した。速度は単純に加算平均をとったが、歩行距離は指数分布と仮定してフィッティングにより平均を算出した。キネシンの歩行は一歩歩くごとに、ある決まった確率でレールから外れるというポアソン過程であると考えられるからである。また、単純にヒストグラムをとってフィッティングを行なうと、binningのサイズによって計算値が大きくかわってしまうことから(特にデータ数 N が少ない場合で顕著)、binningのサイズをできるだけ小さくし累積の分布を利用してフィッティングを行なった。

2-3-2-2) 運動確率

キネシンの歩行距離が短い(ピクセルサイズに近い)場合、2-3-2-1)の方法で運

動速度および歩行確率を定量すると、ピクセルの読み取り誤差の影響が大きくなってしまふ。また、運動する分子数も少ないことから、コンストラクト間の比較をするために運動速度と連続歩行距離の平均を出そうとすると、サンプル数を増やすために観察や解析の手間がかかってしまふ。そこで、運動速度と距離の代わりに、簡易的に運動性能の比較ができる指標として、「運動確率」というパラメータを導入した。

運動確率は微小管に結合した全分子数に対する運動する分子数の割合を定量したものである。ただし、一瞬微小管に結合する分子なども存在することから、全分子数を定量するのは不可能であるので、一定時間以上結合した分子についてカウントした。解析の条件を揃えるため、運動確率の定量には 30 fps で撮影した画像のみを使用し、5 frame(= 167 ms)以上微小管に結合した輝点数に対して、2 pixel(= 160 nm)以上運動した輝点数の割合で定義した。ただし、1 frame 間に 1 pixel 以上変位していた場合は、一度微小管から解離し飛んでしまったと解釈し、運動したものとみなさなかつた。連続歩行距離の分布が指数分布をとることから、一定距離以上歩いた分子の割合を示す運動確率は連続歩行距離と相関のあるパラメータであると考えられる。後述の 2-4-5)で運動確率と連続歩行距離の整合性を検証し、強い相関のあるパラメータであることを確認した。

2-3-2-3) 変位解析

変位解析では、DNA 二重鎖-キネシンが野生型キネシンと同じく微小管の+端方向に一方向運動するかどうか確認するため、DNA 二重鎖-キネシンが微小管に結合してから解離するまでの微小管上での変位を解析した。具体的には、30 fps で撮影した画像のカイモグラフを作成し、5 frame(= 167 ms)以上滞在した分子に関して、微小管と結合した点の座標と解離した点の座標を目視で読み取り、その差分から変位を計算した。全分子の変位のヒストグラムを作成して、変位分布に偏りを見ることでそのコンストラクトの運動の方向性を判別した。この解析では、frame 間で 1 pixel(= 80 nm)以上飛んでいる分子についてもカウントした。

変位は+端方向と一端方向の 2 方向があるが、微小管の+端方向に目印をつけているわけではないため、このままだと方向性を判定することはできない。そのため、Cy5 を標識した野生型キネシンを微量混ぜて、その動きを見ることで観察している微小管の方向性を判断した。DNA 二重鎖-キネシンと野生型キネシンの蛍光像を区別するため、以下の手順で観察を行なった。FRET 効率の高い DNA-キネシン(DNA 長が 15 bp 未満)に関しては、まず 635 nm 励起で野生型キネシンの動きを見て微小管の方向性を確認した後、514 nm 励起で DNA 二重鎖-キネシンの FRET 像を観察した。また FRET 効率の低い DNA 二重鎖-キネシン(DNA 長が 15 bp 以上)

に関しては、514 nm と 635 nm を同時励起して、Cy5 側だけ光る野生型キネシンで方向性を確認し、Cy3 と Cy5 が同時に光る DNA-キネシンのみを解析に用いた。

変位解析という解析方法が動きの方向性を見るのに有効かどうかを確かめるため、動かないコンストラクトや一方向に動くことがわかっているコンストラクトの解析を行なった。まず、この解析方法の測定誤差を見るため、動かないコンストラクトの解析を行なった。コンストラクトとして、モノマーである K336CLM 333_10GS を使用した。モノマーは次の結合サイトに結合するフリーの頭部を持たないことから、滞在時間が短く、微小管に結合した場所から離れるまでの変位も見られないと考えられる。このコンストラクトの変位分布で広がりが見られたとすると、動きのあるコンストラクトを解析した際に、変位の小さな動きや二方向の小さな分布の偏りは測定の誤差に埋もれてしまうことになってしまう。測定結果を見ると、95%以上の分子は変位なしという分布となり、この解析方法で小さい変位も検出できることが確認できた(図 2-11 上)。次に、一方向に動くことがわかっている K336CLM 328_7bp について同じく変位を測定したところ、+方向に偏った分布となり(図 2-11 下)、変位解析により運動の方向性を正しく検出できることが確認できた。

2-3-2-4) 平均二乗変位解析

平均二乗変位解析は、拡散定数の定量で一般的に用いられる解析法であるが、分子モーターの研究では、観察中の運動が方向性をもったものかランダムな運動かを判別する際によく使用される。平均二乗変位は、ある時間 Δt の間に注目する物体が移動した距離 x を二乗し、全区間・全物体で平均したもの $\langle x^2 \rangle$ である。 $\langle x^2 \rangle$ が Δt に比例する場合はランダムな運動、 Δt^2 に比例する場合は方向性をもった運動と判別することができる。変位解析では、運動開始地点と終了地点の変位のみに着目し運動途中の振る舞いについては加味していないのに対し、平均二乗解析では運動途中の振る舞いも解析していることから、連続的な一方向運動なのかをより厳密に判断することができる。

観察法としては変位解析の場合と同様に 30 fps で観察し、60 frame 以上(= 2 s 以上)微小管上を運動した分子に関して解析を行なった。まず、各 frame での分子の変位を、カイモグラフ上で輝度の重心を計算することにより求めた。続けて、複数分子の変位の時系列データから平均二乗変位を計算した。時間に対して平均二乗変位をプロットし、0 - 30 frame(= 0 - 1 s)のデータを利用して、平均二乗変位が時間の何乗に比例するかをフィッティングで求めた。測定系のノイズや揺らぎによる重心位置の推定誤差により、運動に由来しない変位が含まれるため、フィッティングの際にこれらの影響を除く必要がある。測定系由来のばらつきは時間によらず一定

であると考えられることから、下の式を用いて平均二乗変位のフィッティングを行った。

$$\langle x^2 \rangle = a * \Delta t^k + b \quad (2-6)$$

係数 k が 2 に近ければ一方向性の運動、1 に近ければ方向性のないランダムな運動であると考えられる。

この解析方法が有効かどうかを確かめるため、一方向に動くことがわかっているコンストラクトの解析を行なった。コンストラクトとしては、野生型キネシンである K490CLM 416 と DNA-キネシンである K336CLM 328_7bp(速度:289 nm/s、歩行距離:200 nm)を使用した。解析結果を見ると、K490CLM 416 では $k = 1.99$ とほぼ係数が 2 になったのに対し、K336CLM 328_7bp では $k=1.81$ と 2 より若干低い係数となった(図 2-12)。これは、測定系の誤差の影響が表れていると考えられる。運動速度が 500 - 600 nm/s と速い野生型キネシンでは推定誤差の影響が小さいが、速度が 200 - 300 nm/s と比較的遅い DNA 二重鎖-キネシンでは誤差の影響が無視できなくなっているのではないかと考えられる。DNA 二重鎖-キネシンの解析においては、 k が 1.8 より大きければ一方向の運動と見なした。

2-3-3) FRET の観察と解析

2-3-3-1) FRET の原理

FRET は、吸収発光波長域にお互いにオーバーラップをもった蛍光色素の間で起こる。すなわち、ドナーの発光波長域とアクセプターの吸収波長域が重なっていた時、ドナーの放出波長がアクセプターの励起に使われてしまう、つまりエネルギー移動がおきるのである。具体的には、ドナーを励起しても、アクセプターにエネルギーが移動し、アクセプターが発光するという現象が起こる。

また、エネルギー移動の大きさは色素間の距離によって変化し、距離が小さいほどエネルギー移動は大きくなる。エネルギー移動の大きさを示す指標であるエネルギー移動効率 E_{FRET} は、2 つの蛍光色素の距離を R とすると、

$$E_{FRET} = \frac{I_A}{I_A + I_D} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (2-7)$$

I_D : ドナーの蛍光強度、 I_A : アクセプターの蛍光強度

と表される。ただし、ここで R_0 は E_{FRET} が 50% となる距離(Förster 距離)を表し、以下の式から求められる。

$$R_0^6 = 8.785 \times 10^{-25} \kappa^2 \Phi_D n^{-4} J \quad (2-8)$$

$$J = \int \varepsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda \quad (2-9)$$

$\varepsilon_A(\lambda)$: 波長 λ におけるアクセプターのモル吸光係数

$F_D(\lambda)$: 波長 λ におけるドナーの蛍光強度

λ : 波長

κ^2 : 配向因子

Φ_D : ドナーの量子効率

n : 溶媒の屈折率

ここで、 J は、ドナーの発光スペクトルと、アクセプターの吸収スペクトルの重なりの大きさを表す量で、 $[M^{-1} \text{cm}^3]$ の単位を持つ。

本研究では、FRET 観察の際、ドナーとして Cy3 を、アクセプターとして Cy5 を用いた。ドナーとアクセプターともにランダム配向をとると仮定すると、 $\kappa^2 = 2/3$ とすることができ、 $R_0 = 5.0 \text{ [nm]}$ と求めることができる。これを(2-7)式に代入すると、FRET 効率は $R_0 (= 5 \text{ nm})$ 付近で大きく変動することから、Cy3 と Cy5 を組み合わせて FRET 効率を測定することによって、2 – 8 nm 程度の大きさの構造の計測に用いることができる。

本研究では、6 – 20 nt のオリゴ DNA がハイブリしているかどうかを確認するのに FRET を用いた。

2-3-3-2) FRET 効率の算出

本実験で得られた画像の 1 ピクセルは 80 nm に相当し、キネシンの蛍光像は直径約 8 ピクセル(約 500 nm) の輝点、カイモグラフ上では 8 ピクセル幅の線として検出される。まず、取得したカイモグラフの一部を 10(800 nm) x 10(333 ms、30 fps 時)の Region of Interest (ROI) で囲み、その内部の輝度の平均値 $I_{\text{raw}}[i]$ を測定した。輝点が存在しない部分でも 10 x 10 の ROI をとり、3 つの ROI の内部輝度を平均して、これをバックグラウンド I_{back} とした。キネシンの発する蛍光強度を $I[i] = I_{\text{raw}}[i] - I_{\text{back}}$ とした。Cy3・Cy5 両方の蛍光強度を測定するが、その際に必ず Cy3・Cy5 で同じ位置の ROI を使用した。FRET 効率 E_{FRET} は以下の式によって求めた。

$$E_{\text{FRET}} = \frac{I_A}{I_A + I_D} = \frac{I_{\text{Cy5}}}{I_{\text{Cy5}} + I_{\text{Cy3}}} \quad (2-10)$$

I_{Cy3} : Cy3 の蛍光強度、 I_{Cy5} : Cy5 の蛍光強度

2-4) DNA 二重鎖キネシンの一分子蛍光観察への導入

このセクションでは、2-2)で作製・評価した DNA 二重鎖-キネシンを 2-3)で説明した一分子蛍光観察の実験系に適用できるかどうかの確認、および DNA 二重鎖-キネシンの 1 分子レベルでの性質の確認を行なった。

DNA 二重鎖-キネシンを運動メカニズムの解明に用いる上で、懸念されるリスクとして大きく以下の 3 つがあった。

- ①DNA という物質の存在がキネシンの酵素活性・運動を阻害する
- ②キネシンに標識した DNA がハイブリゼせず、ダイマー化できない
- ③観察溶液中で DNA-キネシンが意図した構造をとらない

(3 分子以上が結合してしまう、二重鎖 DNA が堅い構造をとらない)

本セクションにおいては、一分子蛍光観察条件下にてこれらのリスクに対する評価を行ない、問題ないレベルであることを確認した。

また DNA 二重鎖-キネシンの運動性能評価を行ない、DNA 長と運動性能の相関から、作製時に意図したとおりの頭部間距離になっていることを確認した。

2-4-1) 観察条件の最適化

DNA 二重鎖-キネシンは、観察前に DNA 相補鎖を混ぜ合わせダイマー化させる。効率的に実験を行なうには、相補鎖のハイブリ効率をできるだけ高くする必要がある。DNA のハイブリは可逆的で一本鎖と二本鎖の平衡反応であるから、平衡をできるだけ二本鎖寄りに傾ければよい。最も簡単な方策は、できるだけ DNA 濃度を高くすることである。また DNA の相補鎖結合が安定化する条件においてハイブリさせるとよい。そのための方策としては、イオン濃度を高くする、温度を下げる等が考えられる。ただし、同じ配列の DNA 同士でも部分的にハイブリしたり、長いオリゴ DNA だと、自身の配列同士で部分的に結合し二次構造をとったりすることから、通常の DNA 操作においては一度温度を 90°C 程度まで上げて直鎖状にしたのち、温度を下げてハイブリさせるという操作を行なう。しかし、DNA 二重鎖-キネシンでは、キネシンは熱に弱いため温度を上げられないことから、この手法はとれない。本実験では室温(25°C)でハイブリさせた。

一方、蛍光一分子観察においては、1 分子を区別するために蛍光サンプル濃度を低くする(nM オーダー)必要がある。また、キネシンは、高イオン濃度下では微小管に結合しにくいという性質をもつ。このことから、観察条件は、ハイブリ効率とキネシン蛍光観察の両方を適度に満たす条件でなければならない。過去の研究から DNA ハイブリの平均解離時間は 20 bp で 45 分程度と、比較的ハイブリの解離は

遅いことがわかっている(多田隈尚史, 早稲田大学博士論文)。そこで、本研究では、DNA がハイブリしやすい高サンプル濃度、高イオン濃度下でハイブリさせたのち、キネシンの蛍光一分子観察に適した低サンプル濃度、低イオン濃度条件において観察する、という方策をとることにした。イオン濃度に関しては、二本鎖の結合を安定させる効果が、 Mg^{2+} は K^+ や Na^+ と比較して強いことが知られており、実験によっても確かめられたため、 Mg^{2+} 濃度を上げて、ハイブリ効率を高める事とした。具体的には、DNA 二重鎖-キネシンのハイブリは $[Mg^{2+}] = 10 \text{ mM}$ で行ない、観察時は $[Mg^{2+}] = 5 \text{ mM}$ の条件で行なった。

以下で、溶液最適化の検討結果を示す。

2-4-1-1) DNA の蛋白への非特異的吸着

DNA 二重鎖-キネシンは、キネシンの一分子観察系に DNA を導入することに他ならない。DNA 二重鎖-キネシンの観察に先立って、DNA が主に非特異的吸着によりキネシンの運動観察に悪影響を与えないかどうかを調べた。

まず、DNA が単体でレールである微小管に非特異的吸着をしないかどうかを確認した。Cy5 標識した 20 nt のオリゴ DNA 125 nM をフローセルにいて、Axoneme への吸着を調べた所、輝点の数は、0.18 個/ μm Axoneme (= 7 個 / 40 μm の Axoneme)と非常に少なかった。実際の観察ではさらにこれの 1/100 程度の DNA 濃度で観察するので、吸着は実験に支障はないと判断した。この結果は、DNA の主鎖がマイナスに帯電しており、同じくマイナスに帯電している微小管の C 末端と反発するためと考えられる。

続いて、キネシンと DNA が非特異的吸着しないかどうかを調べた。微小管と静電的相互作用で結合するキネシンの頭部はプラスに帯電していることから、最も危惧されることはマイナスに帯電する DNA がキネシン頭部に吸着し、キネシン頭部と微小管の結合を阻害することである。そこで、通常キネシン一分子観察条件下に過剰量の DNA を入れて、キネシンの運動に変化がないか調べることにより、キネシン頭部への吸着を評価した。まず、Cy5 標識したキネシン(K490AV 215-Cy5, AV は avidin tag を用いて精製したことを示す)約 0.1 nM に対し、20 nt のオリゴ DNA 10 nM を加えて観察したところ、通常キネシンと同様の運動が観察された。次に 0.5 μM でハイブリさせた 20 bp の二重鎖 DNA を 10 nM 加えて観察したところ、同様の結果が得られた。これらの観察結果から、DNA の非特異的吸着によるキネシン運動活性への影響は少ないことがわかった。

2-4-1-2) Mg^{2+} 濃度の最適化

イオン濃度、特に Mg^{2+} 濃度を上げると DNA 二本鎖の結合が安定することが知られている一方、キネシン分子の運動については、イオン濃度 (K^+ 濃度) が上がるにつれて連続歩行距離が短くなるとの報告がある。よって、DNA がハイブリしやすい高サンプル濃度、高イオン濃度下でハイブリさせたのち、キネシンの蛍光一分子観察に適した低サンプル濃度、低イオン濃度条件において観察するのが望ましいと考えられる。ただし、観察時もイオン濃度が低すぎると DNA 二本鎖の結合が不安定になりダイマーを維持できない可能性があるため、DNA 二本鎖の結合が安定しつつキネシンの連続歩行距離が確保できるイオン濃度を設定しなければならない。ここでは 20 bp の DNA 二重鎖-キネシン(K349CLM 342_20bp) を用い、観察溶液条件の最適化を行なった。

まず、 Mg^{2+} 濃度の野生型キネシン活性への影響を調べた。Cy5 で標識した野生型のキネシンを従来キネシンの観察に用いていた BRB12 ($[Mg^{2+}] = 2 \text{ mM}$) をベースとして Mg^{2+} 濃度を 2 - 20 mM の範囲で変えて観察したところ、カイモグラフ(3-5-1 参照)は図 2-13A のようになり、連続歩行距離、微小管への結合頻度とも濃度を上げるにつれやや低下するものの、10 mM 程度までは大きな影響はないと考えられる。 $[Mg^{2+}] = 2 \text{ mM}$ と $[Mg^{2+}] = 5 \text{ mM}$ の条件に関して、運動速度と連続歩行距離を定量したところ、 $[Mg^{2+}] = 2 \text{ mM}$ では、速度: $480 \pm 70 \text{ nm/s}$ 、平均歩行距離: $1.4 \mu\text{m}$ 、 $[Mg^{2+}] = 5 \text{ mM}$ では $469 \pm 94 \text{ nm/s}$ 、平均歩行距離: $1.3 \mu\text{m}$ となり、5 mM までは運動性能が変わらないことを示した(図 2-13B)。

続いて、DNA 二重鎖-キネシンの観察に用いる溶液条件の検討を行なった。ハイブリ条件と観察条件を別々に検討した。

①ハイブリ条件

イオン濃度を上げると DNA 二本鎖結合が安定するが、その際に 2 価のイオンが特に有効であると考えられている。そこで、2 価イオン (Mg^{2+}) の濃度を上げずに 1 価イオン (Na^+) の濃度を上げた溶液と、1 価イオンの濃度を上げずに 2 価イオンの濃度を上げた溶液でそれぞれ DNA-キネシンをハイブリさせた後に運動を観察し、効果に差があるかどうか調べた。検討した条件は以下の通りである。

	条件1	条件2
ハイブリ溶液	FRET Buffer (NaCl 100mM)	Mg10 (BRB12 + MgCl ₂ 10mM)
観察溶液	Mg10	Mg10
DNA-キネシン濃度	0.5nM	0.5nM

それぞれの条件で一分子蛍光観察を行なったところ、図 2-14 のように条件 2 の方で運動する分子が見られた。また、Cy3 と Cy5 が一致して光る分子の数も条件

2の方が高く、ハイブリの安定には2価イオン濃度が寄与していることが確認できた。以降、DNA二重鎖-キネシンのハイブリはMg10条件下で行なった。

②観察条件

観察する際の溶液もある程度イオン濃度を上げないと、DNA二重鎖-キネシンのダイマーが不安定となる可能性がある。そこで、観察溶液のMg²⁺濃度を2-10 mMで振ってみて、運動性能の比較を行なった。効果の比較のため、Na⁺濃度を上げた条件の観察も行なった。

	条件1	条件2	条件3	条件4
ハイブリ溶液	Mg10	Mg10	Mg10	Mg10
観察溶液	BRB12	FRET Buffer	Mg5 (MgCl ₂ 5mM)	Mg10
DNA-キネシン濃度	0.1nM	0.1nM	0.1nM	0.1nM

それぞれの条件で一分子蛍光観察を行なったところ、図2-15のように条件1と2では微小管に結合する分子がほとんどいないのに対し、条件3と条件4では結合する分子が多数見られた。一方、条件3と4で結合する分子数自体は大きな違いはないものの、条件3の方がより運動する分子が見られ、また微小管へ結合した分子の平均滞在時間も長かったことから、観察時の溶液としてはMg5が適していると判断した。

2-4-2) DNA二重鎖キネシン一分子観察の確認

2-4-1)において、ダイマー化したと思われるDNA二重鎖-キネシンを蛍光一分子観察条件下で観察できた。しかし、この方法では、DNA相補鎖が二本鎖を形成しているかどうかを確認することはできない。特に、DNAは短いほど相補鎖の結合が弱く不安定になるが、20 bp以下の短いDNAが観察条件下で安定的にダイマー化しない可能性がある。そこで、20 bp以下の短いDNA-キネシンを用いて、観察条件下でのハイブリの様子の検証を行なうことにした。コンストラクトとして、6、10、15 bpのDNAをK336CLM 333Cに標識したものをを用いた。これらのDNAは長さが6 nm以下と短いことから、DNA両端に標識した色素間距離が短く、FRETが生じる。これらのコンストラクトの一致率、FRET効率といったパラメータを計測し、一分子観察環境下でも相補鎖がハイブリしていることを確認した。一方、20 bp以上の長いDNAに関しても、Cy3とCy5を同時に励起したところFRETがほとんど観察されず、結合した分子の70%以上はCy3とCy5の輝点の位置が一致していたことから、ほとんどの分子は相補鎖でハイブリしていると判断した。

また、DNA 二重鎖-キネシンの運動が ATP 加水分解によるものであることを確認するため、ATP 濃度を変えたときの運動速度を観察し、ミカエリス・メンテン型の変化を示したことから、ATP 加水分解による運動が観察できていることを確認した。

2-4-2-1) DNA 二重鎖キネシンのハイブリ効率確認

相補的配列がハイブリして二本鎖を形成しダイマー化するもの以外にも、DNA のハイブリ以外の相互作用や蛋白同士、蛋白と DNA 間の相互作用によってダイマー化するものがある可能性がある。相補的配列のハイブリによってダイマー化するものがどの程度いるかを評価するためのパラメータとして、「一致率」を測定した。

DNA 長が 5 nm 以下の 6 – 15 bp の DNA 二重鎖-キネシンについて考えると、514 nm レーザーで励起した時、相補鎖でダイマー化したものは FRET を起こして Cy5 の輝点として観察され、それ以外のものは Cy3 の輝点として観察される。そのため、 N_{all} を全分子数、 N_{Cy5} 、 N_{Cy3} をそれぞれ Cy5、Cy3 で観察された輝点の数とすると、

$$\frac{N_{Cy5}}{N_{all}} = \frac{N_{Cy5}}{N_{Cy5} + N_{Cy3}} \quad (2-11)$$

は、相補鎖でハイブリした分子の割合を表していると考えられる。微小管上の輝点のみを利用して計測しているため、溶液中のハイブリした分子の割合とは異なる可能性があるが、定性的な傾向は反映していると考えられる。514 nm で励起、30 frame/s で撮影し、解析では、カイモグラフ上で 2 frame(= 66 ms)以上滞在したものを軸系に結合した輝点とみなし、変位の有無に関わらずカウントした。キネシン-DNA のモノマーの平均結合時間は 170 ms であったことから、この方法で大部分の輝点をカウントできると考えられる。

まず、センス鎖同士、アンチセンス鎖同士が溶液中でハイブリして運動しないか 10 bp の DNA 二重鎖-キネシン K336CLM 333_10bp で確認したところ、図 2-16 のように、軸系上においてセンス鎖同士、アンチセンス鎖同士の分子はほとんど見られなかった。一致率を定量したところ、センス鎖-アンチセンス鎖の一致率は 43% ($N_{Cy3}=405 / N_{Cy5}=303$) になったのに対し、センス鎖-センス鎖の一致率は 1% 以下 ($N_{Cy3}=681 / N_{Cy5}=1$)、アンチセンス鎖-アンチセンス鎖の一致率は 2% 以下 ($N_{Cy3}=538 / N_{Cy5}=10$) と低い値であった。

DNA が長くなるほどハイブリの安定性は高くなることから、一致率は DNA 長によって異なり、長いほど一致率が高くなると考えられる。そこで、10 bp と同

様の方法、条件で 6 bp と 15 bp のコンストラクトの一致率を計測した(図 2-17)。ただし、K336CLM 333_6bp と K336CLM 333_10bp では、FRET 効率が高いため、FRET を起こした Cy3 の輝点はほとんど見えないが、K336CLM 333C_15bp では FRET 効率が 50% くらいで Cy3 と Cy5 の蛍光強度は同程度になるため、Cy3 側でも Cy5 側でも輝点として観察できる。そこで、

$$\frac{N_{Cy5}}{N_{all}} = \frac{N_{Cy5}}{N_{Cy3}} \quad (2-12)$$

を一致率として算出した。計測の結果、6 bp では 7% ($N_{Cy3}=1419 / N_{Cy5}=108$)、10bp では 43%、15 bp では 71% ($N_{Cy3}=731 / N_{Cy5}=520$)と、想定通りの結果が確認できた。

2-4-2-2) FRET 効率による二重鎖 DNA の構造確認

前節の実験で相補鎖同士で結合していることは確認できたが、3 分子以上の DNA-キネシンが結合している可能性がある。蛍光強度を測定して軸系に結合する輝点の Cy3 と Cy5 が 1 分子であること、つまり DNA 二重鎖-キネシンが 1 分子ずつでダイマー化していることを確認した。また、DNA が部分的にハイブリしているだけで螺旋構造をとっていない可能性もある。そうすると、後述の 2-4-3)で頭部間距離を算出する際の「DNA=硬い棒」の仮定が成り立たなくなり、それを前提として算出した頭部間距離の分布が実際の分布と大きく異なってしまふ。そこで、FRET 効率から色素間距離を算出し、想定される距離と一致するかどうかを調べた。

K336CLM 333_10bp を用いて、蛍光が 1 分子であることを確かめた。まずは、蛍光色素の退色を用い、1 段階で退色した輝点を 1 分子とみなすことにより、1 分子の Cy3・Cy5 の蛍光強度を計測した。K336CLM 333_10bp を AMPPNP 1 mM 条件下で軸系上に固定し、輝点が消えた励起光は 514 nm レーザー・2 mW で、20 frame/s で撮影し、2-3-3)に従って測定した。10 bp は FRET を起こすことから、Cy5 が一段階退色→Cy3 の蛍光が復活→Cy3 が一段階退色、が観察された分子に着目することにより、FRET 中での Cy3、Cy5 1 分子の蛍光強度の定量を行なった(図 2-18A)。Cy3 と Cy5 の蛍光強度の分布を見ると、ピークが 1 つあるガウス分布に近い形になっており、想定通り 1 分子の蛍光色素の強度を反映していると考えられる(図 2-18B 上)。次に、ATP 1 mM 条件下で運動中の K336CLM 333_10bp を観察し Cy3、Cy5 の蛍光強度を計測した。AMPPNP 条件下と励起・観察条件を揃えて(514 nm レーザー・2 mW、20 frame/s)撮影し、10 frame(= 0.5 s)以上滞在し、2pixel(= 160 nm)以上変位した分子について解析を行なった。Cy3 と Cy5 の蛍光強度は AMPPNP 条件下と同様に、ピークが 1 つあるガウス分布に近く、ピーク位置も AMPPNP 条件と ATP 条件でほぼ一致した(図 2-18B 下)。さらに、FRET 効率も 70%、71%と同程度

になったことから、ATP 条件下で運動している分子は、センス鎖とアンチセンス鎖が 1 分子ずつハイブリした分子であることを示している。

なお、運動中の分子の中には、FRET 効率が低いものが見られた(16% = 25/156 分子)。これは、Cy5 が退色したか、暗状態であるか、あるいはセンス鎖同士でハイブリしている分子と考えられる。しかし、蛍光強度の解析から、センス鎖同士でハイブリしている分子である可能性は低いと考えられる。もしも、センス鎖同士でハイブリしているのであれば、Cy3 の蛍光強度は 1 分子の 2 倍程度の強度を示すはずであるが、Cy3 の蛍光強度分布では、Cy3 2 分子の明るさの分子の割合は非常に少なかった(4% = 6/156 分子)。よって、ほとんどの分子は、正しくセンス-アンチセンス結合しており、また、期待された螺旋構造を取っていると考えられた。

続いて、FRET 効率から DNA 両端距離を見積もった。10 bp については、FRET 効率 70%という結果から、4.5 nm 程度と推定される。一方、DNA 二重鎖が直径 2 nm の螺旋構造をとっていると仮定すると、色素間距離はおおよそ 4 - 4.5 nm と想定され(図 1-7 参照)、FRET 効率は 70-80%になると予想される。Cy5 側に Cy3 の蛍光が 5%程度漏れるため、実際の FRET 効率は測定値 70%よりも若干低くなる(=距離見積もりが長くなる)が、色素自体が大きさをもつことを考慮すると、実験結果は想定される構造をほぼ反映したものだといえる。6 bp と 15 bp のコンストラクトについても同様の方法、条件で運動中の分子の FRET 効率を計測し、DNA 二重鎖両端の距離を定量した。ただし、15 bp は運動している分子が少なかったため、変位の有無に関わらず 10 frame(= 0.5 s)以上滞在したものについて測定した。その結果、FRET 効率は K336CLM 333_6bp では 92%、K336CLM 333_15bp では 43%となった(図 2-19)。FRET 効率から算出される色素間距離は 6 bp では 3.2 - 3.3 nm、15 bp では 5.2 - 5.3 nm となり、想定される距離とおおよそ一致した。以上から、15 bp 以下の短い DNA に関しては、両端に結合させた色素間の FRET 効率が、構造から期待される値とほぼ一致したことから、正しい構造を取っていると判断した。

2-4-2-3) ATP 加水分解による運動の確認

514 nm レーザーで励起、10 frame/s で撮影し、ATP 1 mM 下で運動速度と連続歩行距離を定量した結果、K336CLM 333_6bp は、速度 : 308 ± 68 nm/s、歩行距離 : 376 nm、K336CLM 333_10bp は、速度 : 236 ± 64 nm/s、歩行距離 : 250 nm、K336CLM 333_15bp は、速度 : 37 ± 50 nm/s、歩行距離 : 115 nm となった(図 2-20)。さらに、K336CLM 333_6bp と K336CLM 333_10bp について運動速度の ATP 濃度依存性を調べると、図 2-21 のようにミカエリス・メンテン型の振る舞いを示し、 K_m が野生型キネシンと同程度になったことから、ネックリンカー伸長型 DNA 二重鎖-キネシンの運動はキネシンの ATP 加水分解によるものであることが確認できた。

2-4-3) DNA 二重鎖-キネシンにおける頭部間距離

過去の研究では、頭部間距離を変えるために、変異体を用いアミノ酸ペプチドをネックリンカーとコイルドコイルの間に挿入する、という手法が用いられている。一方、本論文で用いた DNA 二重鎖-キネシンは二つのキネシン頭部の間に DNA を挿入することによって頭部間距離を変えているが、DNA とアミノ酸の性質の違いにより、頭部間距離の分布は大きく異なる。ここでは、DNA を硬い棒、アミノ酸鎖や DNA-蛋白質間の炭素鎖リンカーをバネと考えたモデルを仮定し、アミノ酸のみ挿入した polyG 変異体と DNA 二重鎖-キネシンの頭部間距離の分布の違いを算出した。

2-4-3-1) DNA の力学的特性

ここでは、DNA の引っ張り、曲げ、ねじりに対する力学的特性を考える。

まず、引っ張りに対する特性については、過去に光ピンセットを用いた研究が行われている。これらの研究により、DNA の弾性係数はおおよそ 1000 pN (Wang *et al.*, 1997) と非常に硬いことがわかっている。しかし、最近の研究で、より長い場合には現在考えられているよりも弾性がある可能性があることが示唆されている (Mathew-Fenn *et al.*, 2008)。この論文では、DNA の両端距離を X 線小角散乱(SAXS)を用いて測定したところ、平均的な両端距離は DNA の塩基数の増加に比例して大きくなったのに対し、両端距離の分布は想定されていたものより広く、塩基数に対して二乗に比例して大きくなることがわかった。10 bp くらいまでの短い DNA であれば、従来の DNA は硬い棒であるという考え方が適応できるが、より長い DNA については成り立たないことが示唆された。例えば、35 bp の DNA では分布の標準偏差が従来のモデルと比較して 10 倍になってしまう。そのため、20 – 40 bp の長い DNA を扱う場合は注意が必要であるが、2-6) で張力の詳細な見積もりを行なった 15 pb 以下の短い DNA については、本研究では硬い棒であるとみなした。

次に曲げについて、曲げ特性については Persistence length というパラメータを確認した。DNA は、Persistence Length が 50 nm (= 143 bp; Bustamante *et al.*, 1994) であり、ポリグリシン鎖 ($l_p = 0.8$ nm; Sahoo *et al.*, 2006) やペプチド鎖の中では比較的硬いポリプロリン鎖 ($l_p = 4.4$ nm; Schuler *et al.*, 2005) と比較して硬い構造であると考えられる。実際、本研究で用いた 6 – 40 bp の DNA における両端距離を考えると、Worm-Like Chain モデル(詳細は 2-6 参照)による計算から曲げによる距離の変化量は 1% 以下であることから、本研究で用いた 40 bp 以下の DNA 二重鎖は硬い棒とみなした。

最後にねじりについて考えると、DNA とキネシンを接続している炭素鎖が C-C の単結合であることから、ねじり方向の自由度が非常に高い。そのため、微小管に結合している頭部を起点とした、浮いている頭部のねじり方向の自由度については、特に考慮する必要はないと考えられる。(DNA のねじり方向の変形については、Hayashi and Harada 2007; Strick *et al.*, 1999)

2-4-3-2) ポリペプチド鎖とリンカーの力学的特性

polyG はポリペプチド鎖が挿入されている。ポリペプチド鎖は、特異的な結合がなければ溶液中ではランダムチェーン構造をとると考えられることから、力学的にはエントロピー弾性をもったバネと近似できる。そのため、polyG の挿入部位は、2つのバネをつないだものとみなせる(図 2-22A)。それに対し、DNA 二重鎖-キネシンは DNA および DNA と蛋白の間のリンカーが挿入されている。リンカーは、DNA マレイミド化の架橋剤として EMCS を使用した場合を考えると、C12 の炭素鎖である(図 2-1 参照)。炭素鎖はポリペプチド鎖と同様にエントロピーバネと近似できることから、ネックリンカー伸長型の挿入部位は硬い棒の両端にバネがつながったものとみなせる。

2-4-3-3) 挿入部位の末端間距離見積もり

以上の特性に基づいて 20 bp の DNA のネックリンカー伸長型に挿入される部位 $(\text{CH}_2)_{12} + 20 \text{ bp DNA} + (\text{CH}_2)_{12}$ の末端間距離を計算するために、ここでは以下のような簡単なモデルを仮定した。

- ・ C-C 結合は正四面体則に従い、trans、gauche x2 の 3 状態しか取らない(図 2-22B)。DNA の両端と C の間も同様
- ・ trans、gauche+、gauche- は等確率で発生する
- ・ DNA は長さ 6.8 nm の剛直な棒と仮定し、ねじれ、引っ張り、曲げに対する変形は考慮しない

この仮定の下、Monte Carlo 法により、末端間距離の分布を求めたところ図 2-22C のような分布となり、平均距離は $7.0 \pm 0.5 \text{ nm}$ となった。この分布は、正規分布に近い分布であるが、最小値と最大値(すべての C-C 結合が trans をとった場合)をもっており、狭い範囲の長さしかとれないことがわかる。ただし、実際にはリンカーは炭素鎖だけでなく、Dock により頭部と結合していないペプチド鎖もバネとして寄与するため、分布はこの仮定とは異なる。しかし、DNA の長さを中心とした分布で、分布の幅がリンカー(炭素鎖+ポリペプチド鎖)で決まる、という考え方は同じである。2-6)の張力見積もりにおいては、より厳密な見積もりを用いた。

一方、ポリペプチド鎖の末端間の平均距離は以下の式で表される(Rice *et al.*, 2003)。

$$L = C \times L_0 \times \sqrt{N} \quad (2-13)$$

C:係数(ペプチド鎖の場合は 2), L_0 :セグメント長(= 0.35 nm), N:アミノ酸数

この式より平均距離が 7.0 nm となるには 100 残基必要であることがわかる。ポリペプチド鎖の末端間距離の分布が正規分布になると仮定すると、100 残基のポリペプチド鎖の分布は図 2-22C のようになり、DNA の場合と比較して幅広い分布になる。この点が、polyG とネックリンカー伸長型 DNA 二重鎖-キネシンの最も大きく異なる点である。

2-4-3-4) 片足状態における浮いた頭部の拡散範囲

この分布がキネシンの運動性能にどのような影響を与えるかを考える。DNA の先に、直径 5 nm のキネシン頭部がついているとすると、DNA のねじれ角は 3σ の範囲が ± 135 度程度(cf. C-C 結合の trans 型と gauche 型の角度差は 120 度)であり、また、回転軸の緩和時間は 15 ns 程度であることから、ねじれ回転軸の自由度は保証されていると考えられる(Hayashi and Harada 2007)。よって、ネックリンカー伸長型の片方の頭部が微小管の β -tubulin に結合している時、他方の浮いている足が拡散により拡散しうる範囲を二次元平面上に表示すると、図 2-23A のように、結合する頭部を中心としたドーナツ状の領域になる。

ただし、頭部の拡散可能な範囲を考える際には、DNA リンカーと頭部の間にネックリンカーに相当するポリペプチド鎖が残っており、その分だけ頭部間距離の分布は挿入部の末端間距離の分布より広がることを考慮する必要がある。また、2-5) で論じるように、dock 状態と呼ばれる状態において、ネックリンカーは前方に向かって頭部と結合させ、レバーアームのように浮いた頭部の位置を前方へシフトさせることが知られている。例えば 337 のようにネックリンカーの先で接続した DNA 二重鎖-キネシンの場合、微小管に結合した頭部が dock 状態を取ると、ランダムチェーンの末端位置が前方へシフトすることから、頭部の拡散範囲の中心も前方へシフトすると考えられる。同時にフリーペプチド鎖が短くなるため、拡散範囲の幅(ドーナツの幅)は小さくなる。一方、浮いた頭部のネックリンカーは頭部へ結合していないことから、フリーのペプチド鎖として振る舞うと考えられる。

これらの仮定に基づき、片足状態において浮いた頭部の到達できる範囲、およびそれから予想される運動を考える(図 2-23B)。野生型キネシンのように前方へ歩行する際は、浮いている頭部は拡散範囲内にある β -tubulin にのみ結合すると考えら

れる。DNA が比較的短い時は、範囲内にひとつ先の β -tubulin が存在し、普通のキネシンのように 8 nm ごとに歩けると考えられる。拡散範囲の幅(ドーナツの幅)は DNA と頭部の間のリンカーとポリペプチド鎖によって決まるので、DNA が長くなった場合は、拡散範囲の幅は広がらず半径のみが大きくなる。ある程度長くなると、ひとつ先の β -tubulin が拡散範囲から外れるが、この時、浮いた頭部は結合できる β -tubulin がないため、次の一步が踏み出せず歩けなくなってしまうと予想される。さらに長くなると、ふたつ先の β -tubulin が拡散範囲に入ってくることから、一步飛ばしで(16 nm ごとに)歩けるようになると考えられる。

2-4-4) 走行性能比較による距離見積もりの妥当性検証

2-4-2)で 6 – 15 bp のコンストラクトに関して観察された運動の変化は、頭部間距離の変化に対応していると考えられる。一方、それを確認するために、DNA の長さ と DNA-キネシンの運動性能に関してさらに詳細に調べた。

6 – 15 bp の DNA-キネシンでは、FRET を起こした分子をダイマーと見なし て測定を行なったが、20 bp(= 6.8 nm)以上では、DNA 両端の Cy3 と Cy5 がほとんど FRET を起こさないと考えられることから、Cy3 と Cy5 を同時に励起し、Dual View で観察して、輝点の位置が一致したものをダイマーと見なし て測定した。フレームレートは 30 fps で、励起強度は 6 – 15 bp で FRET を観察する場合は 514 nm レーザーのみ、20 bp 以上は 514 nm レーザーと 635 nm レーザーで同時励起した。2-5)や 2-6)で運動評価を行なった際も、特に記載がない限りは同様の条件で観察している。コンストラクトとしては、6 – 40 bp の DNA を K336CLM337C に標識したものをを用いた。

15 – 40 bp のコンストラクトを観察したところ、18、20 bp では連続的に運動する分子はほとんど見られなかったが、22 – 25 bp では少数ながら連続歩行する分子が観察された。さらに DNA を長くして 30 – 40 bp にすると、再び運動する分子はほとんど見られなかった(図 2-24A)。運動性能の定量化をする上で、運動する分子数が少なく歩行距離も短いために、運動速度と連続歩行距離での運動性能の比較は難しいことから、ここでは指標として、2-3-3)で導入・検証した運動確率を使って運動性能の比較を行なった。6 – 40 bp のコンストラクトについて運動確率を計測したところ、

- ①6 – 15 bp にかけては、DNA 長が長くなるにつれて運動確率が減少する
- ②18 – 20 bp では運動確率は 1%以下でほとんど動かなくなる
- ③22 – 25 bp で再び運動確率が 5%程度まで上昇
- ④30 – 40 bp では運動確率 1%以下。

という傾向が見られた(図 2-24B)。①の 6 – 15 bp では、浮いた頭部が 1 つ先の

β -tubulin に到達していると考えられるのに対し、③の 2 つ目のピークは、2 つ先の β -tubulin に到達している一歩飛ばしの歩行に対応していると推定される。1 つ先の β -tubulin は 8 nm、2 つ先は 16 nm 先にあることを考慮すると、2 つ目のピークは 1 つ目のピークの 8 nm より長い DNA になると考えられる。図 2-24B の曲線のトレンドから見て、1 つ目のピークは 6 bp(2 nm)より短い DNA で表れる可能性が高いことから、2 つ目のピークでの DNA 長が約 8 nm であるのは妥当な結果であると考えられる。

それを踏まえた上でコンストラクトの頭部間距離に注目すると、①や③での頭部間距離は、キネシンの浮いている頭部が前方の β -tubulin に到達するのに適正な距離であると考えられる一方で、②では 8 nm 先の β -tubulin に到達するには長すぎ、16 nm 先の β -tubulin に到達するには短すぎることから、浮いている頭部が次の結合サイトに到達することができず、運動できないと解釈できる。つまり、2-4-3-4)で仮定した通り、DNA を用いたネックリンカーの伸長により、浮いた頭部の拡散範囲が一定の範囲内に制限できていると考える。また④は 16 nm 先の β -tubulin に到達するには長すぎることから再び運動できなくなる、と考えられる。

DNA 長変化と運動性能変化の相関から、DNA 二重鎖-キネシンの頭部間距離はほぼ狙い通りに制御できている、ということが確認できた。

2-4-5) 連続歩行距離と運動確率の整合性検証

キネシンの運動性能評価によく使われる指標として運動速度と連続歩行距離の 2 つがあるが、運動確率は速度より歩行距離と相関の高い指標であると考えられる。それを検証するため、337 接続の DNA 二重鎖-キネシンの運動速度と連続歩行距離を測定し、運動確率との相関を調べた。解析には運動確率と同様に 30 fps で撮影した画像を使用し、5 frame(= 167 ms)以上滞在し 2 pixel(= 160 nm)以上変位した分子について計測を行なった。

337 の比較的運動確率が高い 6, 7, 8, 10, 15, 25 bp の DNA 二重鎖-キネシンについて、運動速度と連続歩行距離および滞在時間の定量を行なった(図 2-25)。次に、3 つの指標と運動確率の相関を見たところ、速度とは相関が見られなかったのに対し、歩行距離・滞在時間とは正の相関が見られた(図 2-26)。このことから、運動確率は DNA 二重鎖-キネシンの連続歩行距離を反映した指標であることがわかった。また、DNA 長と速度および歩行距離の関係を見ると、DNA 長が長くなるほど歩行距離が短くなるが速度はほとんど変化しないことがわかる。これは、DNA 長を長くしたことによる DNA 二重鎖-キネシンの両頭部間の張力の緩みが、歩行距離により効いているということに相当していると推定される。頭部間の張力と DNA 二重鎖-キネシンの運動については、2-6)で詳細に議論する。

2-5) 結果①：ネックリンカーの機能切り分け

本セクションでは、2-1-1)で説明した、ネックリンカーが有する 2 つの機能である「docking による前方への位置シフト」および「頭部間張力による結合/解離の制御」の運動への寄与を切り分けて評価することを目指した。キネシン頭部のさまざまな場所を接続できるという DNA 二重鎖-キネシンの特徴を生かして、接続場所によって 2 つの機能の有無の異なる 4 タイプのコンストラクトを作製した。各コンストラクトの運動性能を比較することにより、2 つの機能のキネシンの運動に対する寄与を評価することができ、「docking による前方への位置シフト」は運動に必須であること、「頭部間張力による結合/解離の制御」は運動自体に不可欠とはいえない一方で、効率的に連続歩行するためには必要であることが示唆された。

本セクションでは、まず 2-5-1)でコンストラクトの分類について説明する。2-5-2)~2-5-5)にてコンストラクトの評価結果について説明し、2-5-6)でそれらの結果を総括し、そこから推測されるキネシンの運動メカニズムについて述べる。

2-5-1) 2 つの機能の有無によるコンストラクト分類

DNA 二重鎖-キネシンの DNA を標識する部位によって、コンストラクトを以下のように分類した。各標識部位の位置は、図 2-27 に示した。

- ①docking あり x 頭部間張力あり
→ネックリンカーの末端、あるいはネックリンカーの途中で標識したものの
標識部位：337, 333, 328
- ②docking なし x 頭部間張力あり
→ネックリンカーの根元で標識したものの
標識部位：324
- ③docking あり x 頭部間張力なし
→N 末付近で標識したものの
標識部位：2, 7
- ④docking なし x 頭部間張力なし
→頭部を直接標識したものの
標識部位：23, 43, 101, 215

①、②はキネシン頭部のネックリンカーを介した接続に相当する。docking 状態の時、ネックリンカー(324 - 336 の 13 残基)は前方に向かって頭部と結合することにより、レバーアームのように浮いた頭部の位置を前方へシフトさせるが、ネ

ックリンカーの先端である 337 を接続した場合は、位置シフト量は野生型とほぼ同等になると考えられる(図 2-27B)。一方、324 はネックリンカーの根元になることから、ネックリンカーを介した頭部間張力は野生型や 337 と同様にかかっているものの、dock 状態でも前方への位置シフトがほとんどないと考えられることから②に分類した。ネックリンカーの途中である 333, 328 を接続した場合は、337 と同様、前方への位置シフトがあるものの、シフト量は、ネックリンカーの根元から接続場所までの距離の分だけであることから、①に相当するが 337 よりは②に近い条件であると考えられる。

N 末に関しては、結晶構造(PDB:1BG2)の検証結果からネックリンカーが undock の状態においては、N 末付近の配列(N 末 - 10 付近) はネックリンカーから解離しているのに対し、結晶構造解析(PDB:1MKJ)や分子動力学シミュレーション(Hwang *et al.*, 2008)から、dock 状態(図 1-2 参照)では N 末付近は β -sheet 構造をとりネックリンカーに結合していると推定される。よって、N 末接続では、ネックリンカーを介したコミュニケーションはないものの、dock 状態において前方への位置シフトは存在していると考えられることから、2, 7 は③に相当するとみなした。ネックリンカーでも N 末でもない頭部の途中の場所(23, 43, 101, 215)で接続したコンストラクトは④に相当する。

本論文において、①、③のコンストラクトの位置シフト量は、結晶構造(1MKJ)における 324 からの進行方向での距離を算出して用いた。ただし N 末については、dock 状態でも N 末(1 - 8)全部が頭部と結合しているわけではなく、根元に近い側半分(4 - 8)だけが結合している。そのため、2 については、324 と 4 の間の距離(1.9 nm)を位置シフト量とした。具体的には 2, 7, 328, 333, 337 についてそれぞれ 1.9 nm, 1 nm, 2 nm, 3.1 nm, 4.2 nm として計算した。

コンストラクトとしては①~④いずれも K336CLM 337C に DNA を標識したものをを用い、運動性能を比較する指標として主に、2-3)で説明した運動確率を用いた。DNA が程よい長さでないと、そもそも前方の結合サイトへアクセスできなかったり、頭部間張力が働かなかつたりするため、各接続場所において 6 - 30 bp(①、②は 40 bp まで)のコンストラクトの運動確率を測定し最適な DNA 長を調べた上で、接続場所の比較を行なった。

2-5-2) docking あり x 頭部間張力あり 評価結果

337 については 2-4-4)および 2-4-5)にてすでに運動評価を行なっていることから、ここでは 333, 328 の運動性能の評価を行なった。333 の運動確率の変化を見たところ、337 の場合と同様に 6 bp をピークとして 20 bp までは確率が単調に低下し、25 bp で少し運動確率が上がった後、30 - 40 bp は再び動かなくなるという傾

向が見られた(図 2-28A 中段)。一方、328 は 6 bp ではあまり動かなかったものの、7 bp で運動確率が上昇し、8 – 15 bp までは単調に減少して 20 bp 以上はほとんど動かなかった(図 2-28A 下段)。

一方、337, 333, 328 の各コンストラクトにおける運動確率のピークを比較すると、337 では 43%@6 bp だったのに対し、333 では 28%@6 bp、328 では 24%@7 bp と、接続場所がネックリンカーの根元に近づくにつれ、ピークの運動確率は下がった。これは、ネックリンカーによる位置シフト量が大きいコンストラクトが運動確率が高くなる、つまり連続歩行距離が長いことを示しているのではないかと考えられる。

328 において見られた運動確率のピークについて考察する。位置シフト量が比較的大きい 337 や 333 では、6 bp のような短い DNA でも浮いた頭部が 8 nm 先にある 1 つ前方の β -tubulin に届くことができる。しかし、328 は 337 や 333 と比較すると前方へのシフト量が小さいことから、DNA が短すぎると浮いた頭部のアクセス範囲(2-4-3-4 参照)が小さいために次の結合サイトに到達できず、運動できないのではないかと考えられる。一方、7 bp では頭部のアクセス範囲(ドーナツ半径)が大きくなることから、次の結合サイトに届きやすくなり運動確率が上がると考えられる。一方、さらに伸ばすと、アクセス範囲には入っているのに関わらず運動確率は下がってってしまう。この原因については、2-6)で議論する。

2-5-3) docking なし x 頭部間張力あり 評価結果

前セクションで、接続場所をネックリンカーの根元に近づけ、前方へのシフトを小さくしたコンストラクトの運動を見たが、本節では、接続場所を根元(324)までもってきて、シフトがほぼないが、ネックリンカーを介した頭部間張力は働くと考えられるコンストラクトの運動性能を調べた。DNA 長を 6 – 40 bp まで変えて運動確率を測定したものの、どの DNA の長さでも運動確率は 1%程度以下とほとんど運動が見られなかった(図 2-28B)。

一方、そもそも微小管に結合してから解離するまでの滞在時間が短かったことから、この結果だけでは、DNA 二重鎖の立体障害によりネックリンカーの docking や頭部の微小管へのアクセスなどが阻害されている可能性が否定できない。一方で、

- 野生型キネシンにおいて 324 に Cy3 や Cy5 といった 1 nm ほどの大きさのある蛍光色素を標識しても運動性能に変化がない
- 324 と 337 に DNA を標識した 2 つの DNA-キネシンをハイブリさせた、ヘテロ DNA 二重鎖-キネシンが一方向運動を示した(詳細は 2-6-3 参照)

といった他の検討結果を考慮すると、DNA の接続そのものが運動性能に影響を与えている可能性は排除できるのではないかと考えられる。

2-5-4) docking あり x 頭部間張力なし 評価結果

キネシン頭部の N 末付近の配列は、結晶構造解析や分子動力学シミュレーションの結果から、undock 状態ではネックリンカーから解離しランダムコイル状態であり、dock 状態では頭部前方を向いてネックリンカーに結合していると推定されている。そのためネックリンカーを接続した場合と同様、N 末をつないだ DNA 二重鎖-キネシンも前方へのバイアスがあると考えられる。N 末付近の接続場所として 2 と 7 を用いたが、dock 状態の結晶構造を見ると N 末により近い 2 の方が前方に位置していることから、よりバイアスが大きいと考えられる(結晶解析の結果からは、前方への位置シフト量が 2 は約 2 nm、7 は約 1 nm と推定される)。

まず、6–30 bp のコンストラクトの運動確率を評価したところ、2,7 とも 6–10 bp の短いところでは運動が見られなかったが、15–18 bp 付近で運動が見られ、20 bp より長いところでは再び運動が見られなかった(図 2-29)。運動確率のピーク付近を詳しく見ると、2 では 15–18 bp で運動が見られ、ピークが 16–18 bp の間くらいであると推定されるのに対し、7 では運動が見られたのは 18 bp だけであった。2, 7 ともピークの 18 bp においても、運動確率は約 5%程度と低く、速度も 150-200 nm/s と低かった(K336CLM 2_18bp が 167 nm/s、K336CLM 7_18bp が 192 nm/s)。

そこで、これらの運動が一方向の運動であるのかをより詳細に解析するため、変位解析と平均二乗変位解析を行なった。コンストラクトとしては確率ピークである K336CLM 2_18bp および K336 7_18bp を用いた。まず、変位解析を行なったところ、共に一方向に偏った分布が見られた(図 2-30)。続けて平均二乗変位解析を行なったところ、2 では $k = 1.93$ と係数がほぼ 2 に近くなったが、7 では $k = 1.53$ と 1 と 2 の中間くらいの値になった(図 2-31)。この結果から、少なくとも 2 に関しては一方向に運動していると結論付けられ、ネックリンカーを介した頭部間張力が働かなくてもキネシンは一方向の運動が可能であると考えられる。一方、平均二乗変位の結果から、7 の運動の一方向性は結論付けられなかった。2 と 7 でこのように結果の差が生じたのは、7 の前方へのシフト量の小さいことから、浮いた頭部が後方の β -tubulin にアクセスする確率が無視できず、後方へのステップが時々生じているためではないかと考えられる。

2-5-5) docking なし x 頭部間張力なし 評価結果

本節では、docking による前方へのシフトも頭部間張力による結合・解離の制御もないと考えられる DNA 二重鎖-キネシンの評価を行なった。キネシンの頭部

で、前方への位置シフトも、ネックリンカーを介した張力も働かないと考えられる接続場所を考えると、ネックリンカー周辺ならびに N 末以外の場所であればよい。しかし、ヌクレオチド結合部位に近い場所やネックリンカーが dock する際に相互作用する部位に近い場所を接続場所として選ぶと、キネシン頭部モノマーの ATP 加水分解活性自体に影響を与えてしまう可能性がある。また、微小管に結合した時に微小管に近い場所を選んでしまうと、ダイマーになった時に、標識した DNA が DNA 二重鎖-キネシンの運動の立体的障害になってしまう可能性が考えられる。そこで、それらを避けた(キネシン頭部を足に例えた場合)かかとにあたる部位(23, 43)、つま先にあたる部位(215)、ならびにキネシン頭部の頂上付近(101)を接続場所として選んだ。

まず、本研究にて新たに導入したシステイン導入部位の評価を行ない、DNA 接続そのものが運動に影響を与えないことを確認した。続いて、運動確率や変位・平均二乗変位を行ない、いずれの DNA 二重鎖-キネシンも一方向運動しないことを確認した。

2-5-5-1) システイン標識部位の確認

本セクションで使用した標識部位のうち、2, 7, 43, 215, 324, 328, 333, 337 については、システイン置換および蛍光色素の標識によるキネシンの活性への影響はないことが過去の文献によって示されている(Rice *et al.*, 1999; Tomishige *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2007)。一方、今回新たに導入した部位である 23, 101 に関しては、システイン置換および DNA 標識がキネシンの活性に影響を及ぼす可能性がある。その場合、DNA 二重鎖-キネシンの活性低下が見られた時に、それが標識によるものなのか、キネシンのメカニズムが阻害されたことによるものなのかを結論付けることができない。そこで 23 と 101 残基のシステイン置換および標識によるキネシン活性への影響を調べた。

コンストラクトとしては K490CLM 23/WT-ST ならびに K490CLM 101/WT-ST を蛍光標識したものをを用いた。蛍光プローブとして Cy3 や Cy5 のような有機色素ではなく、数 nm~十数 nm の大きさをもつ Qdot を利用した。これは、直径 2 nm で長さが 2-14 nm になる DNA がキネシン頭部に標識されていると歩行の立体的な障害になる可能性があるが、DNA 以上に大きな Qdot 標識によりこの立体障害の有無を評価できると考えられたためである。Qdot の標識方法としては、まずキネシンにマレイミド基を用いて biotin を標識し、その後表面に Streptavidin が修飾された Qdot を混ぜ合わせた。Qdot は蛍光波長のピークが 655 nm となる Qdot655(#Q10121MP, Invitrogen 社)を利用し、励起波長 635 nm で観察した。

ATP 1 mM における速度を調べたところ、23/WT-ST は 499 ± 59 nm/s、

101/WT-ST は 472 ± 58 nm/s (測定数はそれぞれ $N = 25, 23$) となり、215/WT-ST(502 ± 75 nm/s)や野生型キネシンのコイルドコイルを標識した K490CLM 416C(514 ± 52 nm/s)とほぼ同等の結果となった。また、運動速度の ATP 濃度依存性を調べたところ、どのコンストラクトもミカエリス・メンテン型を示し、 V_{max} や K_m も 416 や 215 標識のものとはほぼ同等となった。これらの結果から、23, 101 をシステイン置換および蛍光標識したことによるキネシンの活性への影響は少ないと考えられる。

2-5-5-2) 運動性能評価

DNA とキネシンの間のリンカー分まで考慮すると、DNA 長がおおよそ 6–8 nm(塩基数では 20–25 bp 付近)の時に動く可能性が高いと考えられることから、各コンストラクトについて DNA の長さを 15–30 bp まで変えて運動性能を確認した。

43 や 215 ではほとんど運動が見られず、運動確率も全 DNA 長で 1%以下と低かった。一方、23 や 101 は 15–20 bp で双方向と思われる運動が見られた(図 2-32A)。これらのコンストラクトの運動確率については従来の解析方法では定量できないが、運動しやすさを大まかに定量する目的で以下のように運動する分子数をカウントした。

①途中で変位方向が変わったものは除外し、微小管結合から解離まで一方向に動いた輝点のみをカウントした。

②どちらの方向に進んだものも運動したものとみなした。具体的には、各微小管で二方向に進むものを別々にカウントし、あとで合計した。

その結果、15–20 bp で 1–2%程度と、43, 215 と比べるとやや運動確率が高かった(図 2-32B)。なお、二方向に進む分子を各微小管で別々にカウントしたが、両方向に進む分子数に大きな違いは見られなかった。

23 と 101 のふらふらした動きが方向性のあるものなのか、それともランダムなものなのかは、運動の軌跡を見ただけで判別するのは難しい。そこで、定量的な判断のため、変位解析ならびに平均二乗変位解析を行なった。まず、23 と 101 の変位分布を見たところ、23・101 とほぼ二方向の分布が均等になったことからはっきりとした方向性のない運動であることがわかる(図 2-33)。ただ 101 の分布を細かく見ると、やや+端方向に偏っているように見えるが、この結果だけでは有意に+端方向への偏りがあるかどうか結論づけるのは難しいと考えられる。そこで続けて、平均二乗変位分布の解析を行なった。その結果、23 では $k = 1.24$ 、101 では $k = 0.84$ と 1 に近い係数となったことから、23・101 の動きは方向性のないランダムな運動であると考えられる(図 2-34)

2-5-6) 結果まとめ

図 2-35A に、本章で用いた各コンストラクトの運動確率の違いをまとめた。ここで示した運動確率は、各接続場所で DNA 長を変えた時に最も高かった運動確率である。また図 2-35B には、図 2-35A の各コンストラクトの docking による位置シフト量と運動確率の関係を表わした。なお、位置シフト量は前述の通り、結晶構造 (1MKJ) における 324 からの進行方向での距離を算出し、頭部途中で接続したものはゼロとした。これを見ると、頭部間張力の有無に関わらず、位置シフト量が小さいと運動確率が 0 に近く、大きいほど運動確率が高い傾向がわかる。23 や 101 など、位置シフト量が 0 でも運動確率が数%のものが一部存在するが、これらは方向性のないふらふらとした運動であることから、一方向性の運動性能については位置シフトが運動に必須であることが示された。

一方、ネックリンカーを介した頭部間張力については、N 末を接続した DNA 二重鎖-キネシンにおいても一方向運動が見られたことから、運動に必須なメカニズムではないと考えられる。しかし、同程度の位置シフト量の 328 と 2、7 を比較すると、328 の運動確率が明らかに高かったことから、ネックリンカーを介した張力が一方向性の運動を促進するファクターであり、キネシンがその運動能力を発揮し効率的に運動するためには不可欠な機能であることが示された。そのメカニズムについては、2-6) で詳細に検証する。

2-6) 結果②：頭部間張力の運動への寄与

2-5)では、ネックリンカーを介した頭部間張力が効率的な運動に重要であることを示したが、この節では頭部間張力を定量化することにより、頭部間張力がキネシンの歩行を制御するメカニズムのより詳細な解明を目指した。具体的には、頭部間張力が運動速度と連続歩行距離のどちらに影響するかを見ることで、「促進モデル」と「抑制モデル」のいずれが歩行中に機能しているのかを検証した。

本研究では、光ピンセットなどを用いてキネシンに直接張力を与えるというアプローチをとらず、DNA-キネシンの DNA 長や接続場所を変えたコンストラクトを作製することにより、間接的に張力を変化させている。まずは DNA 二重鎖-キネシンの構造をモデル化し、Worm-like Chain(WLC)モデルを仮定して張力の見積もりを行なった。さらに、328 を異なる 3 つの炭素鎖リンカーで接続した DNA 二重鎖-キネシンを用いて、docking による位置シフト量を変えずに、頭部間張力のみを変えて運動性能を評価し、頭部間張力が運動速度よりも連続歩行距離に影響することが確認できた。この結果は抑制モデルを支持している。

さらに、頭部のさまざまな場所を接続したヘテロな DNA 二重鎖-キネシンの運動性能を評価し、キネシン頭部のネックリンカーだけでなく頭部後方も張力を検知できる可能性があることを示した。

2-6-1) 頭部間張力見積もり

本節では WLC モデルに基づいた DNA 二重鎖-キネシンの頭部間張力の定量化手法について説明する。DNA 二重鎖-キネシンの構造的な特徴を踏まえ定量化に必要な各パラメータを仮定し、片足状態において微小管と結合していない浮いた頭部が次の結合サイトにアクセスする確率、および両足状態でネックリンカーにかかる張力の見積もりを行った。さらに、それらを通して、従来のポリペプチド挿入変異体との差異についても説明する。

なお、2-4)でも頭部間距離および浮いた頭部の拡散範囲を見積もったが、異なる点としては、①WLC モデルを用いたこと、②DNA と DNA リンカーだけでなくフリーのペプチド鎖も加味したこと、③結晶解析結果をもとに拡散中心をより厳密に考慮したこと、である。

2-6-1-1) 両足状態における頭部間距離 見積もり

片足状態におけるアクセス確率・両足状態における頭部間張力は共に、両足状態の時の頭部間距離と、DNA 二重鎖-キネシンの接続部の長さの兼ね合いで決ま

る。WLC モデルで接続部の長さの分布の定量化を試みるが、張力見積もりにおいては両足状態の時の頭部間距離を正しく見積もることも重要となる。まずは、過去の結晶解析の結果から、両足状態における頭部間距離を見積もった。

キネシンは頭部のヌクレオチド結合状態によって構造が大きく変化することから、まずは歩行中の両頭部の構造の仮定をおいた。過去の結晶構造解析の研究結果(Sindelar *et al.*, 2002; Kull *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 2001)から、キネシン頭部には少なくとも安定な状態が「dock 状態」「undock 状態」「ヌクレオチドが頭部に結合していない状態(以降 ϕ 状態と記述する)」の 3 つあると考えられている。Dock 状態はネックリンカーが頭部の前方に結合した構造であり、ADP もしくは AMPPNP(加水分解しない ATP アナログ)が頭部に結合した場合の結果が報告されている。一方、undock 状態は ADP が頭部に結合しているが、ネックリンカーが頭部に結合しておらず、ネックリンカーの根元を起点に自由に拡散している状態である(図 2-36A)。本研究では、まず ATP 状態では dock 状態(PDB:1MKJ)をとると仮定した。ADP 状態では dock 状態も undock 状態も結晶構造で得られていることから、おそらく 2 つの状態を動的に行き来しているのではないかと推測できる。しかし、クライオ電顕の結果(Rice *et al.*, 1999)や EPR の結果(Rice *et al.*, 1999; Sindelar *et al.*, 2002)から、我々は ADP 結合状態では undock 状態が支配的であると仮定した。

一方、 ϕ 状態については過去に報告がない。分解能の低いクライオ電顕での結果(PDB:2P4N)を見ると、全体的な構造は dock 状態よりも undock 状態に近い。しかし、分解能が不足しているため、ネックリンカーの位置は不明瞭である。他のキネシンファミリーであり、ペプチド鎖の中間部分にモータードメインをもつ KinI では ϕ 状態の結晶構造が報告されているが(PDB:1RY6)、この結晶において KinI のヌクレオチド結合部には Sulfate が入っており完全に空の状態ではない。この構造も全体的な構造は undock 状態に近いものの、ネックリンカーの位置は同じく不明瞭である。さらに、微小管のマイナス端側に動くモーターである Kar3 においても、クライオ電顕の構造が報告されている(Hirose *et al.*, 2006)。しかし、Kar3 は微小管との結合で重要な役割を果たす $\alpha 4$ ヘリックスの構造が異なっているため、参考にできない。以上の結果を踏まえて、我々は、 ϕ 状態では undock 状態の構造をとっていると仮定した。

以上の考察から、両足状態での構造状態を、前方頭部は undock 状態、後方頭部は dock 状態をとると仮定し、2 つの構造を前後に 8 nm ずらして配置した構造から頭部間距離を見積もった。正確には、頭部に結合していないフリーの接続部の根元を仮定し、両頭部の根元間の距離を頭部間距離とみなして測定した。距離は DNA 二重鎖-キネシンの種類によって異なる。

例えば、324 同士の接続については、頭部間距離は 8 nm になる。一方、ネックリンカーや N 末で接続した DNA 二重鎖-キネシンについては、後方頭部が dock

しているためネックリンカーが前方を向いて頭部に結合していることから、フリーのペプチド鎖の始点は 324 よりも前方にシフトする。例えば 328 を接続した DNA 二重鎖-キネシンでは、dock 状態では 324 - 328 は頭部に結合し、328 からリンカーが伸びていることから、接続部でつなぐべき頭部間距離は 324 - 328 の距離、つまり前方シフトの分だけ短くなる。よって、頭部間距離は、(324 - 324 の距離 - 位置シフト量) となると考えた。位置シフト量の算出については、2-5)と同様、dock 状態の結晶構造(1MKJ)から計測した 324 と接続場所の間の距離を用いた。(具体的なシフト量は 2-5-1 参照)

2-6-1-2) 浮いた頭部の結合サイトへのアクセス確率 [片足状態]

まず WLC モデルに基づき、DNA 二重鎖-キネシンの接続部の長さを定量化した。正確には、DNA 二重鎖、DNA~キネシン頭部を接続するリンカー、頭部に結合しないフリーのポリペプチド鎖の 3 つの構成要素からなる、頭部接続部分の全長を定量化した。その後、両足状態の頭部間距離との相関から、結合サイトへのアクセス確率を定量化した。

DNA 二重鎖-キネシンの DNA とキネシンの接続するリンカーは図 2-36B のような構造になっている。DNA をキネシンに標識する過程としては、まず 3'末端にアミノ基を導入した DNA に対し、マレイミド基と活性エステルを分子の両端に持ったマレイミド化試薬を用いて DNA をマレイミド化した。さらにそれをキネシン表面にあるシステイン内のチオール基と反応させて共有結合させた。DNA の 3'末端とアミノ基の間には C-C 単結合 6 個分のスペーサーが入っており、マレイミド化試薬についてもマレイミド基と活性エステルの中に C-C 単結合のスペーサーが入っている(長さは使用する試薬によって異なる)ことから、DNA とキネシンの間は C-C 単結合でつながれていると考えてよい。

炭素鎖のリンカーと(フリーの)ペプチド鎖は WLC モデルに従いエン트로ピー的なバネとして振る舞うと仮定した。そのため、DNA 二重鎖-キネシンの力学的構造としては、2 つの頭部が硬い棒(DNA)とその両側にあるバネ(スペーサー)でつながれたものにとらえてよい(図 2-36C)。モデルの単純化のため、DNA の両側にあるバネは片側に寄っていると考え、合成したバネ部分の両端間距離の分布である確率密度関数 $P(r)$ を下記の(2.14)式を用いて求めた。

$$P(r) = \frac{4\pi Cr^2}{L^2 [1 - (r/L)^2]^{3/2}} \exp\left(-\frac{3L}{4l_p [1 - (r/L)^2]}\right) \quad (2-14)$$

$$L = 0.13 \times N_{\text{Carbon}} + 0.34 \times N_{\text{AminoAcid}}$$

$$N_{\text{Carbon}} = (N_{\text{Amino-linker}} + N_{\text{Maleimide modified reagents}}) \times 2$$

$$N_{\text{Amino-linker}} = 8$$

$$N_{\text{Maleimide modified reagents}} = N_{\text{spacer}} + \text{マレイミド基} (N = 3)$$

$$N_{\text{spacer}} = 2(\text{AMAS}), 6(\text{EMCS}), 11(\text{KMUS})$$

$$N_{\text{AminoAcid}} = (\text{接続部} - \text{前方頭部基準点}) + (\text{接続部} - \text{後方頭部基準点})$$

r : 分子鎖の両端距離

$P(r)$: 分子鎖の両端距離が r となる確率密度関数

L : Contour Length、分子鎖を伸ばした時の最大長

l_p : Persistence length、分子鎖に沿った角度についての相関長

C : 正規化するための定数

なお、 $P(r)$ を計算する際に、1つの結合当たりの長さを炭素鎖では 0.13 nm、ペプチド鎖では 0.34 nm と仮定した。また、「基準点」は頭部と結合していないフリーのペプチド鎖が始まる最初の残基のことを意味し、結晶構造から以下のように見積もった。

- ・ C 末(ネックリンカー)で接続した DNA-キネシンでは
 - 前方頭部(ADP 結合状態、undock 状態): 324
 - 後方頭部(ATP 結合状態、dock 状態): 332
- ・ N 末で接続した DNA-キネシンでは
 - 前方頭部(ADP 結合状態、undock 状態): 9
 - 後方頭部(ATP 結合状態、dock 状態): 4
- ・ 頭部の途中で接続した DNA-キネシンでは、接続場所や頭部の状態に限らず
 $N_{\text{AminoAcid}} = 0$

本論文では、炭素鎖リンカー・ペプチド鎖共に persistence length を $l_p = 0.8$ nm と仮定して計算を行なった。正確に計算するためには、炭素鎖とペプチド鎖を分けて計算する必要があるが、またペプチド鎖も配列によって異なるはずであるが、本論文では単純化のため l_p はすべて同一の値を使用した。なお、ポリグリシン鎖、ネックリンカー配列、ポリプロリン鎖の l_p としては、0.8, 1.4, 4.4 nm という値が報告されている。 $P(r)$ は本来 3 次元の確率密度関数であるが、本論文ではキネシンの 1 次元

的な運動(前方または後方へのステップ)のみを扱うことから、確率密度関数を 1 次元での表式($P(r)/4\pi r^2$)に変換した(図 2-37 中段)。

さらに、DNA の長さも分布に加味した。r が正負の値を取るとして両側分布のカーブにした後、全体の分布を DNA の長さ分だけ平行にシフトさせることにより、DNA+バネ部分の両端間距離の確率密度関数を計算した(図 2-37 下段)。

浮いた頭部の結合サイトへのアクセス確率については、アクセス完了後の両足状態における頭部間距離において、確率密度関数がどれだけ高いかによって決まる。実際に確率を計算する際には、結合サイトの大きさを考え、その領域での積分値が確率となるが、今回はその領域の幅を 0.1 nm と仮定した(図 2-38A)。領域の幅で絶対値の大きさは変わるものの、コンストラクトによる確率の相違には変化はないことは確認した。

図 2-38B に、接続場所を 328 とした時の見積もりの結果の例を示した。後方頭部については 328 まで頭部に結合していることから、バネとして振る舞うのは炭素鎖のみである。一方、前方頭部は undock 状態を仮定しているため、324 - 328 の 4 アミノ酸についてはフリーなバネとして振る舞う。通常のキネシンではネックリンカー全体がフリーなペプチド鎖となるのと比較すると、フリーなペプチド鎖が短くなっており、解釈がしやすい要因にもなっている。328 の位置シフト量は 2 nm であることから、DNA+バネから成る接続部の長さが $8 - 2 = 6$ nm の近傍 0.1 nm に入る確率がアクセス確率となる。DNA 長を変えた時のアクセス確率の変化を図 2-38B に示したが、基本的には接続部の長さの分布と同じような形となる。

2-6-1-3) ネックリンカーにかかる張力 見積もり

WLC モデルを用いて、両足状態で頭部間にかかる張力の見積もりを行なった。アクセス確率の見積もりと同様に、引っ張られる接続部の長さや接続部がつなぐ 2 点間の距離によって決まるが、これらのパラメータは、基本的にアクセス確率の見積もりで使用したパラメータと同じ値を使用した。なお、同じコンストラクトでも、計算により得られる張力の値は仮定したパラメータにより変わってしまうことから、本研究では絶対値については議論せず、相対的な比較のみを行なった。

$$f(r) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4(1-x/L)^2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right] \quad (2-15)$$

k_B : ボルツマン定数

T : 温度

l_p : persistence length

L : Contour Length, ばね部分の最大長

D : 両足状態での頭部間距離

$x = D - L_{DNA}$, L_{DNA} : DNAの両端間距離

図 2-39 に、DNA 接続場所を 337、333、328 と変えた場合の頭部間張力の見積もりを示した。前節で計算したアクセス確率との相関を考えると、アクセス確率がピークになる点で頭部間張力はゼロになり、逆にアクセス確率が低いほど張力は大きくなる。328 は 337 や 333 と比較して張力変化が大きいことから、頭部間張力と運動性能の変化を見るには 328 が適していると考えられるため、後述の 2-6-2-2 では 328 に絞って評価を行なった。

2-6-2) 張力による速度・歩行距離変化

2-6-2-1) DNA 長変化による速度・歩行距離変化

2-4-5)にて、337 接続の DNA 二重鎖-キネシンについて DNA 長と運動速度・連続歩行距離の相関を確認したところ、DNA 長が長くなるほど歩行距離が短くなるが速度はほとんど変化しない、という相関が見られた。同様の相関を 333 や 328 についても確認した。運動確率が高めであったコンストラクト(333 は 6, 7, 8, 10 bp、328 は 6, 7, 8, 10, 15 bp の DNA-キネシン)について運動速度と連続歩行距離、滞在時間を測定した(図 2-40、2-41)。DNA 長との関係を見ると、337 と同様、333、328 とともに運動速度は DNA 長が変わってもほとんど変化しないが、歩行距離については DNA 長が長くなると短くなる傾向が見てとれる(図 2-42A)。

各コンストラクトの 6 – 10 bp での結果を用いて、前セクションで見積もった張力と運動速度の相関を見たところ、図 2-42B のようにほぼ直線状の分布となり接続場所の違いにかかわらず高い相関を示すことがわかった。この結果から、運動速度は接続場所の違い、つまり位置シフト量の大きさに依存しないことが示唆される。しかも、今回の結果を見ると張力が約 1 pN ~ 10 pN と大きく変化しているにも関わらず速度は 30%程度しか変化しておらず、運動速度は張力から受ける影響も小さいと考えられる。一方、連続歩行距離と張力に関しては、特に相関は見られな

かった。これは、連続歩行距離については接続場所の違い、特に docking による位置シフト量の大きさの違いに大きな影響を受けるためではないかと考えられる。2-5)で得られた位置シフト量が大きい接続場所ほど運動確率が高い、という結果もこの考察を支持する。

よって、これらの結果だけでは、頭部間張力が連続歩行距離に効いている、と結論付けることは難しい。

2-6-2-2) DNA 長変化による速度・歩行距離変化

前セクションの結果は、ネックリンカーの docking による位置シフト量の影響を排除できていなかったことから、頭部間張力の連続歩行距離に対する影響が明確にできなかった。そこで、DNA 二重鎖-キネシンの特徴を生かし、頭部との接続場所を変えることなくバネの部分のみを変更したコンストラクトを作製した。これにより、位置シフト量を変えることなく張力のかかり方を変えることができるため、張力の影響のみをより明確にすることができると考えられる。具体的には、炭素鎖の長さが異なるマレイミド化試薬である AMAS(C2)、EMCS(C6)、KMUS(C11)を用いた(図 2-43A)。接続場所としては、頭部に結合しないフリーのペプチド鎖の影響を最小限にするため、ネックリンカーの途中である 328 を選択した。これにより、炭素鎖の長さの違いの影響をより明確にできると考えた。

まず、3 種類の DNA 二重鎖-キネシンのアクセス確率を計算したところ、リンカーの違いによる衝突確率の違いは小さかった(図 2-43B)。頭部間距離を決める支配的な要因は DNA の長さであることから、バネ部分の長さが変わっても確率が最大となる DNA 長は同じになり、変化するのは分布の幅だけである。一方、頭部間張力の違いを見積もったところ、AMAS と KMUS で 1.5 - 3 倍程度の張力の差が生じた。以上から、狙い通り、他の要因への影響を最小限にしつつ張力のみを変えられることを確認できた。

まず運動確率を測定したところ、ピークの確率自体はリンカーによって大きく変わらなかったものの、リンカーによって確率がピークとなる DNA 長が異なり、リンカーが短いほどピークとなる DNA 長が長くなる傾向が見られた(図 2-44A)。これは、リンカーが短くて結合サイトにアクセスしづらくなった分を DNA 長が補完したためだと推測できる。逆にいうと、ピークより短い DNA 長での挙動については、頭部間張力よりもアクセス確率の影響が支配的であると推察される。そこで、頭部間張力の影響を見る際には、確率ピークより長い DNA の DNA 二重鎖-キネシンについてのみ着目した。

続いて運動速度と歩行距離の測定を行なった(図 2-44B、2-45)。具体的には AMAS については 8 - 10 bp、EMCS は 7 - 15 bp、KMUS は 6 - 10 bp のものにつ

いて定量を行なった。さらに、計算した頭部間張力との相関を見たところ、2-6-2-1)の結果と同様速度については張力との相関が小さかったものの、連続歩行距離については張力が弱くなるにつれ大きく減少し、張力は運動速度よりも連続歩行距離の方により影響することをはっきりと示すことができた(図 2-46)。この結果は、2-6-1)で説明した頭部間張力の制御方法に関する 2 つのモデルについて、抑制モデルが支配的であることを示している。

2-6-3) 頭部が張力を感じるメカニズムの探索

本節では、さらに DNA 二重鎖-キネシンの特徴を生かし、頭部間張力が頭部の状態を制御するキネシン頭部の構造的な要因についての検証を試みた。

2-5)において、ネックリンカーを介した頭部間張力が重要であることを示したが、一方 N 末でつないだ DNA 二重鎖-キネシンも運動できていることから、ネックリンカーほど影響が大きいにせよ、N 末も張力を検知し頭部間協調を生み出すことができるのではないかと推測することが可能である。つまり、張力を検知することができる部位はネックリンカーに限らないのではないかと考えられる。しかし、蛋白質ベースの手法では C 末であるネックリンカーと N 末(N 末はタンデム配列を利用すれば可能)を介した接続について調べるのが限界であった。そこで、接続場所を変えられるという DNA 二重鎖-キネシンの特徴を生かし、C 末、N 末以外のキネシン頭部の途中で接続した DNA 二重鎖-キネシンを利用して他の場所で張力が検知できるかどうかを調べた。ただし、2-5)でも見た通り、2 つの頭部ともキネシン頭部の途中でつないだ DNA 二重鎖-キネシンでは運動が見られなかったことから、本セクションでは片側を頭部の途中、もう片側を運動性能の高いネックリンカーで接続した、ヘテロ DNA 二重鎖-キネシンの運動を観察し、張力の影響の検証を行なった。具体的には、片側の頭部の接続場所を頭部の途中である 23, 43, 101, 215、およびネックリンカーの根元である 324、もう片側の接続場所を 337 としたコンストラクトを検証した(図 2-47)。

DNA 長が 6 – 25 bp のヘテロ DNA 二重鎖-キネシンの運動を観察したところ、ある DNA 長で一方向、ないし双方向と思われる運動が見られた。そこで、運動しやすさの大まかな把握のため、2-5-5)と同様の方法に双方向運動でも適用可能な運動確率の評価を行なったところ、確率ピークの DNA 長は異なるものの 5%程度の運動確率での運動が見られた(図 2-48)。次に運動の方向性を調べるため、各接続場所で運動確率がピークとなるコンストラクトについて、変位解析を行なった。その結果、ネックリンカーのつま先である 215 で接続したヘテロ DNA-キネシンを除き、変位が若干片側方向へ偏っていることが確認できた(図 2-49A)。さらに、23-337, 43-337, 101-337, 324-337 について平均二乗変位解析を行なったところ、C 末根元でつない

だ 324-337 は係数が 1.9 と予想通り一方向運動が見られたのに対し、頭部後方を接続した 23-337、43-337 ではそれぞれ 1.7, 1.6 と一方向運動に近いという解析結果になった。一方、頭部の頂上付近を接続した 101-337 は係数が 1.3 と拡散に近いことが判明した(図 2-49B)。これらの結果から、キネシン頭部の張力を受ける場所によって張力の感受性の違いがあることが示唆され、張力を頭部全体ではなくある特定のドメインで検知しているのではないかと推測される。特に、ネックリンカーの根元である 324 以外だと、頭部後方に位置する 23 や 43 のコンストラクトが比較的方向性のある運動を見せたことから、頭部後方のドメインが関わっている可能性が高いと考えられる。

一方、215 はつま先の部位であることから、215 が前方にある際に頭部と DNA が立体障害を起こして両足状態がとれない可能性もあり、215 の運動確率が低く図 2-49A のように微小管上での変位量も小さいのは、張力の感受性以外の要因である可能性も否定できない。より詳細な検証のためには、DNA 二重鎖-キネシンのステップの解析や光ピンセットを用いて直接頭部に負荷をかける、といった評価が必要であると考えられる。

2-7) 結果まとめ

本章では、DNA 二重鎖-キネシンを利用して、キネシン運動に対するネックリンカーの寄与の解明を目指した。

まず、ネックリンカーの2つの機能である、ネックリンカーの構造変化による位置シフト(レバーアームモデル)と、ネックリンカーを介した頭部間張力(拡散モデル)について、さまざまな場所を接続したDNA 二重鎖-キネシンの運動性能を比較することにより、一方向性の運動性能については位置シフトが運動に必須であることが示された。一方、ネックリンカーを介した張力は、運動自体に必須ではないものの、一方向性の運動を促進するファクターであり、キネシンがその運動能力を発揮し効率的に運動するためには不可欠な機能であることが示された。

次に、頭部間張力について頭部の結合・解離を制御するモデルとして「促進モデル」と「抑制モデル」が提唱されていたが、DNA リンカーを変えることでバネ部分のみの特性を変えたDNA 二重鎖-キネシンを利用し、頭部間張力のみの影響の検証することにより、「抑制モデル」が支配的であることを示した。

本研究では、DNA 二重鎖-キネシンのもつ、接続場所や長さを変えられるという特徴を生かすことにより、蛋白質ベースでは明らかにできなかった機構を検証することができた。これは、蛋白質の動作機構の研究においてDNA-蛋白質複合体というアプローチが有用である可能性を示している。

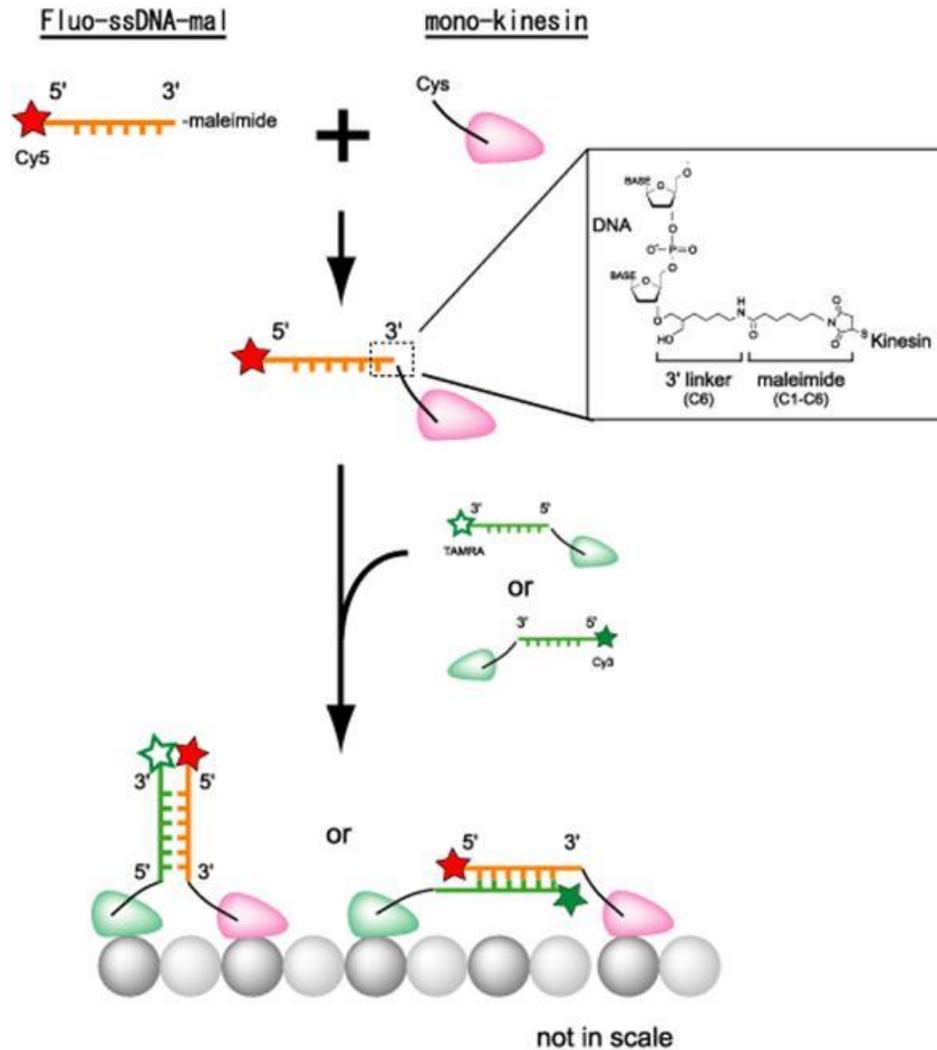


図 2-1 DNA 二重鎖-キネシン作製方法

DNA 二重鎖-キネシン作製の流れを示す。マレイミド化したオリゴ DNA をキネシンのシステインの部位に標識する。相補鎖の DNA をハイブリダイゼーションさせることにより、キネシン頭部を二つもった DNA 二重鎖-キネシンができる。色素とマレイミドを入れる端を入れ替えることにより、parallel(コイルドコイル置換型)と anti-parallel(ネックリンカー伸長型)の 2 つのコンストラクトができる。EMBO J.から転載許可を得て本著者論文より転載。

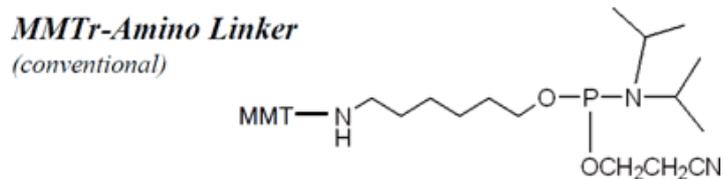
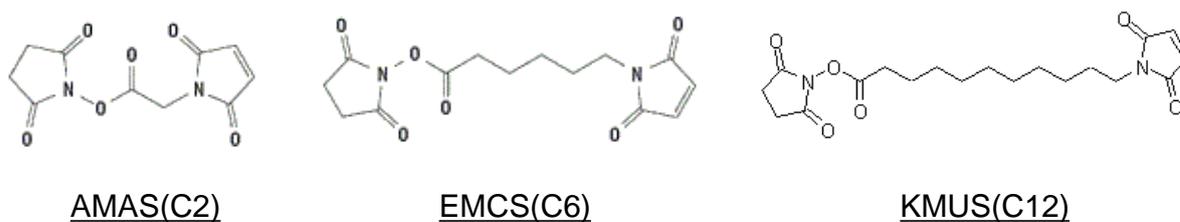
A**B**

図 2-2 アミノリンカーおよび架橋剤の構造式

A) DNA の端に導入したアミノリンカーの構造式。アミノ基と DNA の間に炭素鎖が挿入されている。B) 本研究で用いた架橋剤の構造式。炭素鎖をはさんで左側の環状構造が活性エステルで、右側がマレイミド基。(画像は Pierce 社、同仁化学社 HP より)

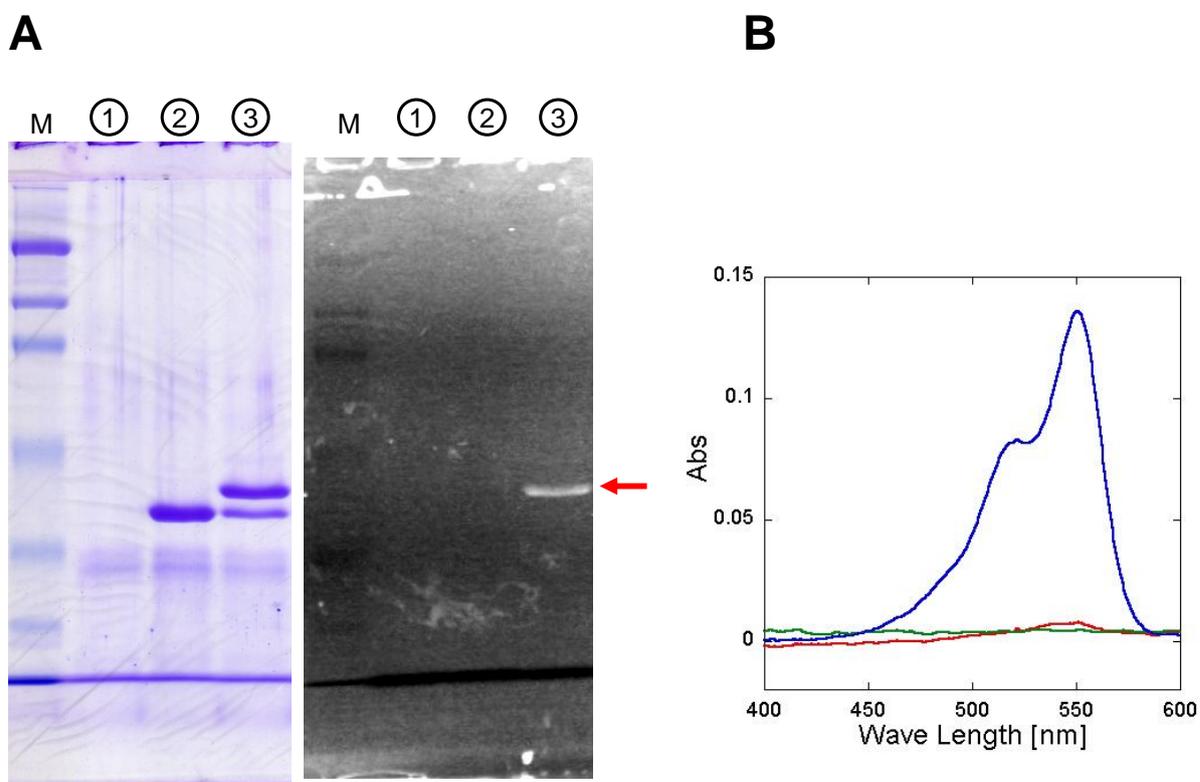


図 2-3 オリゴ DNA 精製チェック

①10 nt オリゴ DNA(5 μ M)、②K349CLM 342C(5 μ M)、③ 10nt オリゴ DNA(5 μ M) + K349CLM 342C(5 μ M)を CHROMA SPIN にかけたサンプルを、それぞれ (A)SDS-PAGE と(B)分光器で評価した。(A)SDS-PAGE10%で 30 分泳動した結果。(左側)CBBにより蛋白質を検出。(右側)Cy3 蛍光によりオリゴ DNAを検出。M のレーンは蛋白マーカー(Bio Rad 社、cat#161-0318)。矢印は DNA_キネシンと思われるバンド。(B) 赤:①、緑:②、青:③をそれぞれ 3 倍希釈したものの吸光度を計測したところ、フリーの DNA は CHROMA SPIN によりほとんど除かれていることが確認できた。

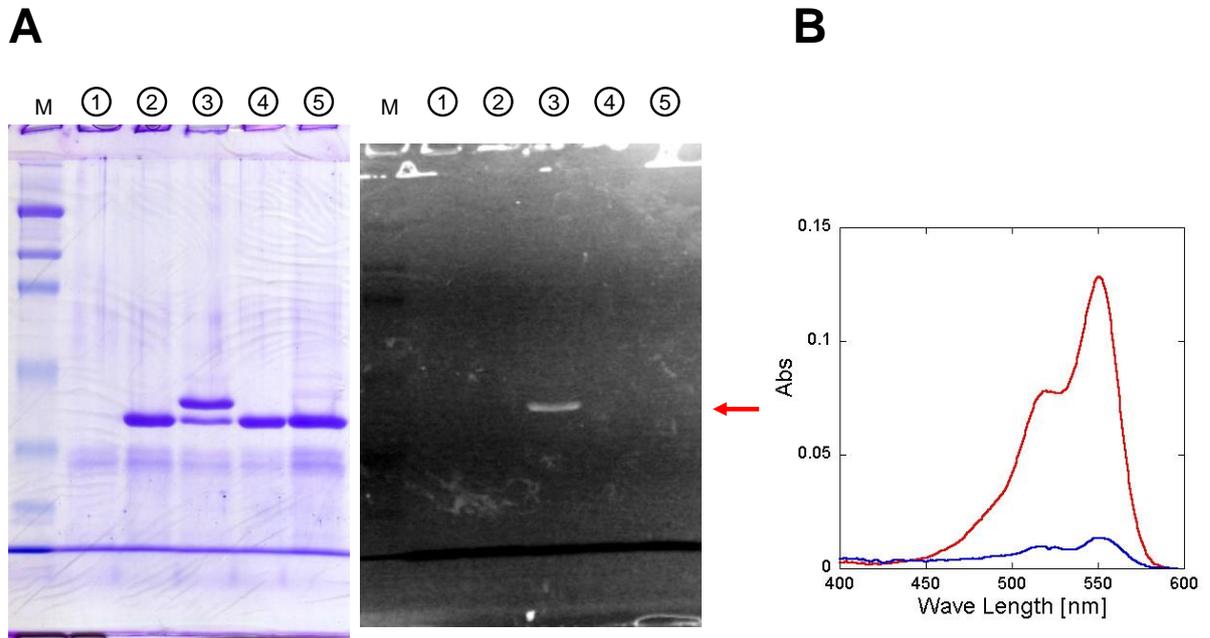
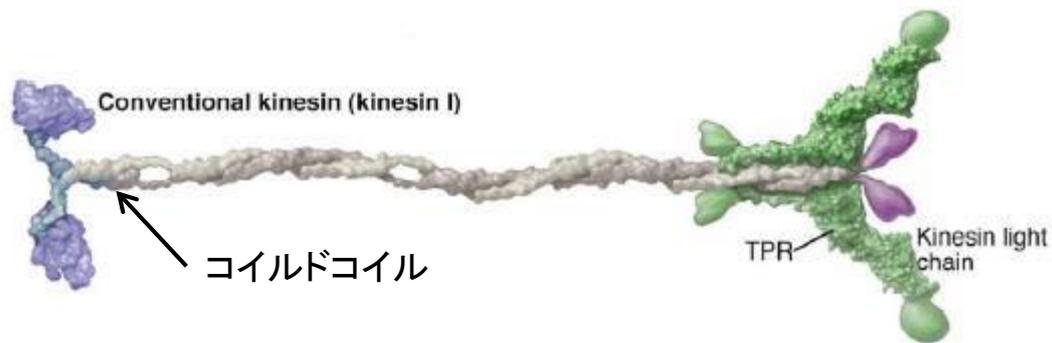


図 2-4 CLM 評価

①10 nt オリゴ DNA(5 μ M)、②K349CLM 342C(5 μ M)、③ 10 nt オリゴ DNA(5 μ M) + K349CLM 342C(5 μ M)、④ K349CLM(5 μ M)、⑤ 10 nt オリゴ DNA(5 μ M) + K349CLM(5 μ M)を CHROMA SPIN にかけてサンプルを、それぞれ(A)SDS-PAGE と(B)分光器で評価した。A)SDS-PAGE 10%で 30 分泳動した結果。(左側)CBB により蛋白質を検出。(右側)Cy3 蛍光によりオリゴ DNAを検出。矢印の DNA_キネシンと思われるバンドは③でははっきり現れているが、⑤では非常に薄い。B) 赤:③、青:⑤をそれぞれ 3 倍希釈したものの吸光度を計測したところ、⑤の吸光ピーク(0.0135@550 nm)は③(0.128)の 10 分の 1 程度になった。なお、③・⑤ともに、①の吸光度をフリーの DNA の吸光と見なして、差し引いた。

A



B

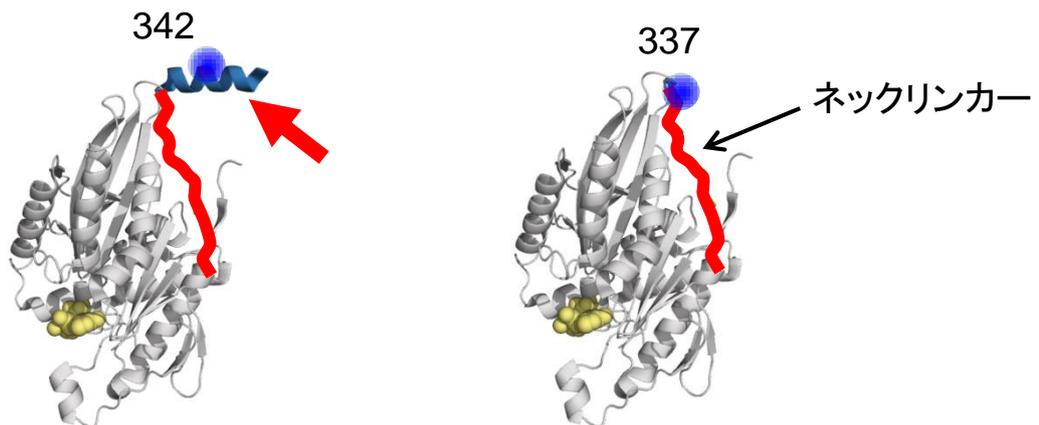


図 2-5 K349CLM と K336CLM

A) 野生型の全長のキネシン(再掲)。2つのモノマーがコイルドコイル部により合わさってダイマー化している。Vale 2003 より転載許可を得て転載。

B) K349CLM(左)と K336CLM(右)を頭部上面から見たもの(PDB : 1MKJ を改変)。代表的なシステイン導入位置として、342 と 337 の位置を合わせて示した。K349CLM は、残ったコイルドコイル部によるダイマー化等の副次的な影響が懸念されたため、本研究では主に K336CLM を用いた。

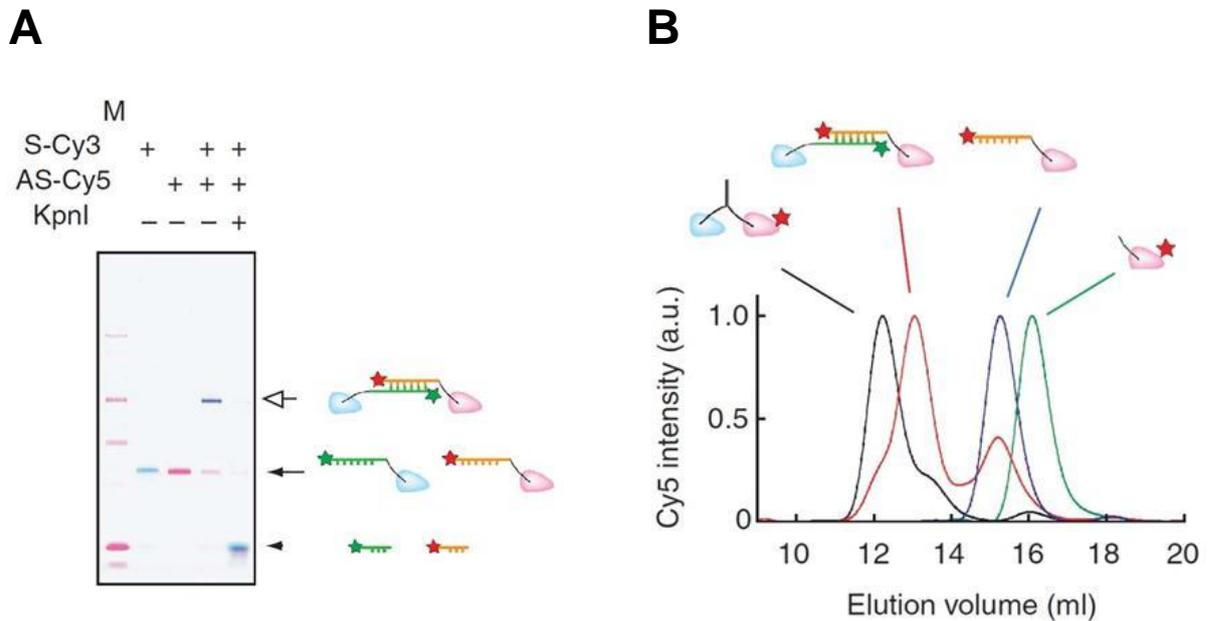


図 2-6 生化学的手法による DNA のハイブリの確認

A) ①:K336CLM 337C_20GS(Cy3 標識)単体、②:K336CLM 337C_20RA(Cy5 標識)単体、③K336CLM 337C_20GS と K336CLM 337C_20RA をハイブリさせたもの、④③に制限酵素 KpnI を加え 1.5h 反応させたもの、の 4 種類のコンストラクトを SDS-PAGE 10%で泳動した結果(Mはマーカー)。Cy3 蛍光像(水色)と Cy5 蛍光像(赤)を撮影して重ね合わせた(Cy3・Cy5 共にバンドがある場合は紫)。③のハイブリさせたレーンでは、①、②にはないダイマーと思われるバンドを確認できた。このバンドからは Cy3、Cy5 どちらの蛍光も検出されたことから、センス鎖とアンチセンス鎖の DNA-キネシンが結合したもののバンドであることがわかる。一方、④ではそのバンドが見られないことから、KpnI ですべて切断された、すなわちダイマーのバンドは DNA のハイブリによるものだと確認できた。B) ①K336CLM 337C_20RA 単体、②K336CLM 337C_20GS と K336CLM 337C_20RA をハイブリさせたもの、③ダイマーキネシン K490CLM 416C,100 nM)、④ monomer キネシン(K336CLM 337C, 100 nM)をゲルろ過カラムにかけた結果。検出は Cy5 の蛍光。②では 2 つピークが出て、分子量が大きい方は、③と④のピークの間であり、期待された分子量であった。また、分子量が小さい方のピークはアンチセンス鎖のみのピークとほぼ一致した。また、①において、②のダイマーと思われるピークの位置にほとんどシグナルが見られないことから、アンチセンス鎖同士のハイブリはほとんどないと思われる。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

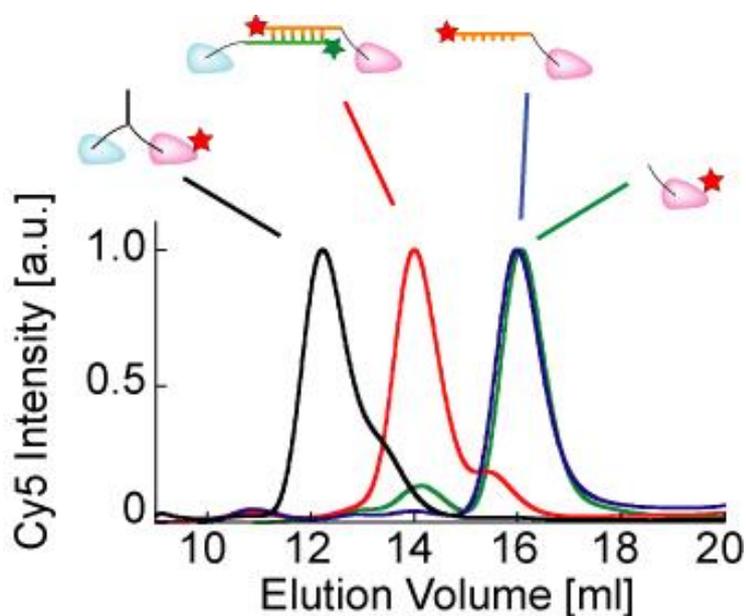
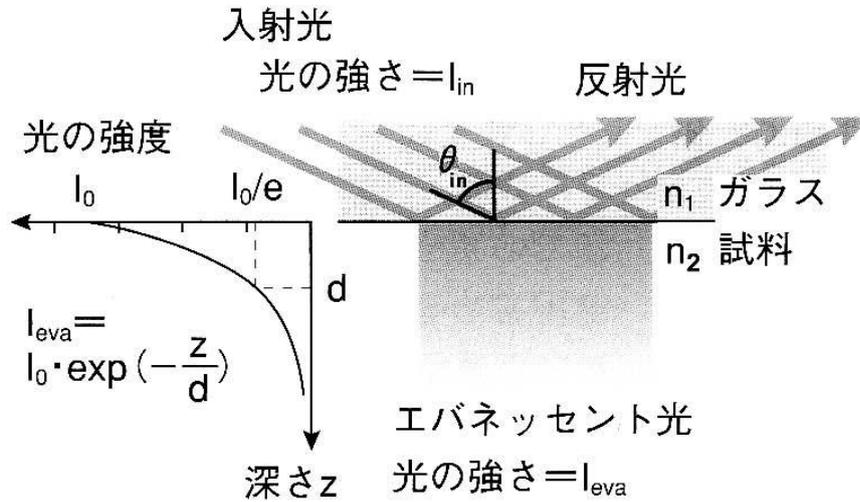


図 2-7 短い DNA を用いた DNA-キネシンのハイブリ確認

①K336CLM 337C_6RA 単体、②K336CLM 337C_6GS と K336CLM 337C_6RA をハイブリさせたもの、③ダイマーキネシン (K490CLM 416C, 100 nM)、④モノマーキネシン (K336CLM 337C, 100 nM) をゲルろ過カラムにかけた結果。検出は Cy5 の蛍光。②において、③と④のピークの間にはダイマーと思われるピークが観察されたため、6 bp の DNA-キネシンもダイマー化することが確認できた。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

A



B

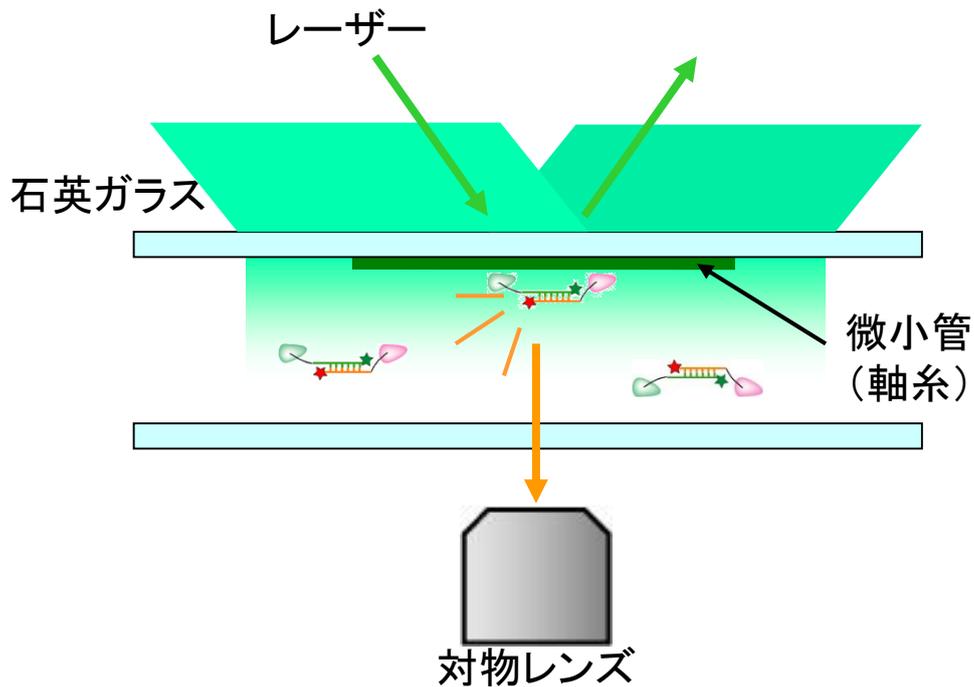


図 2-8 TIRF 顕微鏡

A) エバネッセント場の模式図。実験医学 別冊”バイオイメージングでここまでわかる”より改変。B) 観察セルの概要。全反射照明により、石英ガラス表面に吸着した軸系上を歩くキネシンのみを S/N よく観察できる。

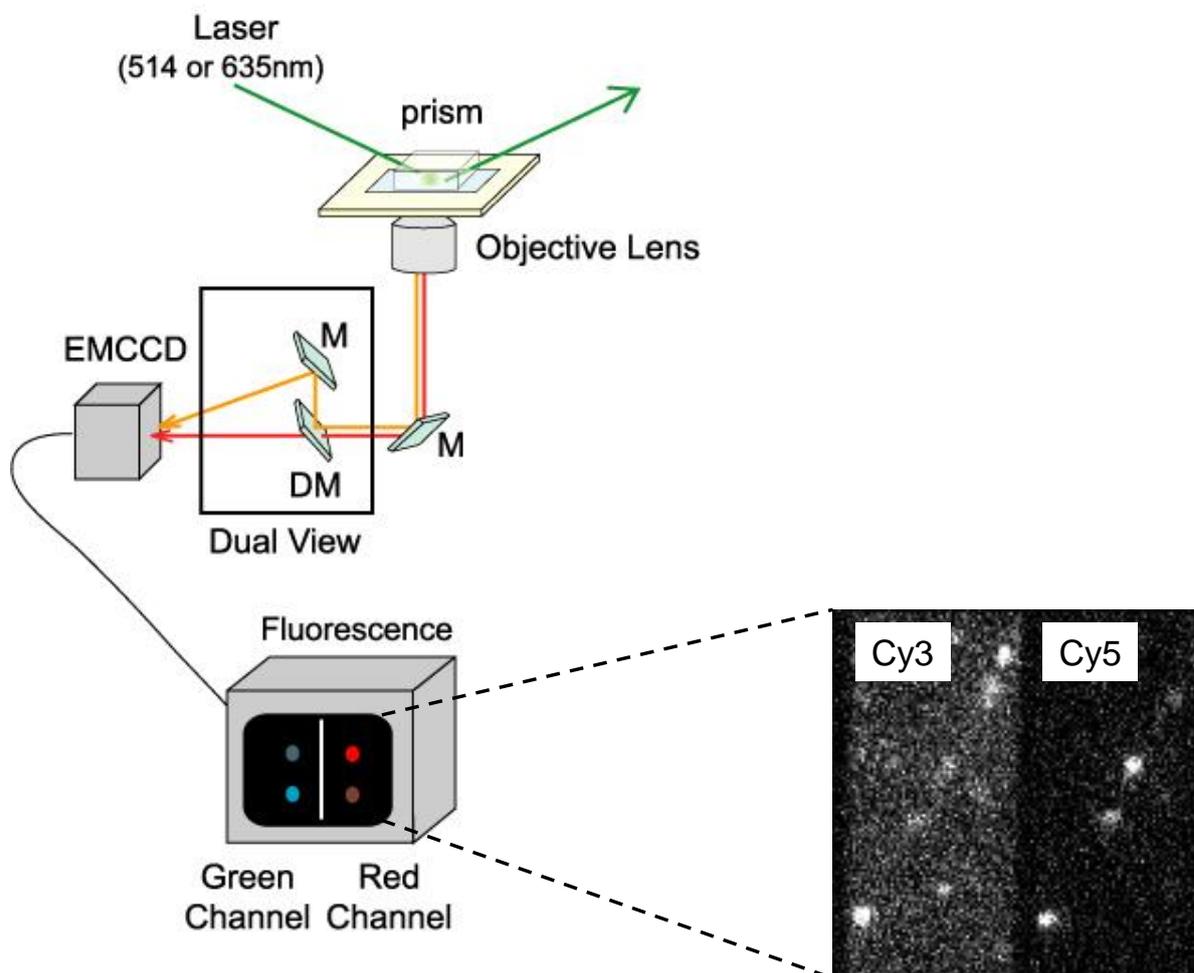


図 2-9 用いた光学系測定装置

用いた光学系測定装置の概要。TIRF 顕微鏡に EMCCD を組み合わせて撮影した。センス鎖・アンチセンス鎖がハイブリしてダイマー化した DNA 二重鎖-キネシンのみを観察するため、Dual View を使って 2 波長の光(Cy5 蛍光、Cy3 蛍光)を同時に観察した。

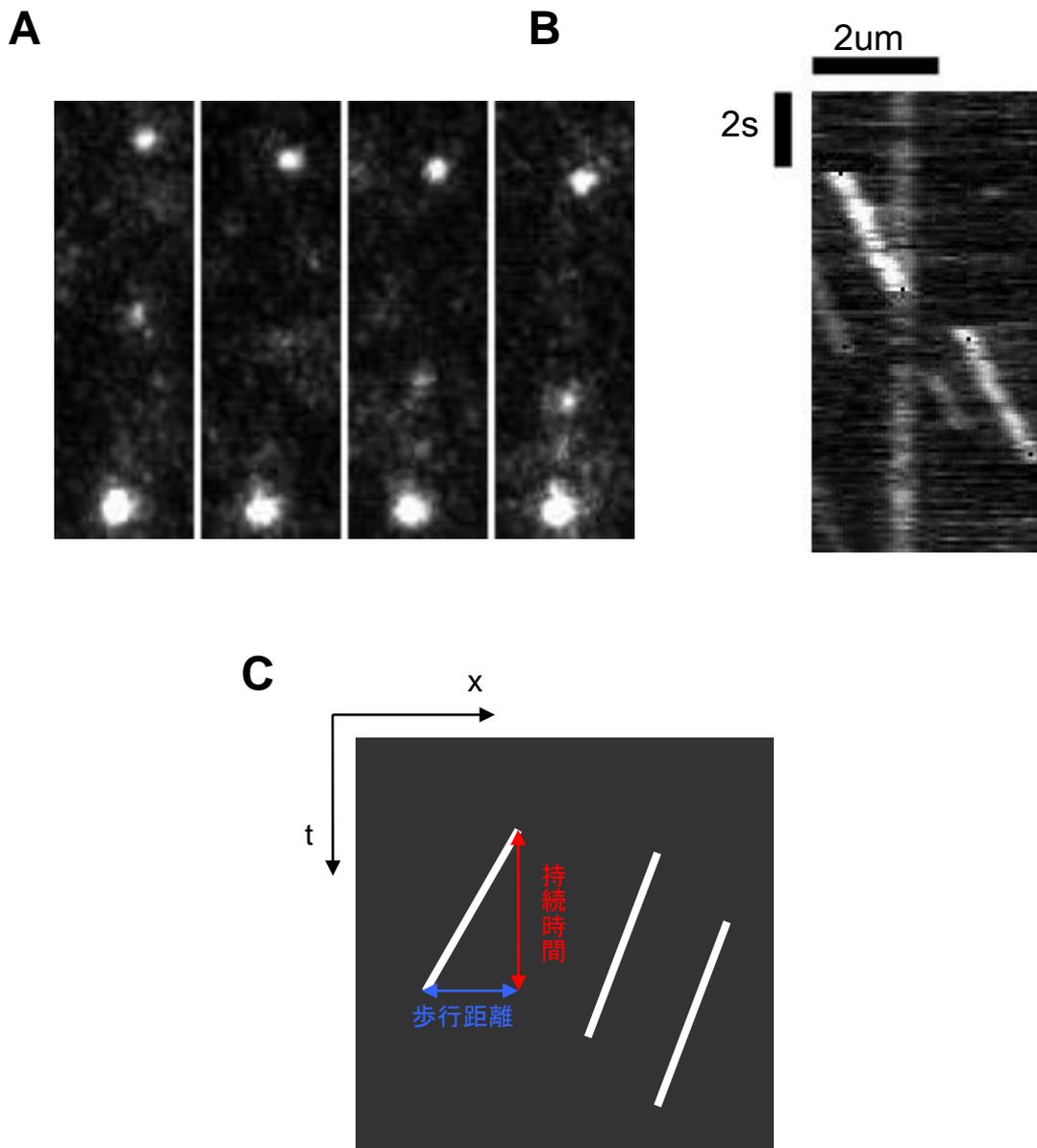


図 2-10 運動速度および連続歩行距離の定量

A)キネシンの観察像。左から順に 0.5 秒ごとの画像。輝点一つ一つが蛍光 1 分子からの発光を表しており、赤い矢印を付けた輝点が時間とともに上から下に軸系にそって移動している。 B)キネシンの運動のカイモグラフ。横軸が微小管上の距離、縦軸が時間を表す。 C)カイモグラフによる速度の測定法。持続時間はモーター蛋白質が軸系から離れずに移動した時間。速度は、 $[\text{速度}] = [\text{歩行距離}] / [\text{持続時間}]$ で与えられる。

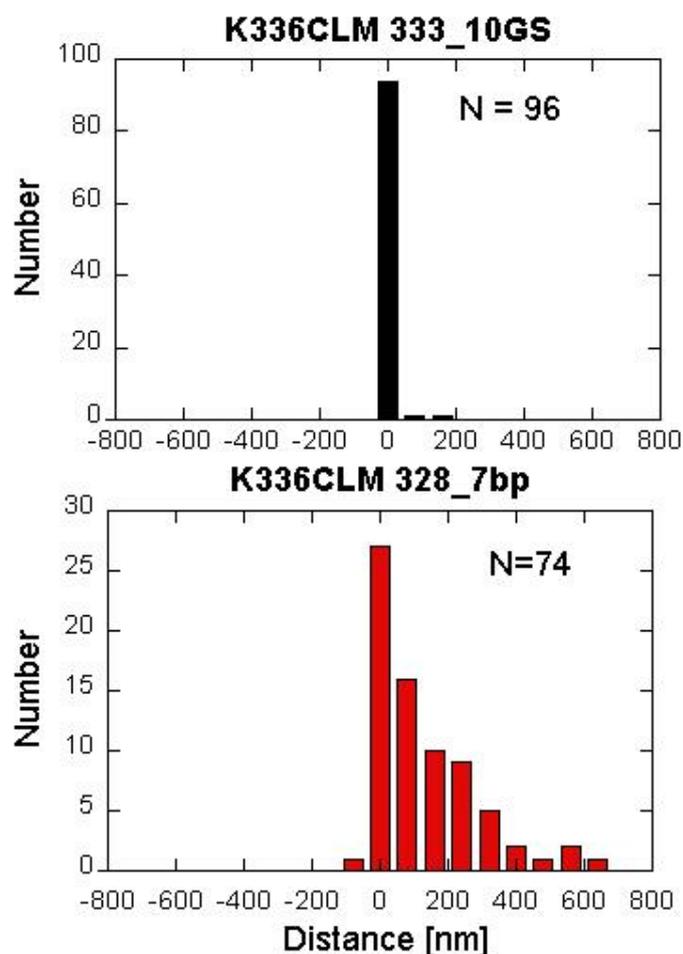


図 2-11 変位解析の妥当性検証

モノマーである K336CLM 333_10GS(上)とダイマーである K336CLM 328_7bp(下)の変位解析結果。横軸は変位、縦軸は各変位を示した分子の数。微小管上に滞在する時間の短いモノマーでは 95%以上の分子は変位なしであったのに対し、一方向運動を行なうダイマー(連続歩行距離:200 nm)では+方向に偏った分布が見られたことから、変位解析により一方向運動を検出できると考えられる。EMBO J.より改変。転載許可を得て本著者論文より転載。

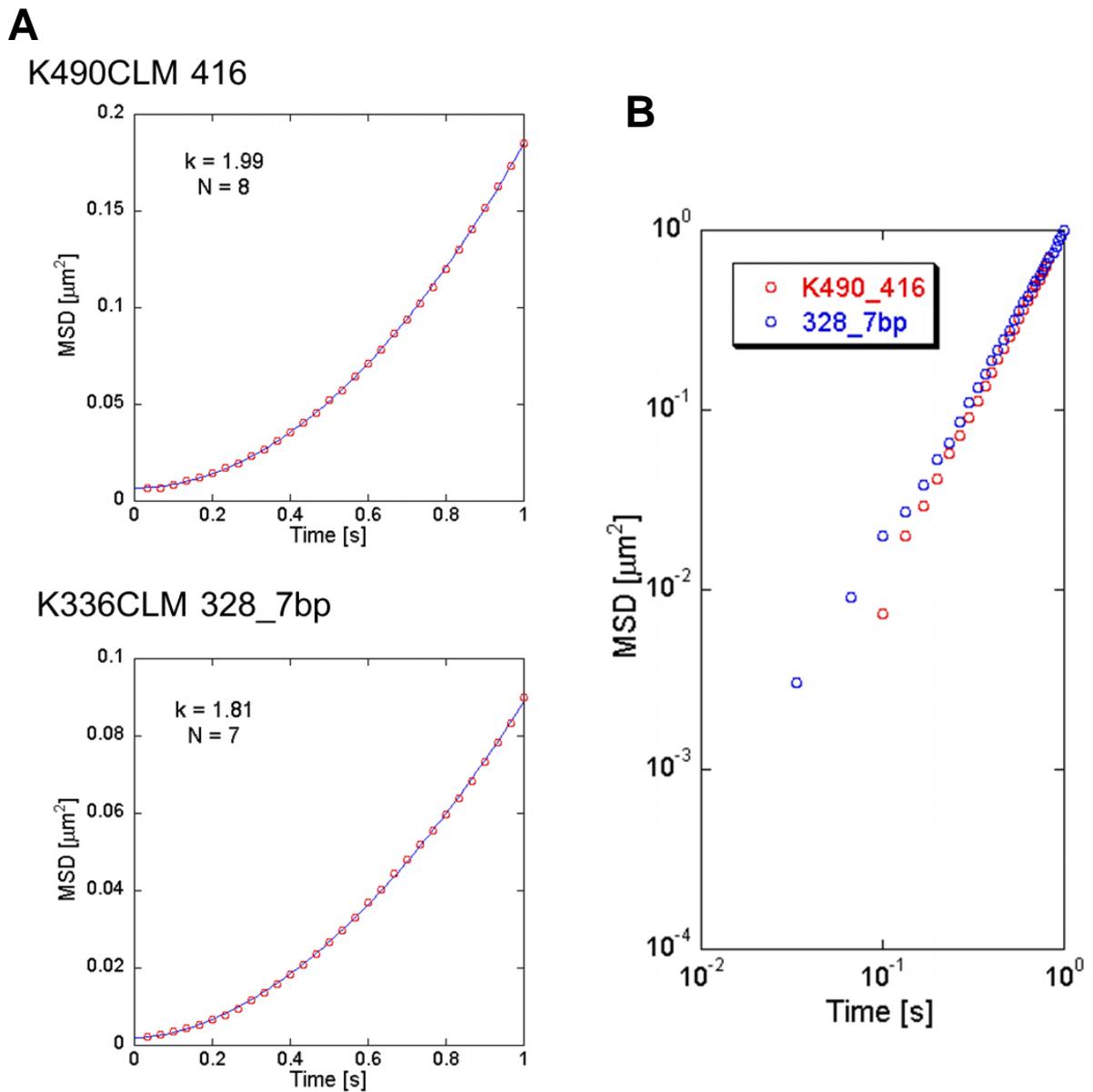


図 2-12 平均二乗変位解析の妥当性

A) 野生型キネシンである K490CLM 416 と DNA 二重鎖-キネシンである K336CLM 328_7bp の平均二乗変位の測定結果と(2.6)式によるフィッティング結果。横軸はある時間幅 Δt 、縦軸は Δt の間における分子の変位 x を二乗したものの、全区間・全分子での平均 $\langle x^2 \rangle$ を表わす。B) A)の2つの軸を対数プロットしたもの。傾きが係数 k に対応する。野生型キネシン、DNA 二重鎖-キネシンとも k が2に近くなり、一方向運動を検知できることが確認できた。

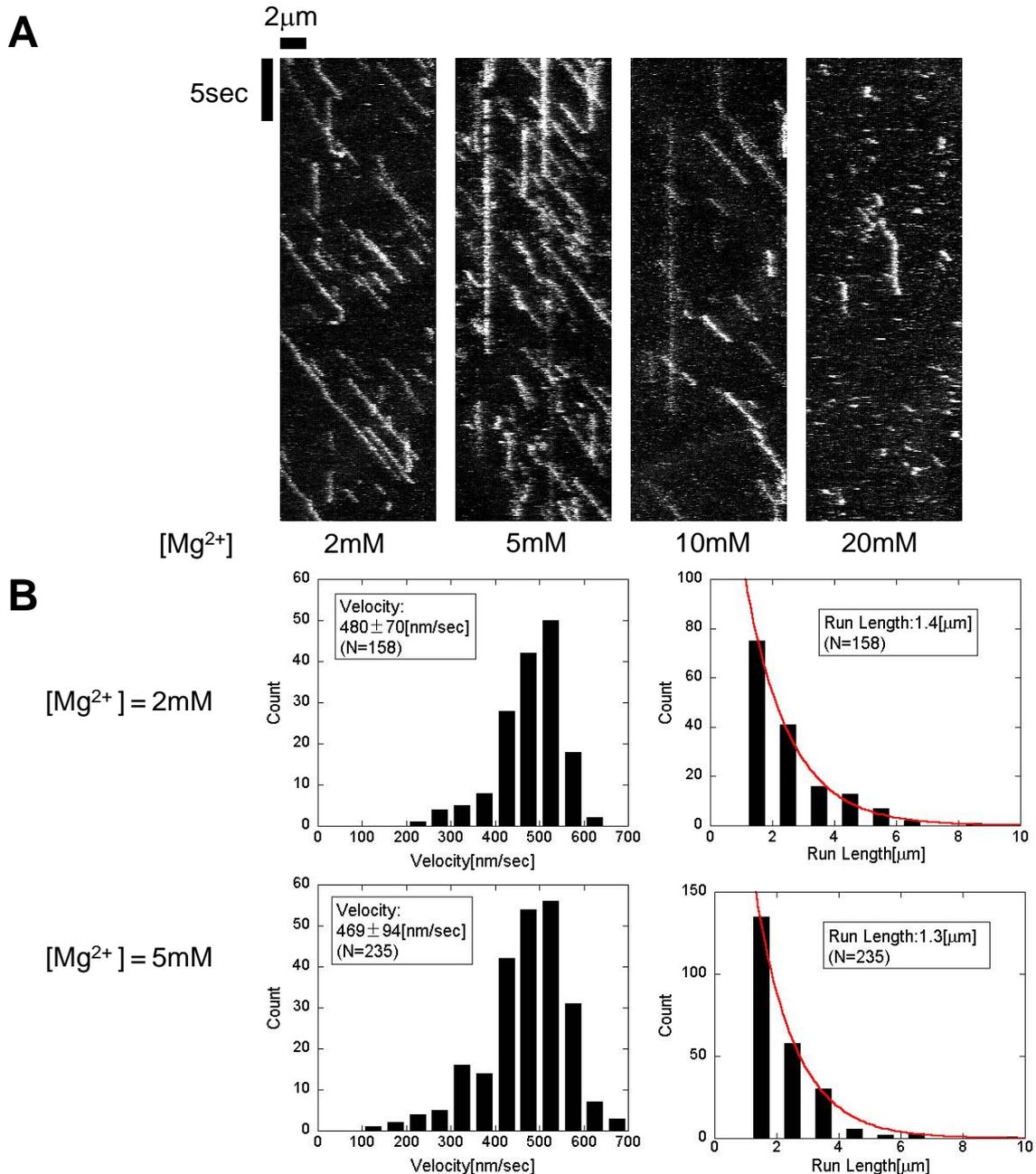


図 2-13 Mg²⁺濃度によるキネシン活性変化

A) Mg²⁺濃度を 2 - 20 mM で変化させた時の、野生型キネシン K490CLM 416 の運動の様子を表したカイモグラフ。514 nm 励起、10 fps で撮影。動速度(=傾き)は Mg²⁺濃度により変化せず、連続歩行距離(=横幅)は 20 mM の時に、短くなっていることが見てとれる。

B) [Mg²⁺] = 2 mM および 5 mM の時のキネシンの速度と歩行距離の分布。連続歩行距離が 1 μm 以下(= 16 pixel 以下)の分子は除外し、歩行距離は積分形の single exponential でフィッティングした。

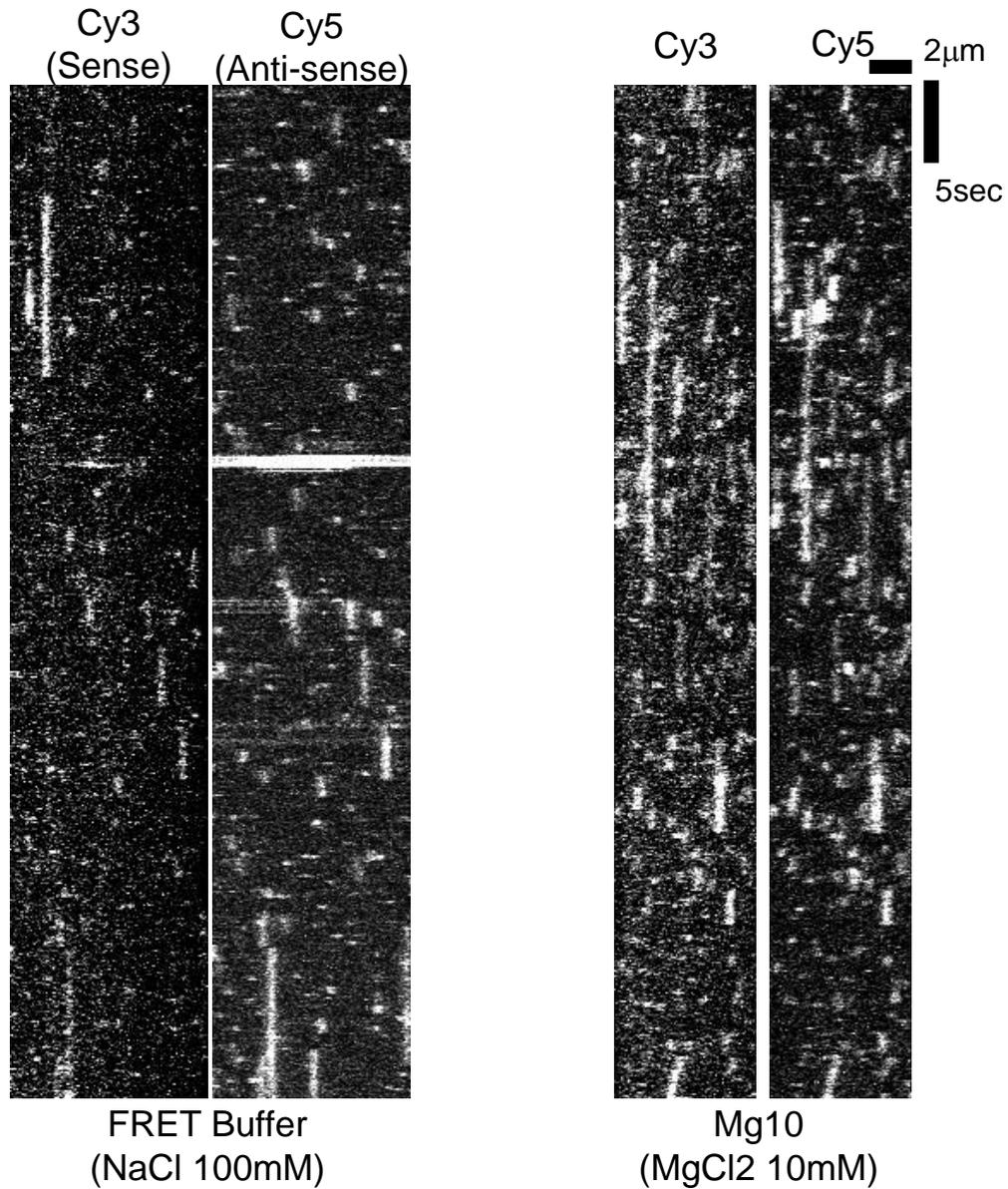


図 2-14 ハイブリ時の溶液条件の検討

左から、FRET Buffer、Mg10(BRB12 溶液ベースに MgCl_2 濃度のみ 10 mM に上げたもの)条件下でハイブリさせた、DNA 二重鎖-キネシン K349CLM 342_20bp のカイモグラフ。514 nm 励起、10 fps で撮影。一致して Cy3 と Cy5 が光る分子の数(Axoneme1 本、観察時間 1 分当たり)が、条件 1 では 15 分子に対し 条件 2 では 48 分子、さらに、一致する分子の割合[=一致する輝点数/(Cy3+Cy5 の輝点数)]が、条件 1 では 34%なのに対し 条件 2 では 61%と高かった。

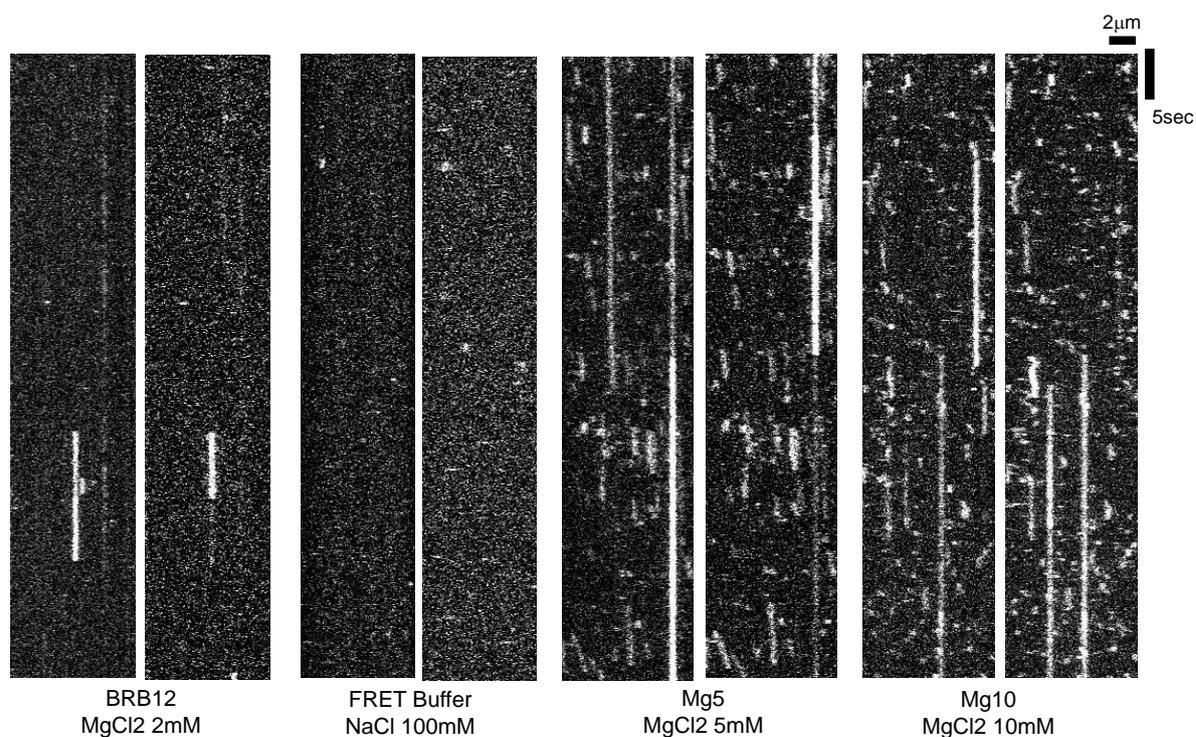


図 2-15 観察時の溶液条件の検討

左から、BRB12、FRET Buffer、Mg5(BRB12 溶液ベースに MgCl_2 濃度のみ 5 mM に上げたもの)、Mg10(同じく MgCl_2 を 10 mM に上げたもの)条件下で観察した、K349CLM 342_20bp のカイモグラフ。514 nm 励起、10 fps で撮影。Mg5 と Mg10 で結合する分子が多数見られた。Mg5 の方が Mg10 より運動する分子が見られ、微小管へ結合した分子の平均滞在時間が Mg5 では 1.5 s、Mg10 では 0.6 s と長かった。

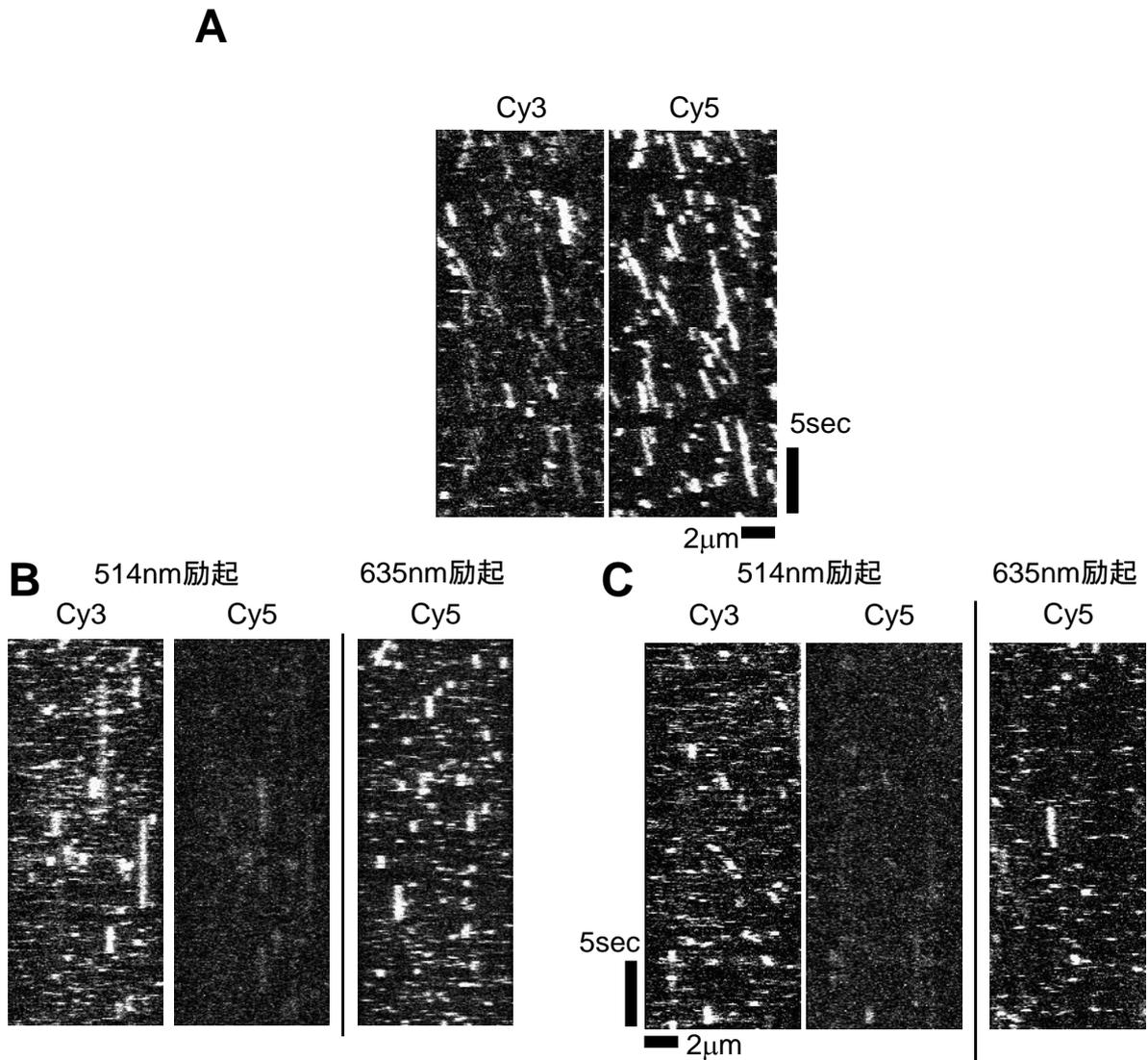


図 2-16 DNA 二重鎖-キネシンは相補鎖同士で結合する

A) センス鎖とアンチセンス鎖をハイブリさせたもの。 B)センス鎖同士、C)アンチセンス鎖同士をハイブリさせた DNA 二重鎖-キネシンのカイモグラフ。B と C に関しては、同じ配列で Cy3 標識の DNA と Cy5 標識の DNA を合成してそれぞれ DNA-キネシンを作製し、ハイブリ条件においた。514 nm 励起、10 fps で撮影。FRET を起こす分子が A と比べて少ない。右側のカイモグラフは同じ軸系を 635 nm レーザーで励起し、Cy5 の蛍光を直接励起して観察したもの。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

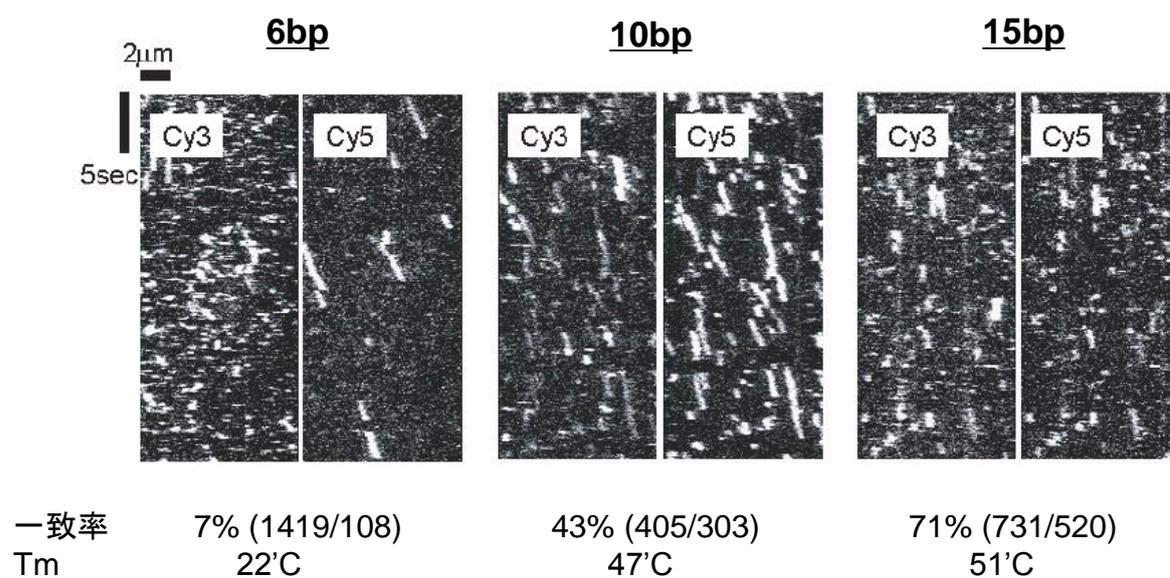


図 2-17 塩基数が増えると一致率は増加する

カイモグラフは、514 nm 励起、10 fps で撮影。塩基数を増やしていくと、一致率、FRET 効率、運動性能共に変化しているのが見てわかる。DNA 長が長くハイブリの安定性が高いほど(Tm が高いほど)、一致率が高いことが確認できた。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

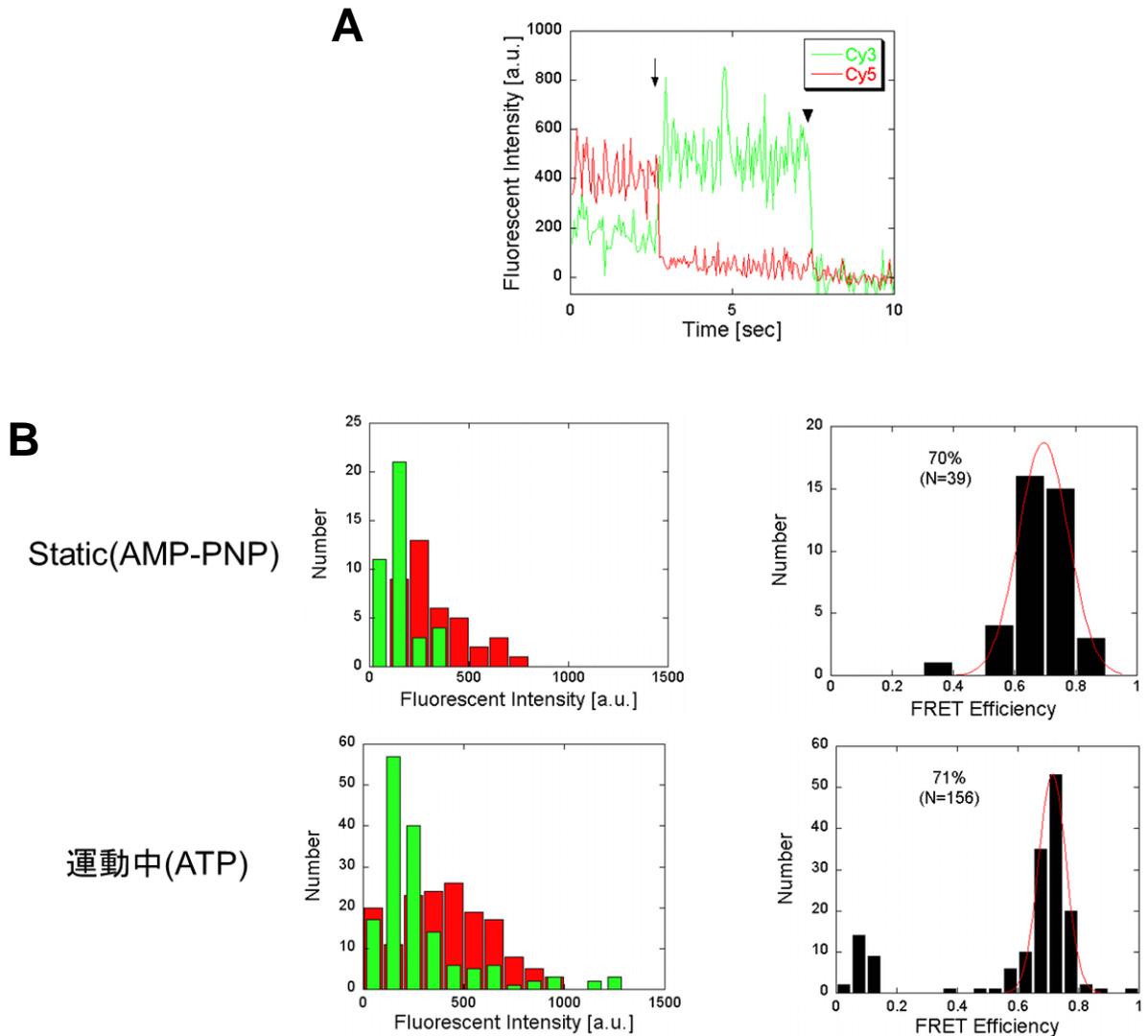


図 2-18 運動中のハイブリッドナノマシンは 1 分子で運動している

A) FRET を起こした分子の蛍光強度の時系列データの例。緑: Cy3、赤: Cy5。一つ目の矢印でアクセプターの Cy5 が退色し、ドナーの Cy3 の蛍光が復活している (Anti-correlation)。二つ目の矢印で Cy3 が退色している。退色がどちらも一段階で起きていることから、Cy3 と Cy5 が 1 分子ずつを観察していることがわかる。B) 左: 緑: Cy3、赤: Cy5 の FRET 中の蛍光強度分布。右: 蛍光強度より算出した FRET 効率の分布。平均の FRET 効率は、分布を正規分布でフィッティングすることにより求めた。上段は AMPNP、下段は ATP 条件下。蛍光強度と FRET 効率共に、AMPNP、ATP で同程度の値になった。どちらも同じ励起条件、フレームレート(514 nm、2 mW、20 fps)で撮影した事から、この結果は、運動している分子は 1 分子であることを示していると考えられる。

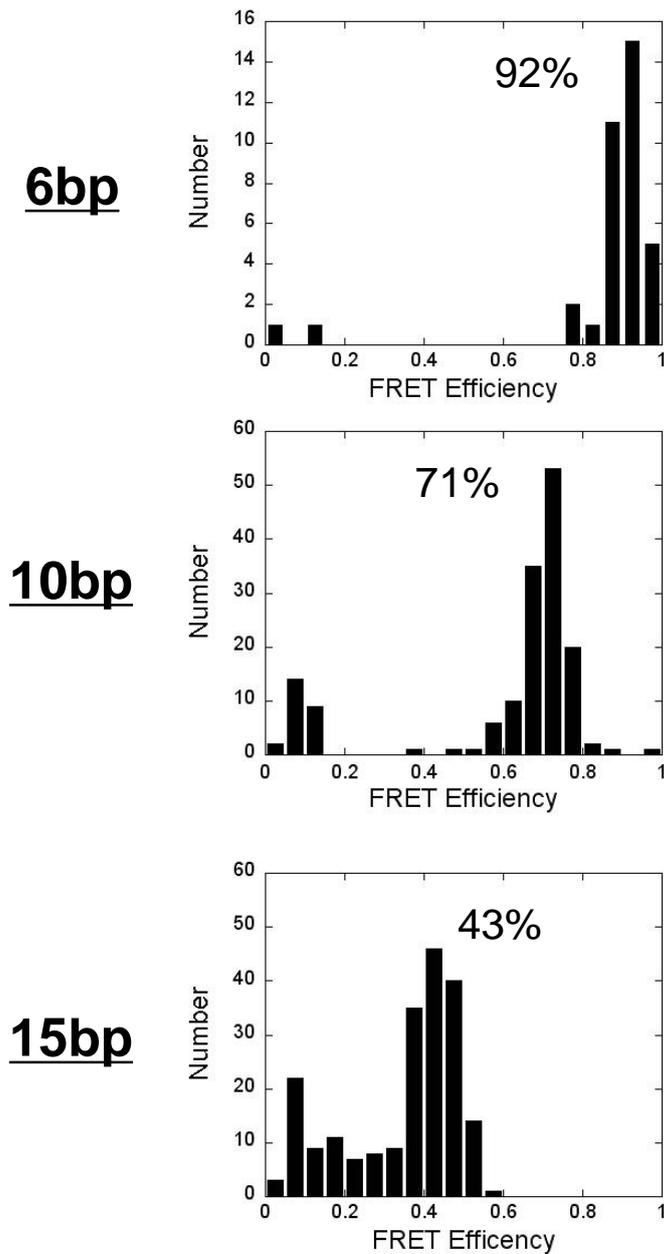


図 2-19 二重鎖 DNA の長さにより FRET 効率は変化する

上から K336CLM 333C_6bp、10bp、15bp のコンストラクトの FRET 効率。6 bp、10 bp は 2 pixel (= 160 nm) 以上動いたと思われる分子、15 bp は 10 frame (= 0.5 s) 以上滞在したすべての分子に関して計測した。平均の FRET 効率は、分布を正規分布でフィッティングすることにより求めた。DNA が螺旋構造をとっていると仮定した時の色素間距離と FRET 効率より算出した色素間距離がおおよそ一致することから、ハイブリした DNA はおおむね螺旋構造をとっていることが確認できた。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

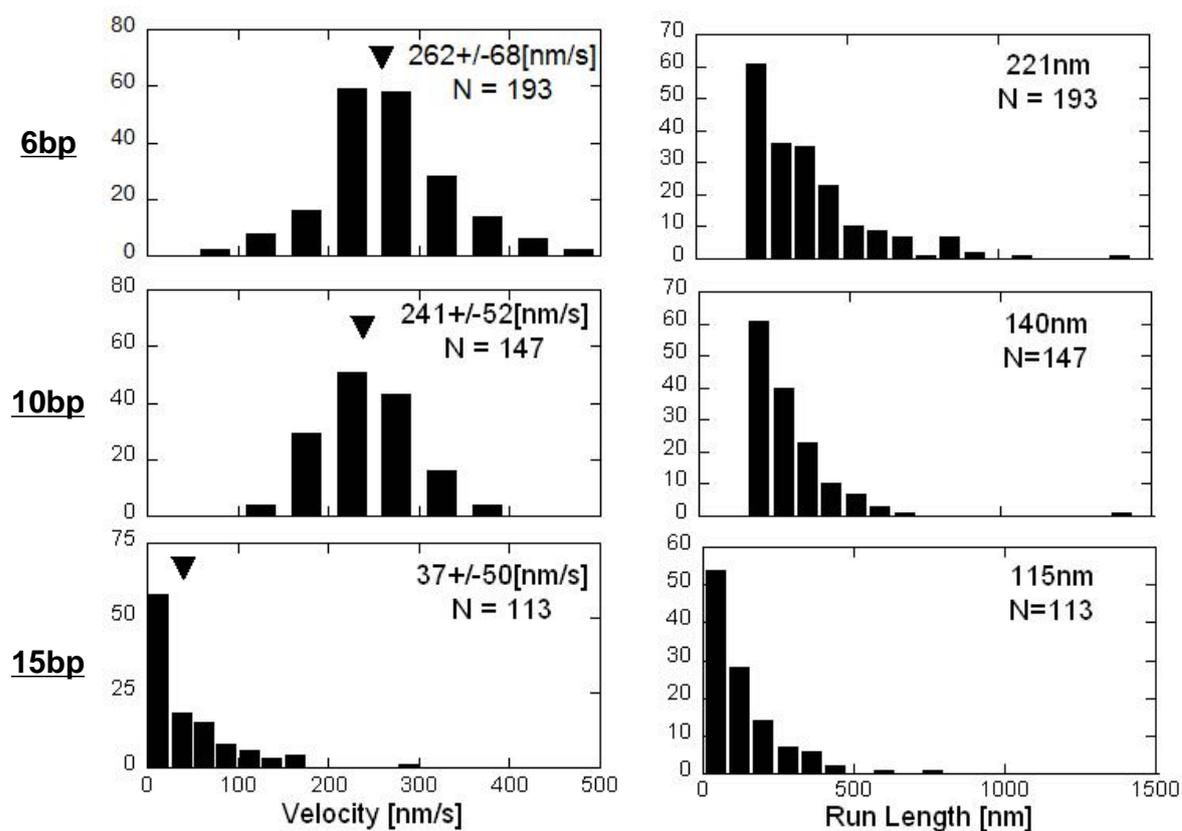


図 2-20 DNA の長さにより DNA 二重鎖-キネシンの運動性能は変化する

左側は運動速度、右側は歩行距離。上から、K336CLM 333C_6bp、10bp、15bp。平均歩行距離は積分形の single exponential でのフィッティングにより求めた。

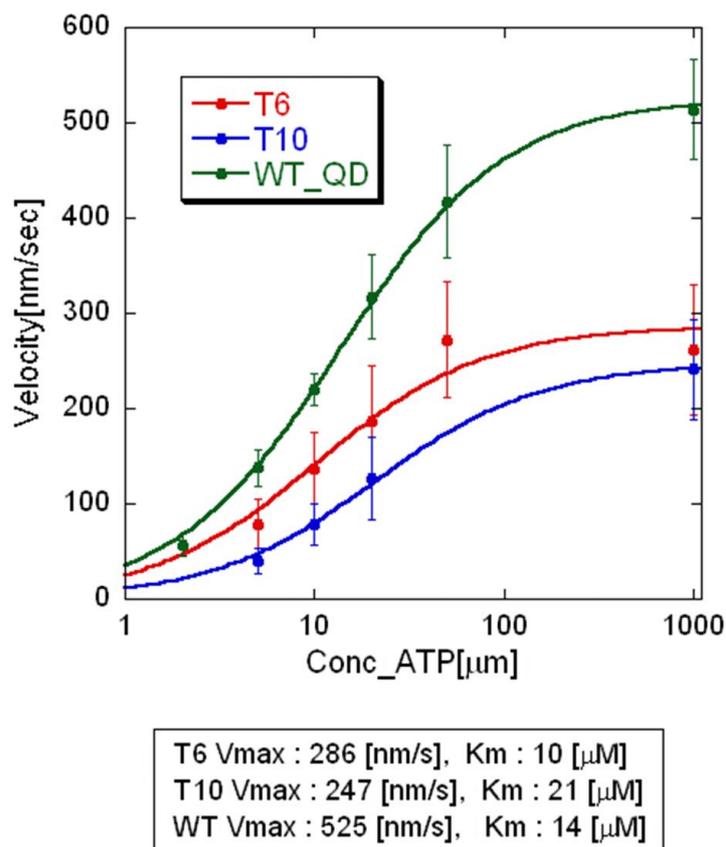


図 2-21 DNA 二重鎖-キネシンの運動性能は ATP 濃度依存

6bp_K336CLM 333C と 10bp_K336CLM 333C の速度の ATP 濃度依存性。赤：6bp_K336CLM 333C、青：10bp_K336CLM 333C、緑：野生型。ともにミカエリス・メンテン型の振る舞いを示した。

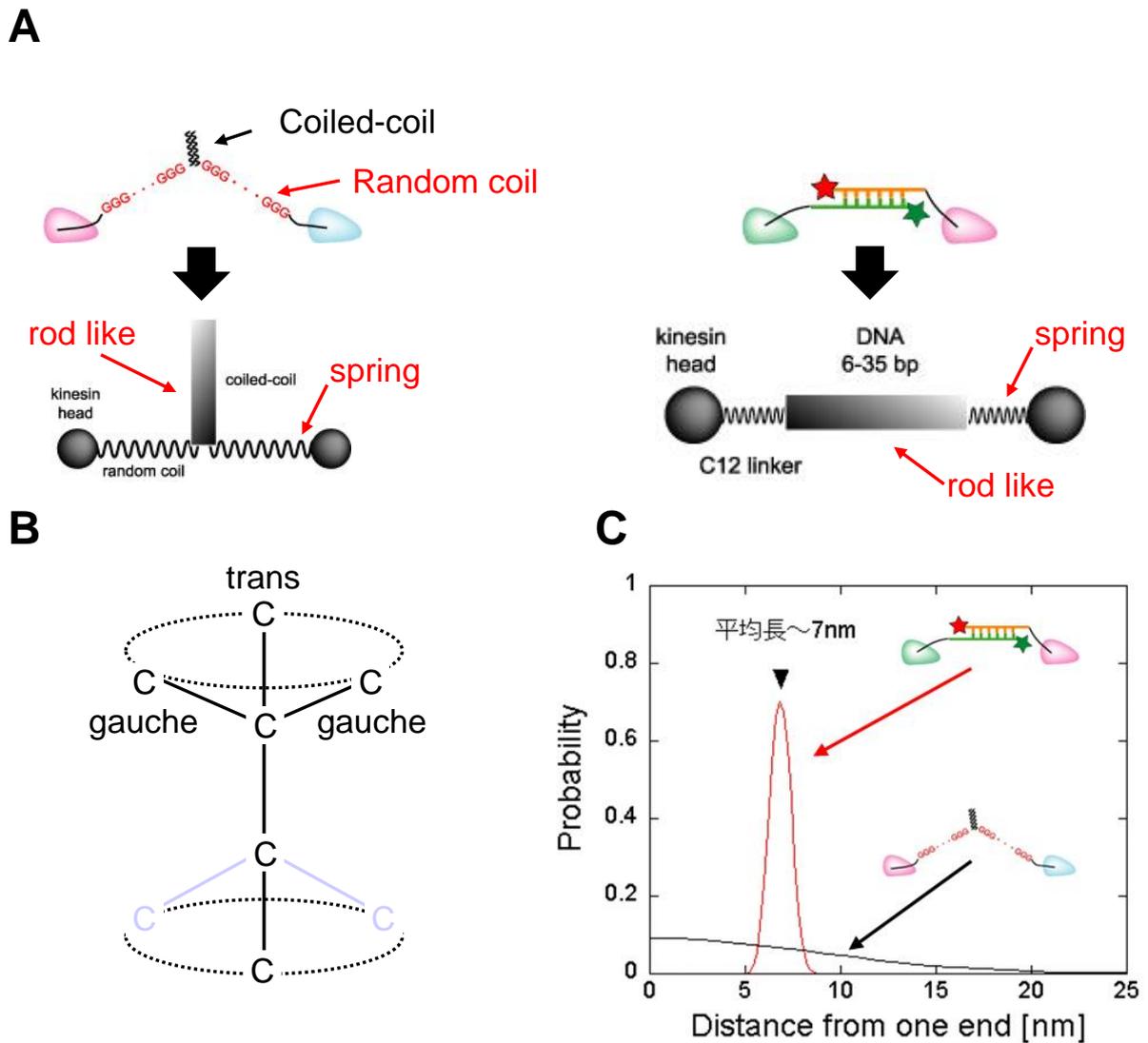
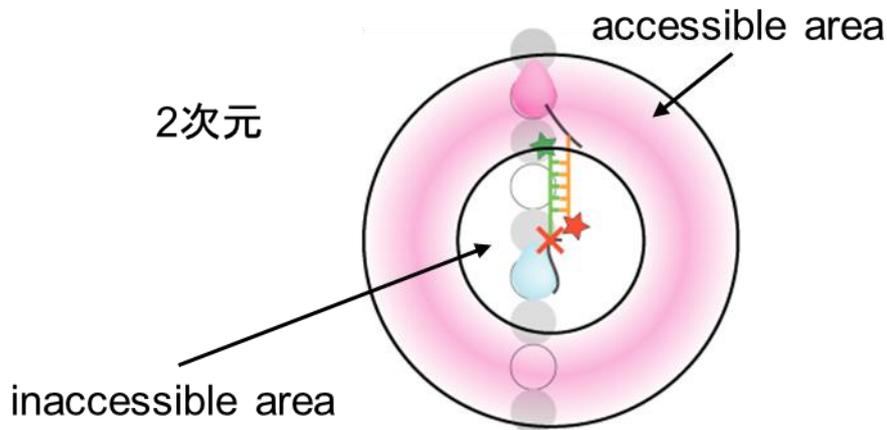


図 2-22 挿入部の末端間距離

A) 左: polyG、右: ネットリンカー伸長型 DNA 二重鎖-キネシンの力学的模式図。DNA は硬い棒、炭素鎖やポリペプチド鎖はバネと見なした。B) trans 型と gauche 型の炭素原子の配置。実際の炭素鎖では、立体的な重なりが少ない trans 型をとりやすく、また角度も連続的な分布をとるが、本研究では、3 つの離散的状態を等確率でとると仮定した。C) 20 bp DNA + 炭素鎖リンカー と 100 残基ポリペプチド鎖の挿入部の末端間距離の分布。平均距離は同程度だが、広がり大きく異なる。縦軸は、積分して 1 になるように規格化した。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

A



B

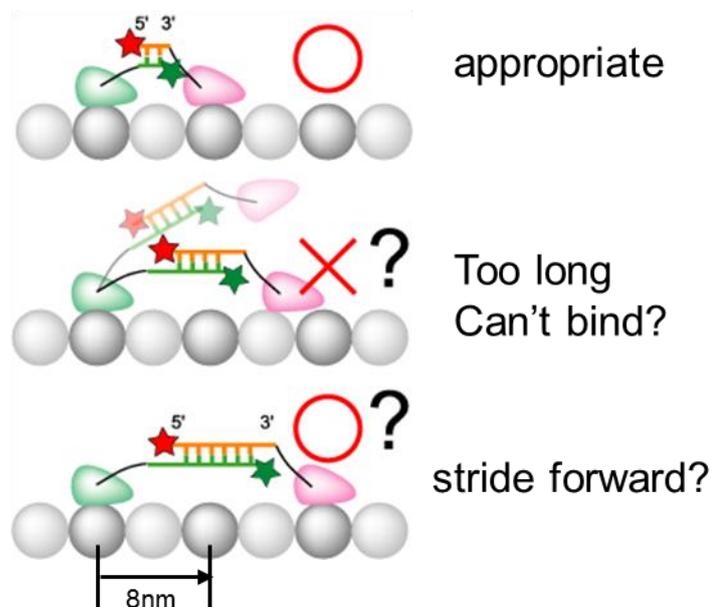


図 2-23 キネシン頭部が拡散できる範囲はドーナツ状になる

A) 浮いた頭部の拡散できる範囲を二次元平面上で示した概略図。中心付近は拡散できず、そのまわりにドーナツ状に拡散範囲が分布すると考えられる。スケールは計算結果を反映したものではない。 B) DNA の長さを変えたときの、予想される DNA 二重鎖-キネシンの運動。拡散範囲内に β -tubulin が存在するかどうかにより、運動できるかどうかが決まると予想される。

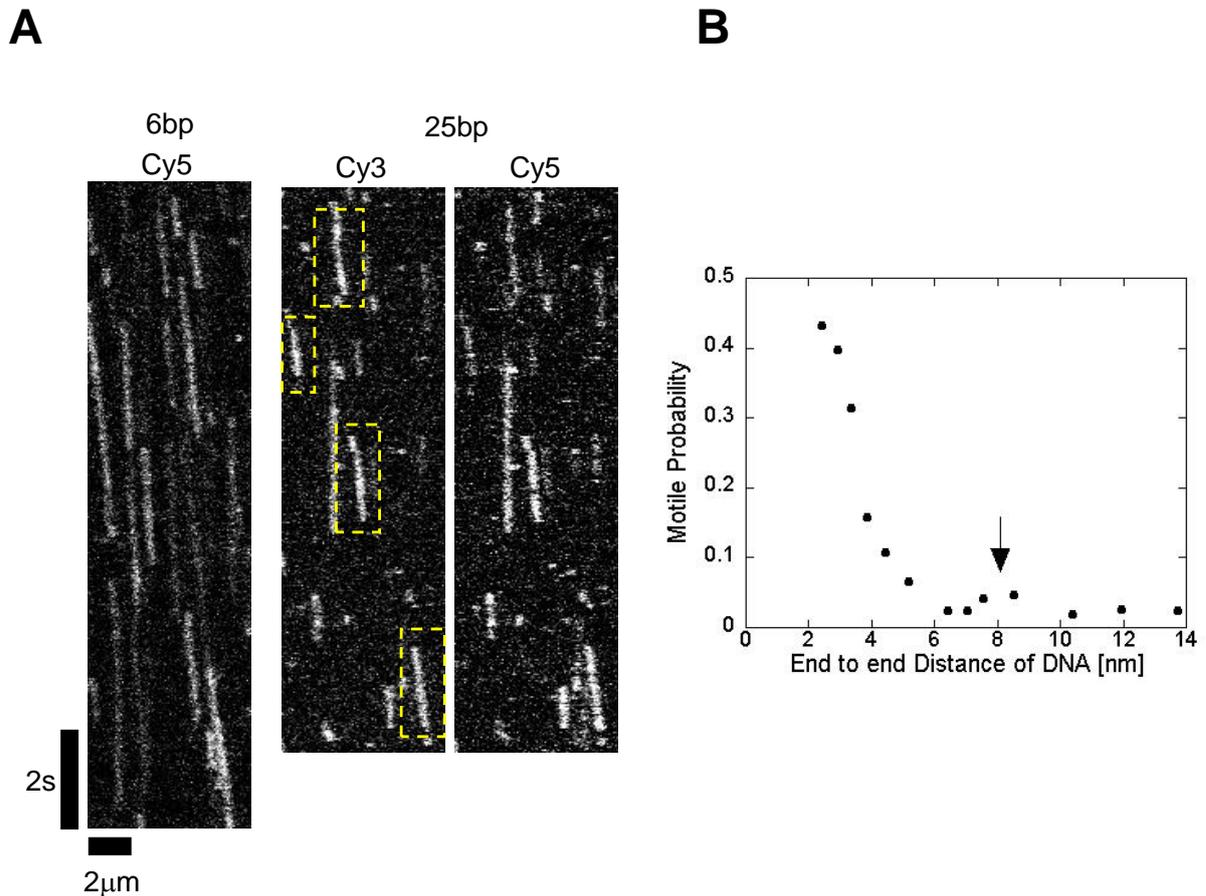


図 2-24 DNA 長変化と運動性能変化の相関

A K336CLM 337_6bp および K336CLM 337_25bp のカイモグラフ。6 bp は Cy5 のみ、25 bp は Cy3 と Cy5 のカイモグラフを示した。6 bp は 514 nm 励起、25 bp は 514 nm および 635 nm 励起で、共に 30 fps。B K336CLM 337 ベースの DNA 二重鎖-キネシンの、DNA 長変化による運動確率の変化。矢印で示した 8 nm 付近の 2 つめのピークは、2 つ先の β -tubulin に到達する一歩飛ばしの歩行に対応していると考えられる。図 B は *EMBO J.* から転載許可を得て本著者論文より転載。

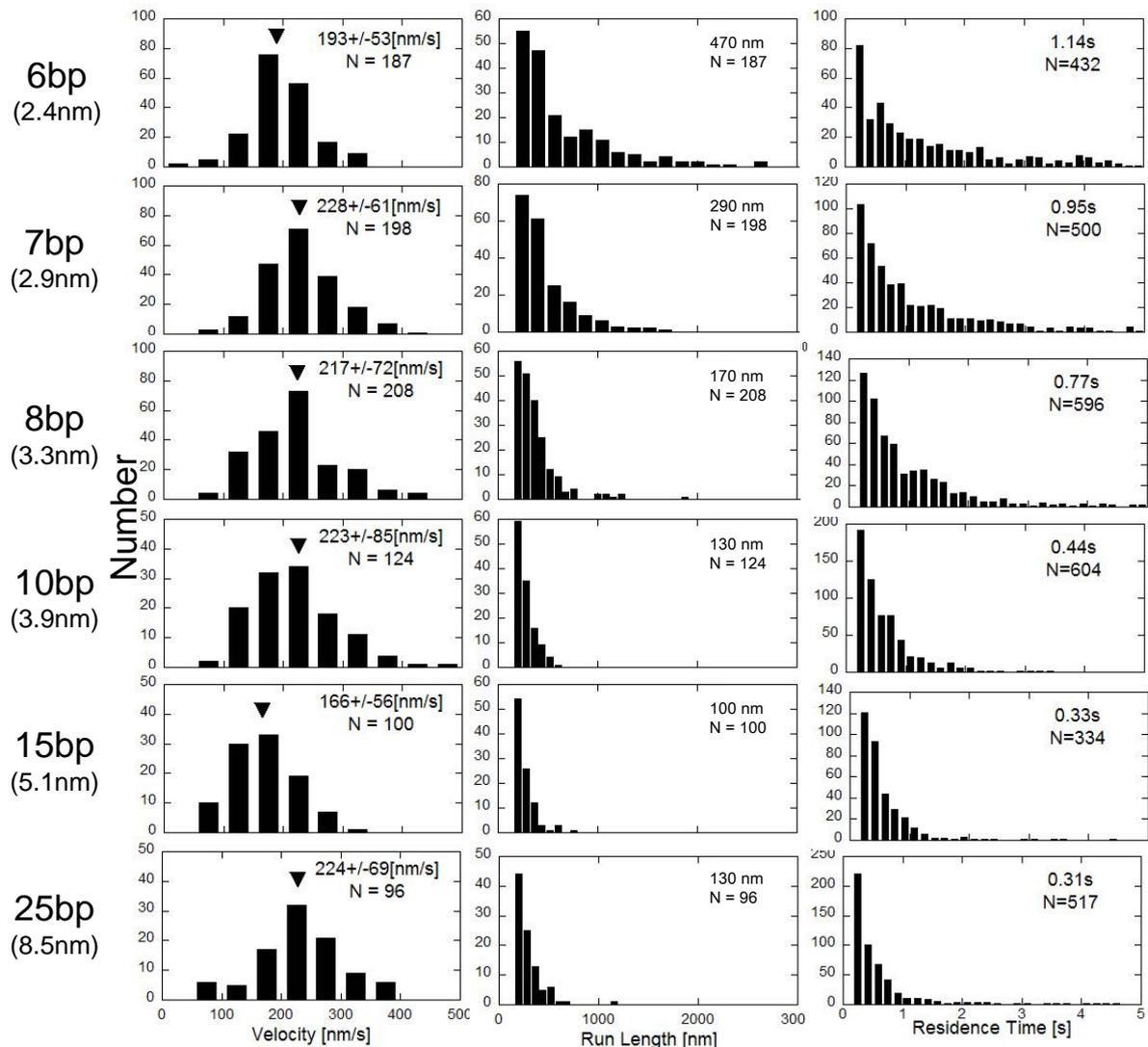


図 2-25 DNA 長変化による運動性能の変化 (337 接続)

左から運動速度、連続歩行距離、滞在時間で、上から 6、7、8、10、15、25 bp。平均運動速度は単純平均から算出、歩行距離と滞在時間は積分形の single exponential でフィッティングした。

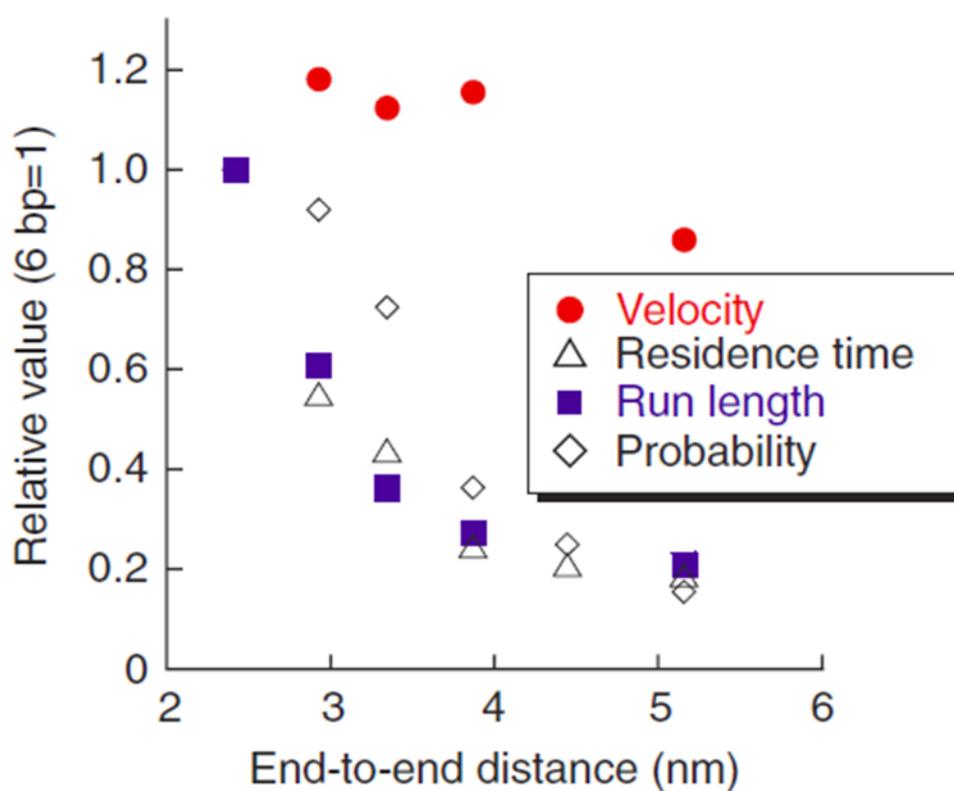


図 2-26 運動確率は連続歩行距離と相関が高い

図 2-25 で定量化した運動速度、連続歩行距離、滞在時間および運動確率と DNA 長の相関。運動確率に対し、連続歩行距離および滞在時間は相関が高いことがわかる。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

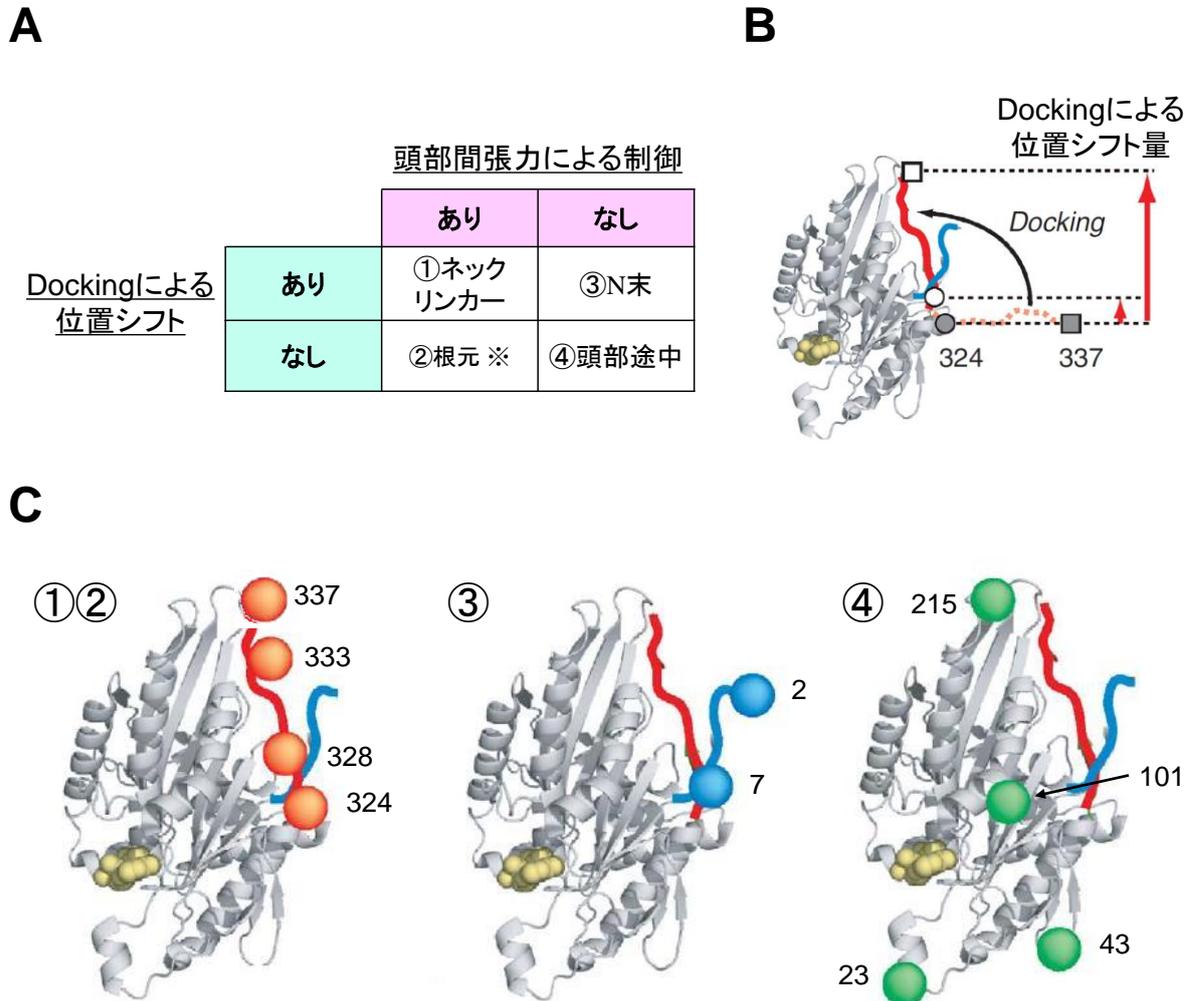


図 2-27 DNA 二重鎖-キネシンコンストラクト

A) ネックリンカーの 2 つの機能の有無による、DNA 二重鎖-キネシンの分類。B) Docking による構造変化の様子と、それに伴う位置シフト。□、○は Dock 状態での 337、7 の位置を示していて、大小 2 つの赤い矢印の長さが、それぞれ 337、7 の位置シフト量を示す。C) 本研究で用いた DNA の標識部位、および A の分類との対応。図 B、C は EMBO J.より改変。転載許可を得て本著者論文より転載。

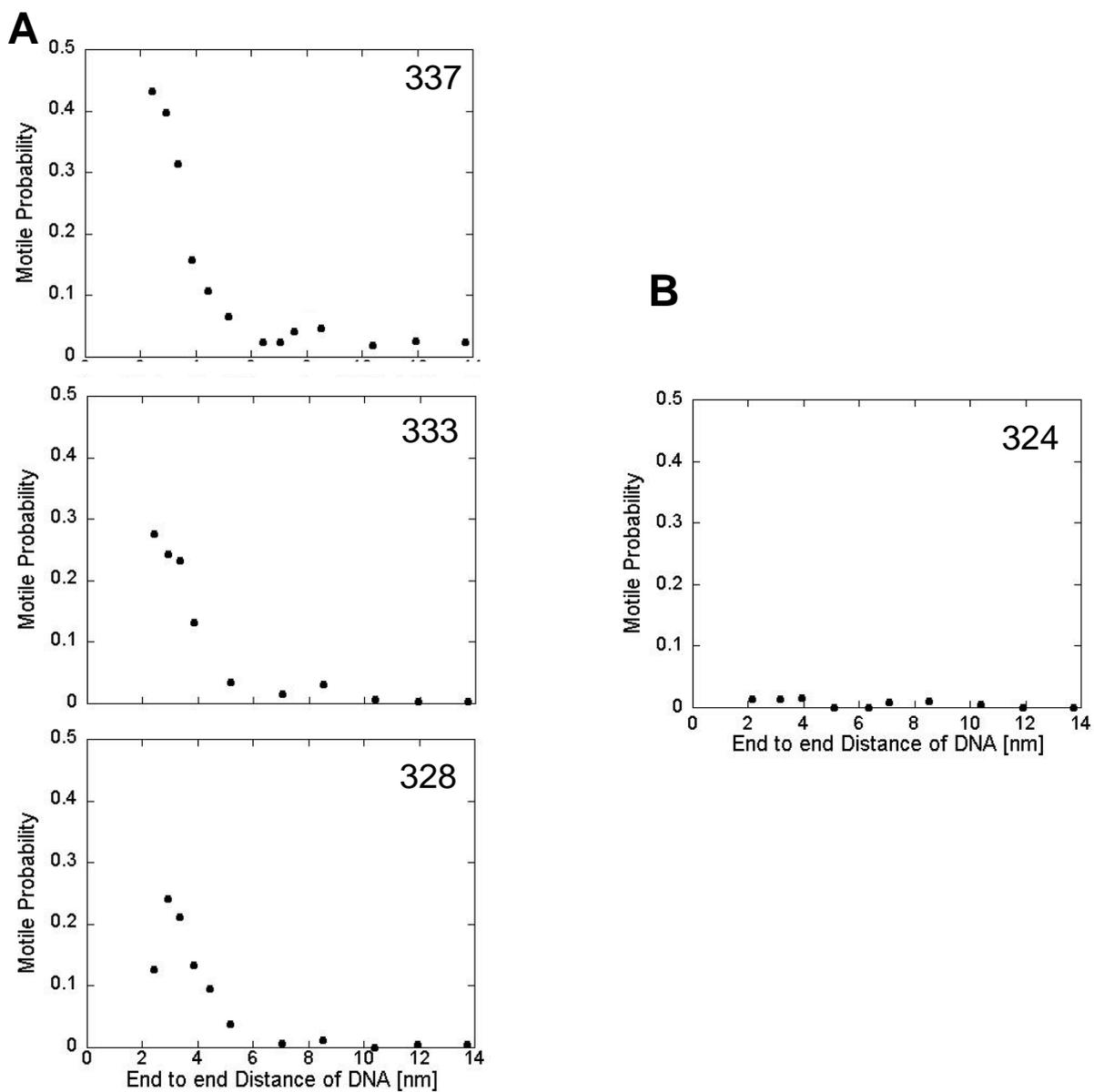


図 2-28 ネットリンカーを接続した DNA 二重鎖-キネシン

A) 337、333、328 および B)324 を接続した DNA 二重鎖-キネシンの、DNA 長変化による運動確率の変化。337 は図 2-24 再掲。

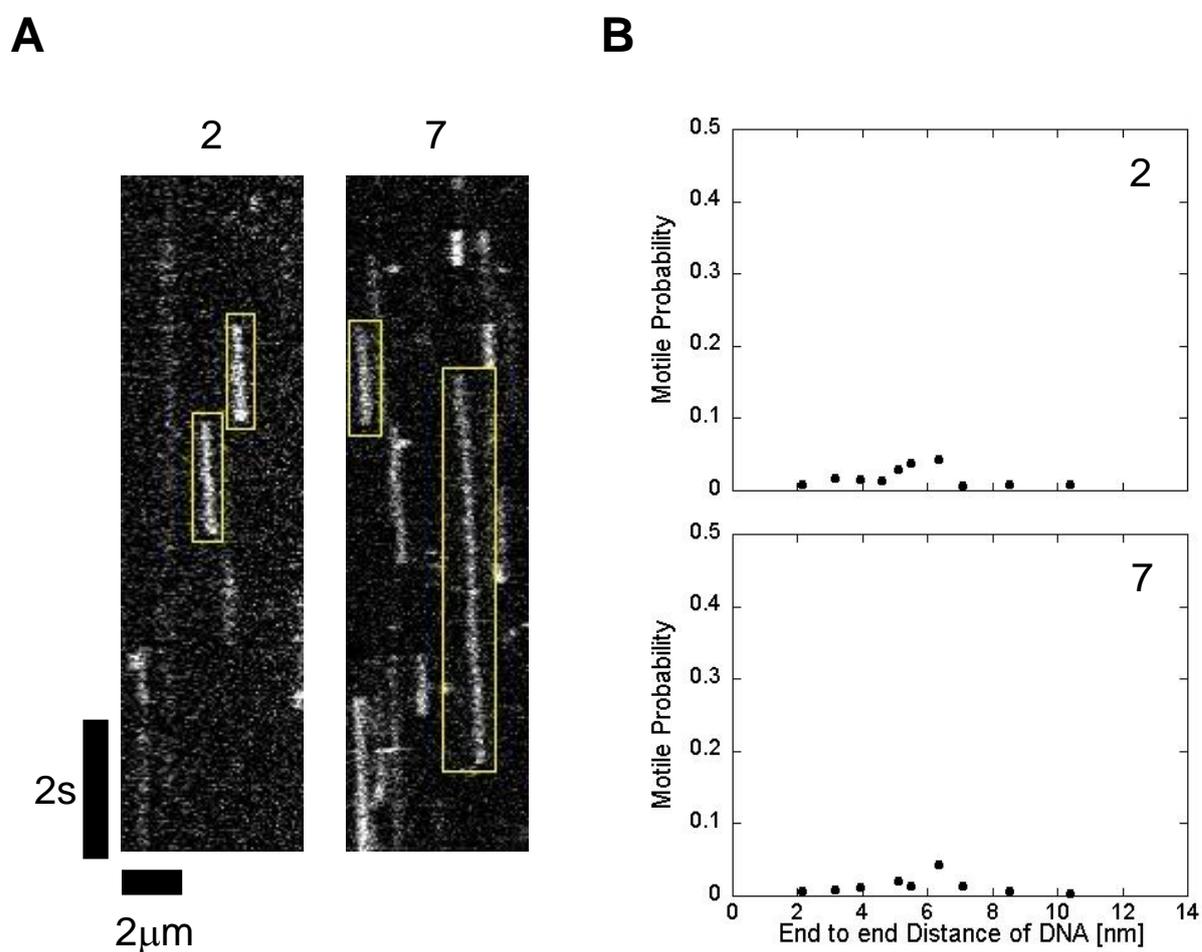


図 2-29 N 末を接続した DNA 二重鎖-キネシン

A) K336CLM 2_18bp および K336CLM 7_18bp のカイモグラフ。ともに Cy3 側で、30 fps で撮影。 B) 2、7 を接続した DNA 二重鎖-キネシンの、DNA 長変化による運動確率の変化。

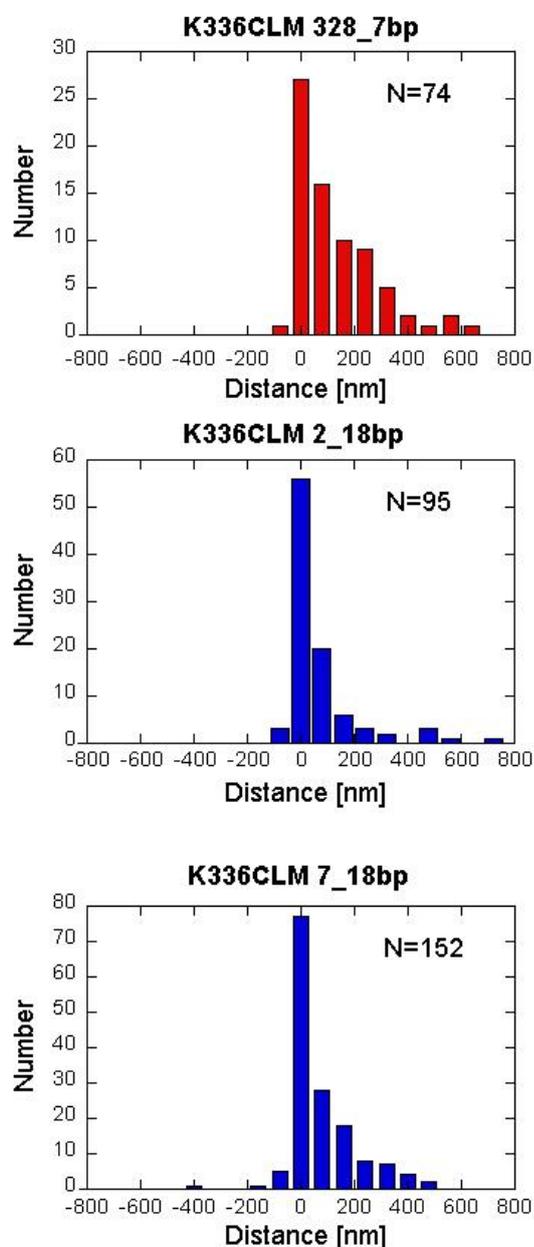


図 2-30 N 末接続 DNA 二重鎖-キネシンの変位解析

K336CLM 2_18bp および K336CLM 7_18bp の変位解析の結果。参考に K336CLM 328_7bp の変位も示した。2、7 共に変位は+側に偏っている。EMBO J.より改変。転載許可を得て本著者論文より転載。

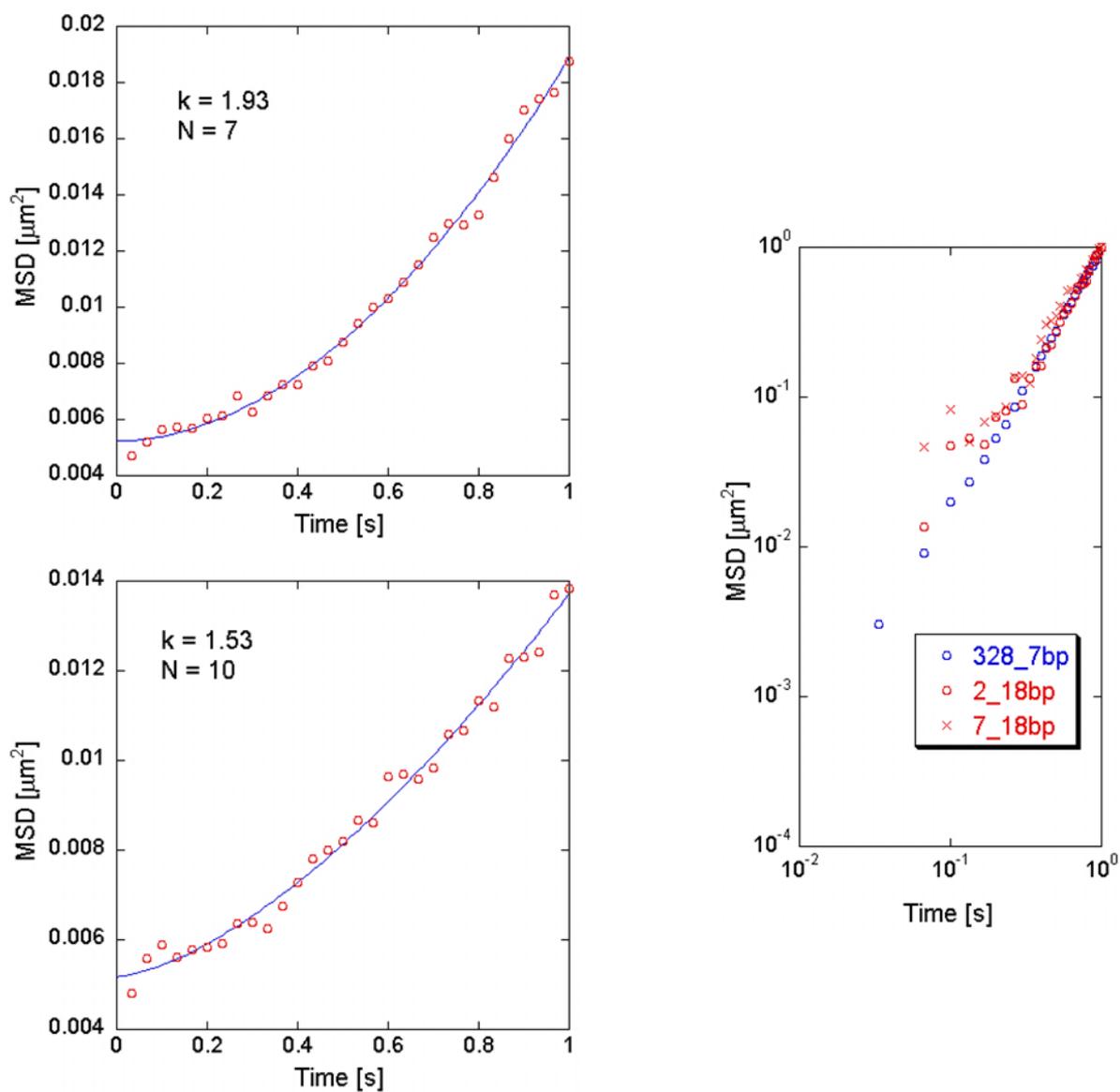


図 2-30 N 末接続 DNA 二重鎖-キネシンの平均二乗変位解析

K336CLM 2_18bp および K336CLM 7_18bp の平均二乗変位解析の結果。右は左の結果を両対数プロットしたもの。

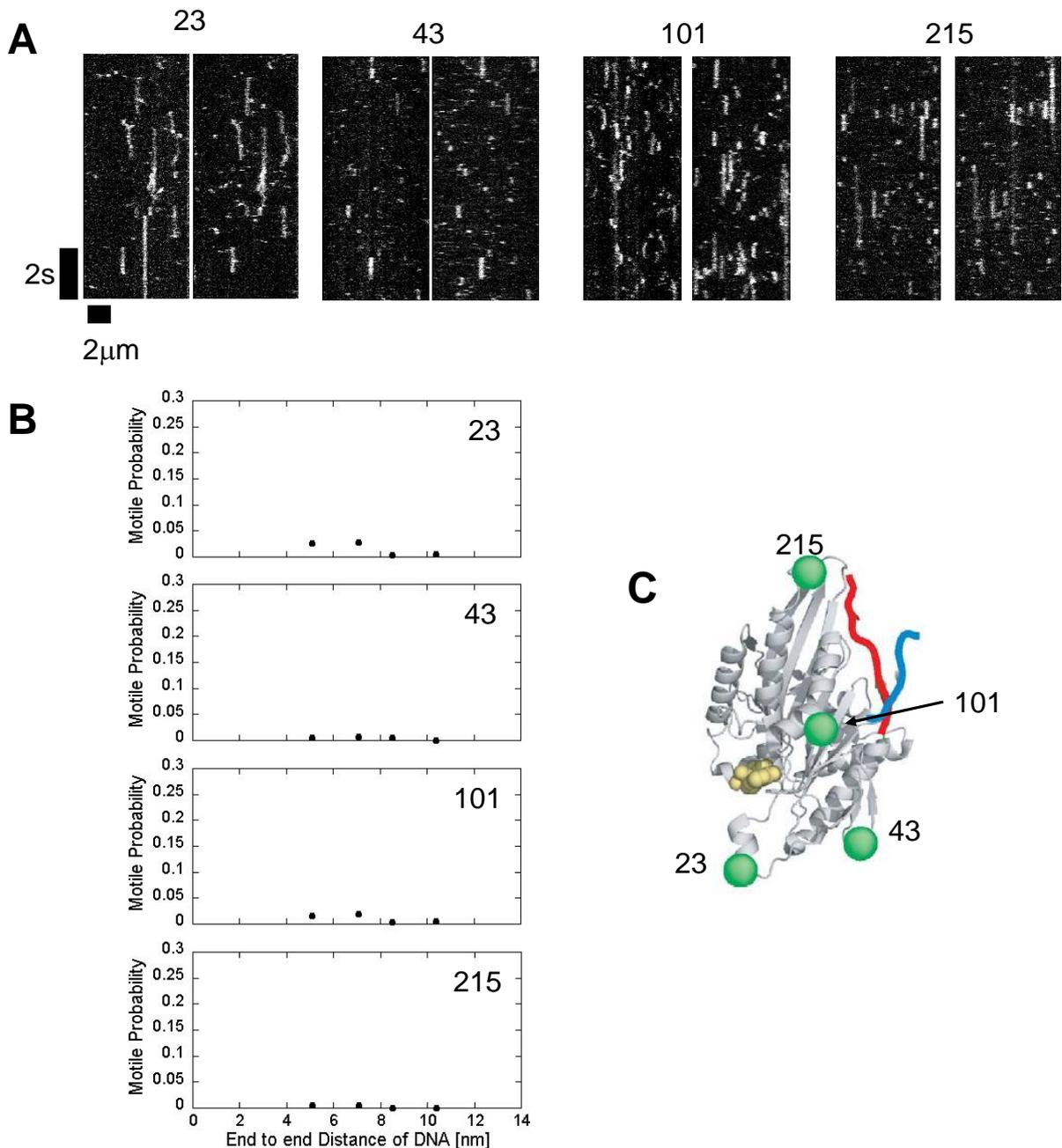


図 2-32 頭部途中を接続した DNA 二重鎖-キネシン

A) 左から、K336CLM 23_20bp、K336CLM 43_20bp、K336CLM 101_20bp、K336CLM 21C_25bp のカイモグラフ。左側 : Cy3、右側 : Cy5 で、30 fps で撮影。23 と 101 で動く輝点が見られるが、動きの方向性は不明確。B) 23、43、101、215 の運動確率。23、101 については本文中に記載した、双方向運動でも適用可能な運動確率を定量した。右に標識部位を再掲した。EMBO Jより転載許可を得て本著者論文より転載。

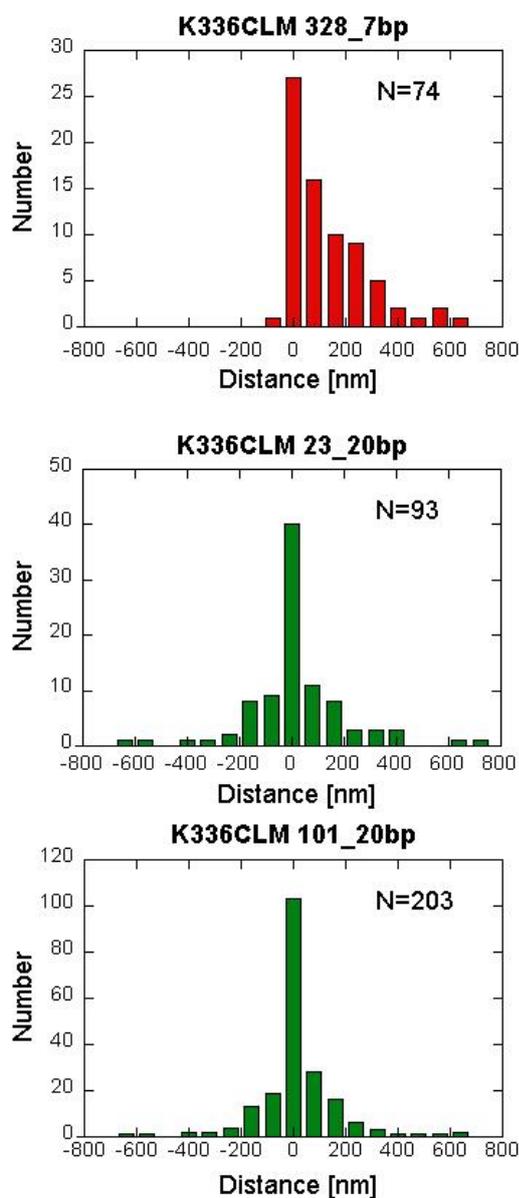
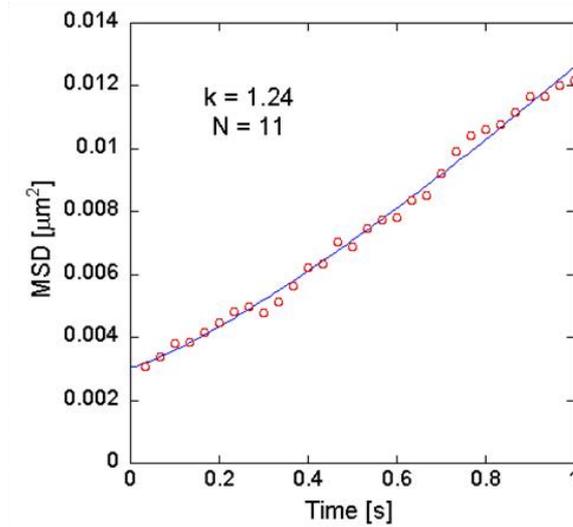


図 2-33 頭部途中を接続した DNA 二重鎖-キネシンの変位解析

K336CLM 23_20bp および K336CLM 101_20bp の変位解析の結果。参考に K336CLM 328_7bp の変位も示した。23、101 共に明確な方向性は見られない。EMBO J.より改変。転載許可を得て本著者論文より転載。

K336CLM 23_20bp



K336CLM 101_20bp

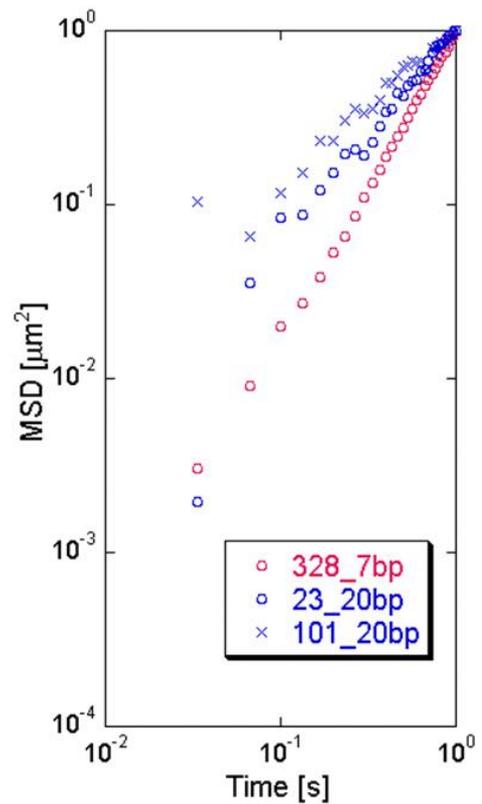
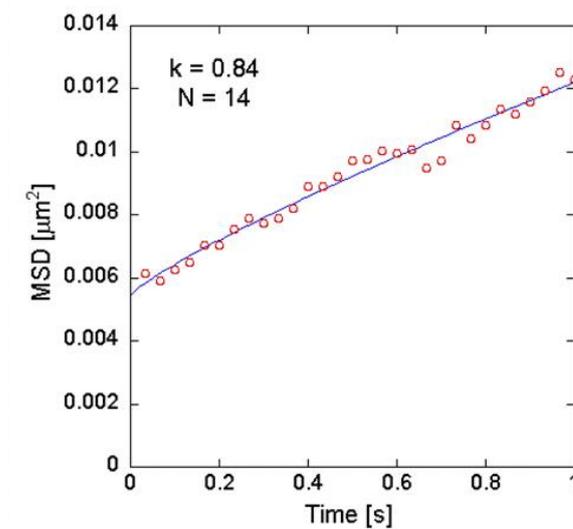


図 2-34 頭部途中を接続した DNA 二重鎖-キネシンの平均二乗変位解析

K336CLM 23_20bp および K336CLM 101_20bp の平均二乗変位解析の結果。右は左の結果を両対数プロットしたもの。328 や 2、7 と比較すると、明らかに k は 1 に近く、方向性のない運動であることを示している。

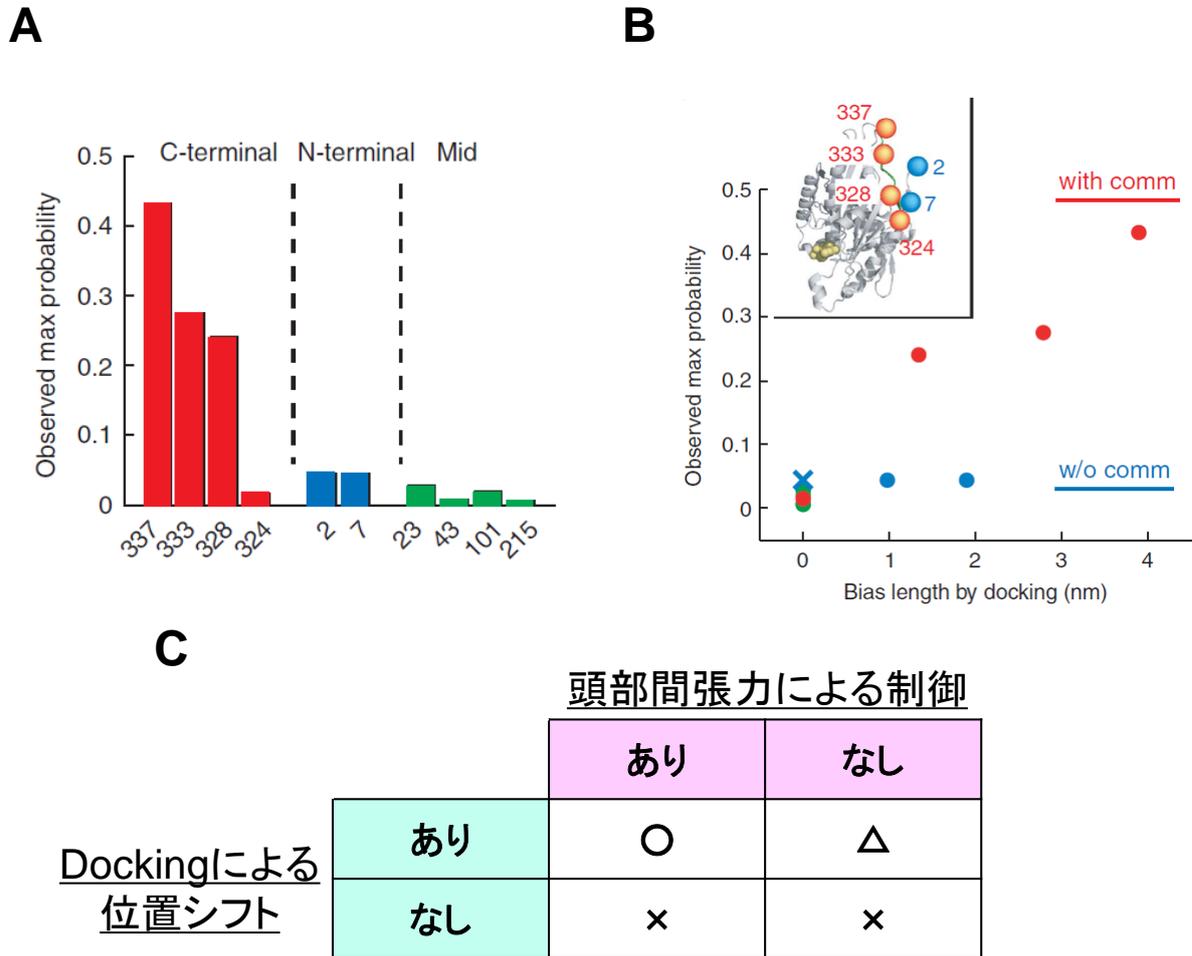


図 2-35 機能の有無による運動性能の比較

A)各接続場所における、DNA 長を変えた時に最も高かった運動確率。B) A の運動確率のピーク値と、各コンストラクトの docking による位置シフト量の相関。コンストラクトに関わらず、位置シフトがないと運動できず、位置シフトが大きいほど運動確率は高くなる。また、位置シフト量が同程度でも、ネックリンカーを介した頭部間張力の有無で運動確率は大きく異なる。C) B)の結果をコンストラクトの分類に従って整理した。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

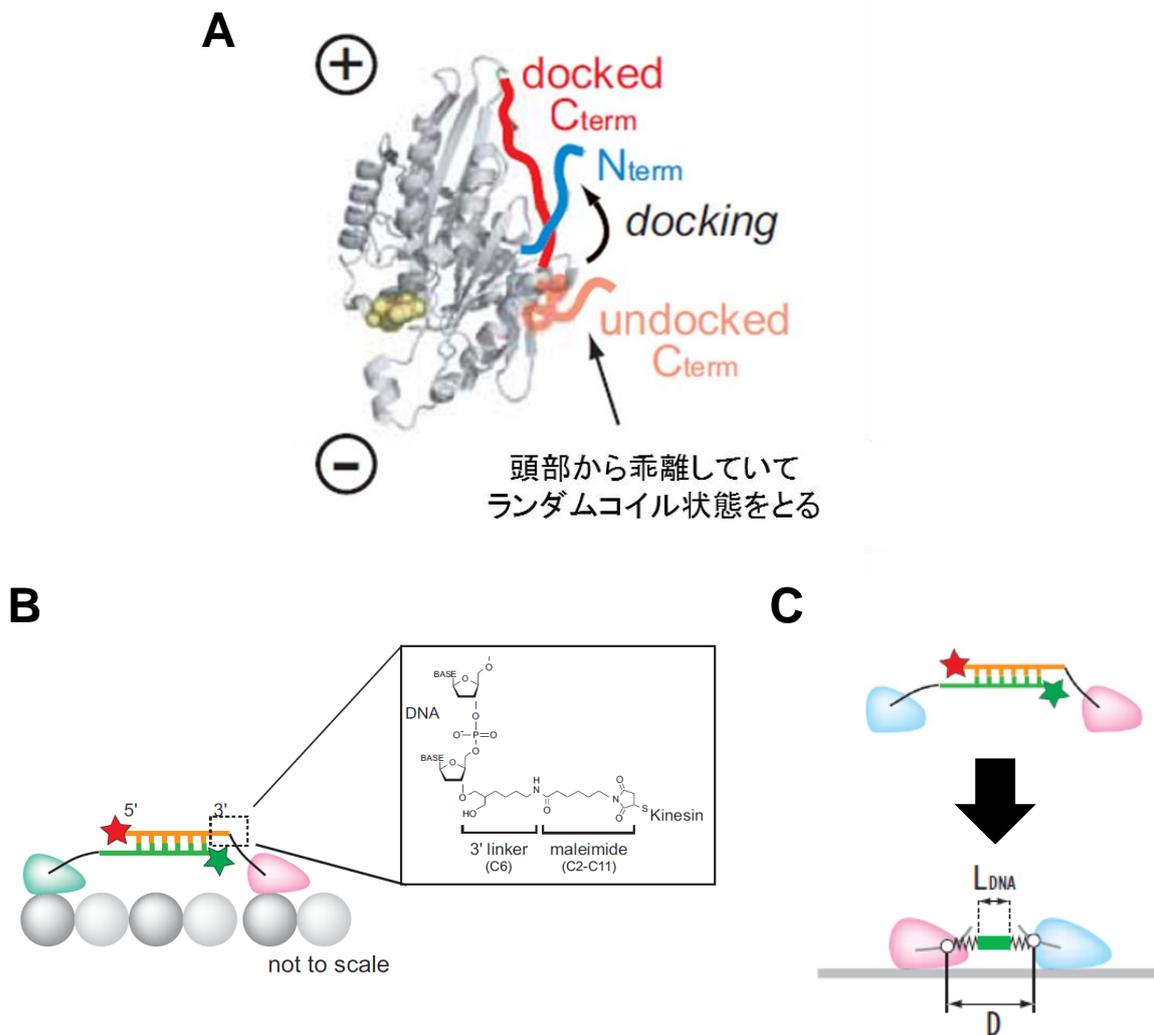


図 2-36 DNA 二重鎖-キネシンの力学的モデル

A) Dock 状態および undock 状態におけるネックリンカー(C 末)および N 末の構造。ADP 状態では、ネックリンカーは頭部に接続せず自由に拡散する undock 状態をとっていると考えられる。B) DNA リンカーの詳細な構造。C) DNA 二重鎖-キネシンは、2つの頭部が硬い棒(DNA)とその両側にあるバネ(スペーサー)でつながれたものと仮定した。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

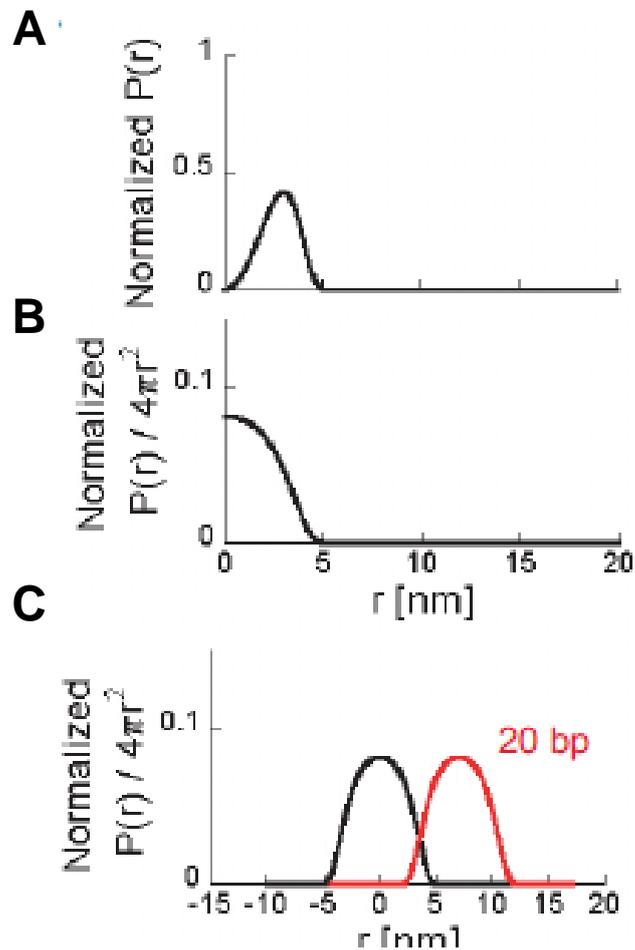


図 2-37 DNA+バネ部分の両端間距離の確率密度関数

A) (2.14)式に従って計算したバネ部分のみの確率密度関数。ここでは r は 3 次元の変数で、全体の積分値が 1 になるように標準化されている。B) キネシンの 1 次元的な運動(前方または後方へのステップ)のみを扱うことから、バネ部分のみの確率密度関数を 1 次元での表式 $P(r)/4\pi r^2$ に変換した。C) B) の両側分布(黒線)に対して、DNA 長(ここでは 20 bp)を加味し DNA+バネ部分の両端間距離の確率密度関数(赤線)を計算した。計算は全て EMCS を用いて 328 で接続した場合。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

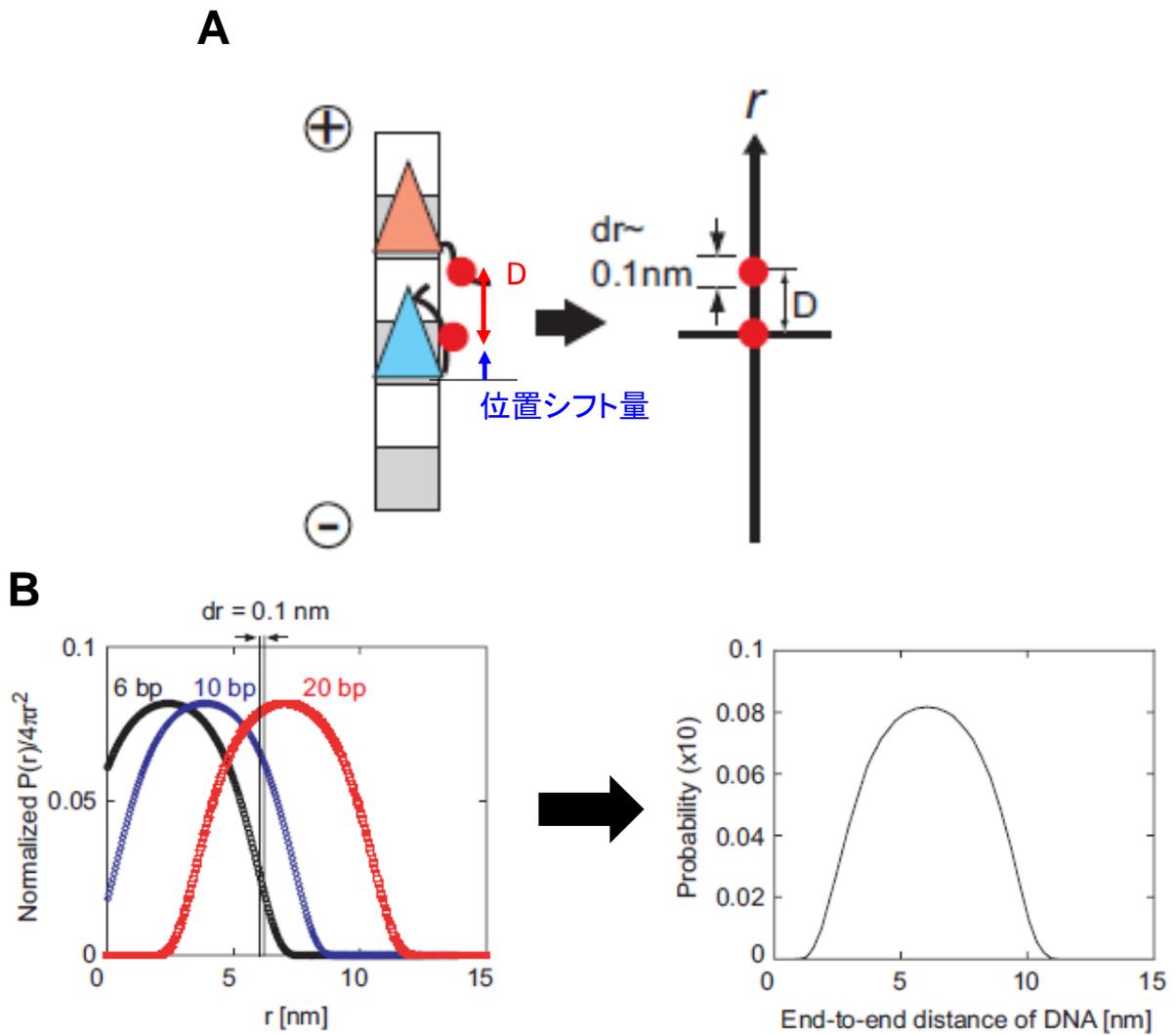


図 2-38 浮いた頭部の結合サイトへのアクセス確率

A) 確率密度関数からアクセス確率を計算する際に仮定したモデル。ネックリンカーの docking による前方への位置シフトの分だけ、結合サイトに対しアクセスしなければならない距離が短くなったと考えた。328 接続の場合は 6 nm。結合サイトの大きさは 0.1 nm と仮定した。 B) 左 : DNA 長によって結合サイトへのアクセス確率(328 接続の場合、6 nm での確率密度関数)が変化する。右 : 328 接続における、DNA 長によるアクセス確率の変化。アクセスしなければならない距離と一致する DNA 長が、アクセス確率のピークとなる。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

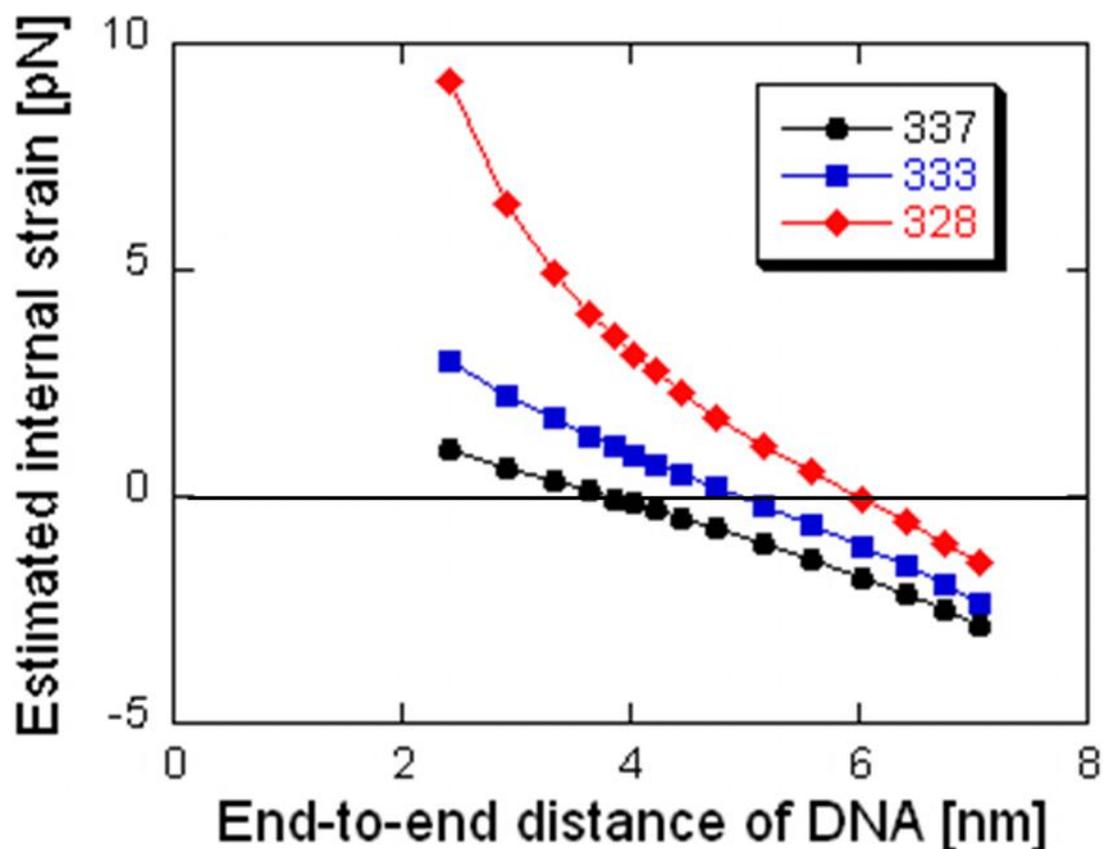


図 2-39 頭部間張力の見積もり

(2.15)式に従って、6 - 20bp の DNA 二重鎖-キネシンの頭部間張力を見積もった。337、333 より 328 の場合の張力変化が大きいのは、undock 状態にある浮いた頭部のネックリンカーはフリーなペプチド鎖であるが、接続場所がネックリンカーの根元側の方がフリーなペプチド鎖が短くなり、力学的にはより「硬いバネ」になるからである。また、328 は docking による位置シフトも少ないことから、6 bp の DNA は次の結合サイトにぎりぎりアクセスできる程度の長さとなり、張力が大きくなる。一方、337 や 333 は位置シフトが大きいため、6 bp は「長すぎて」アクセス確率が高くなってしまい、張力も小さくなると考えられる。

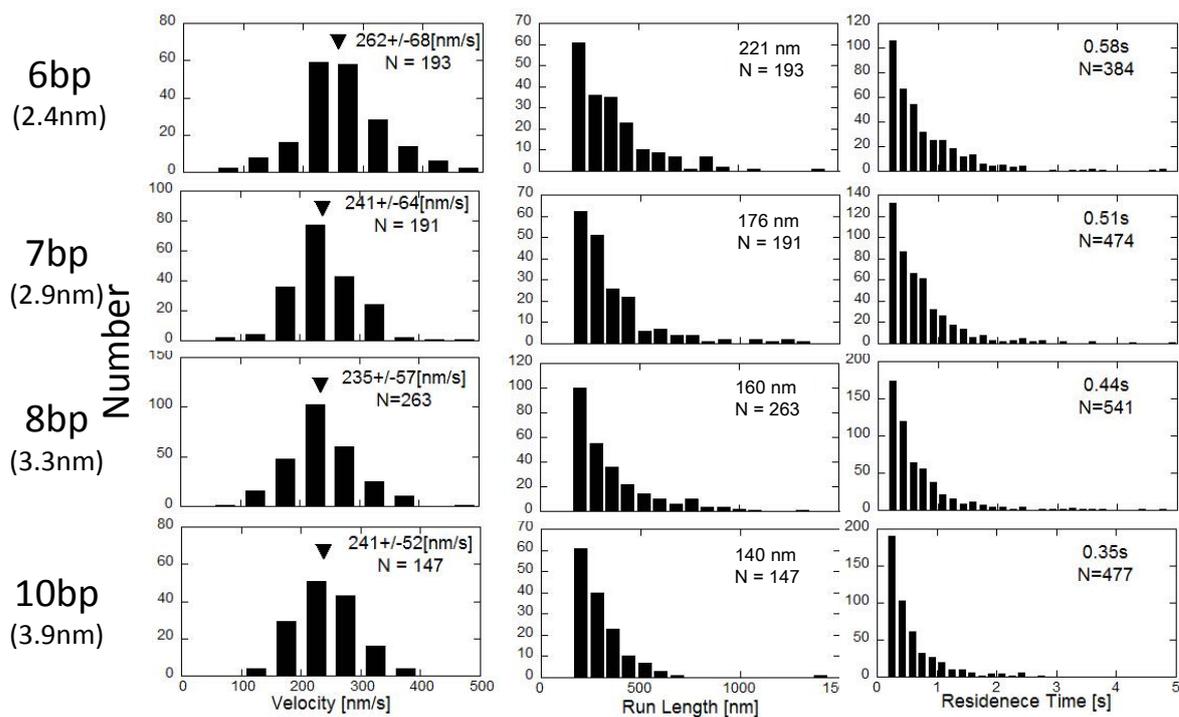


図 2-40 DNA 長変化による運動性能の変化 (333 接続)

左から運動速度、連続歩行距離、滞在時間で、上から 6、7、8、10 bp。平均運動速度は単純平均から算出、歩行距離と滞在時間は積分形の single exponential でフィッティングした。

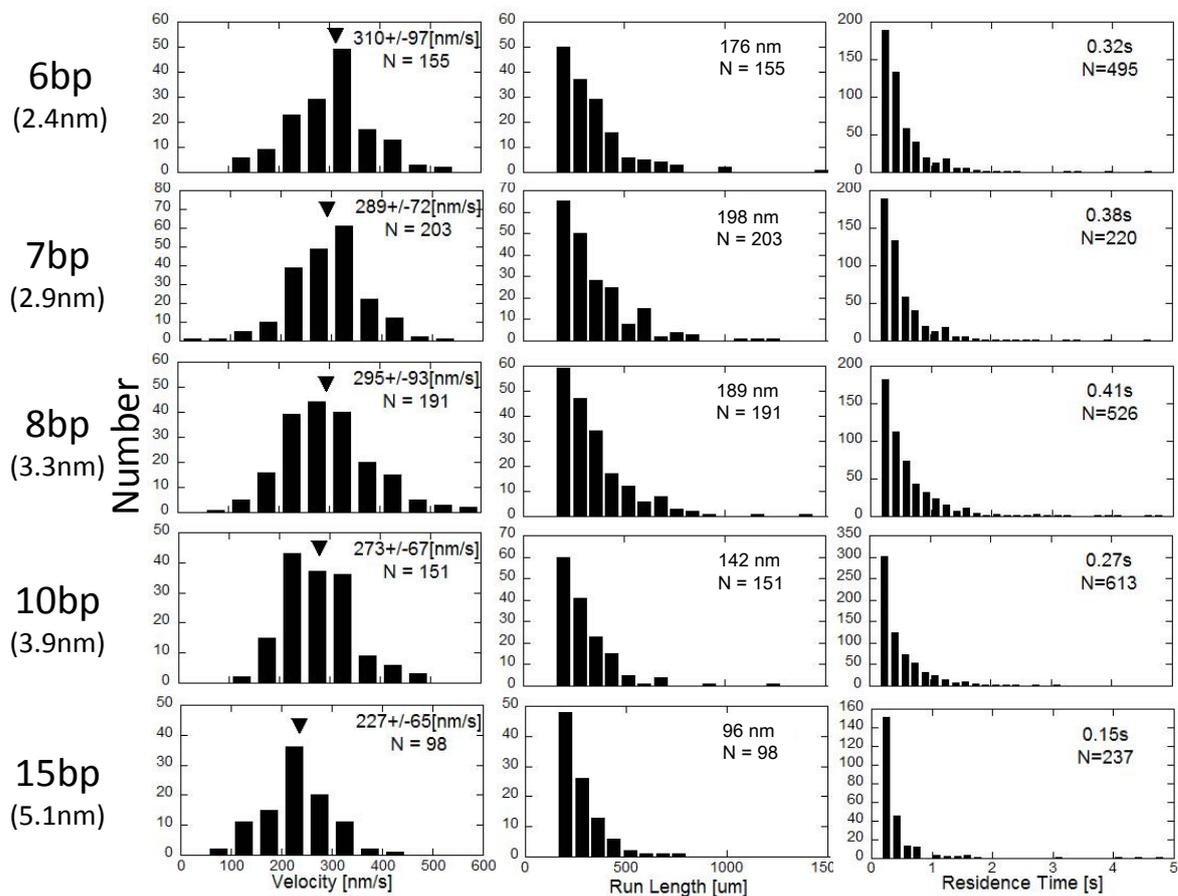
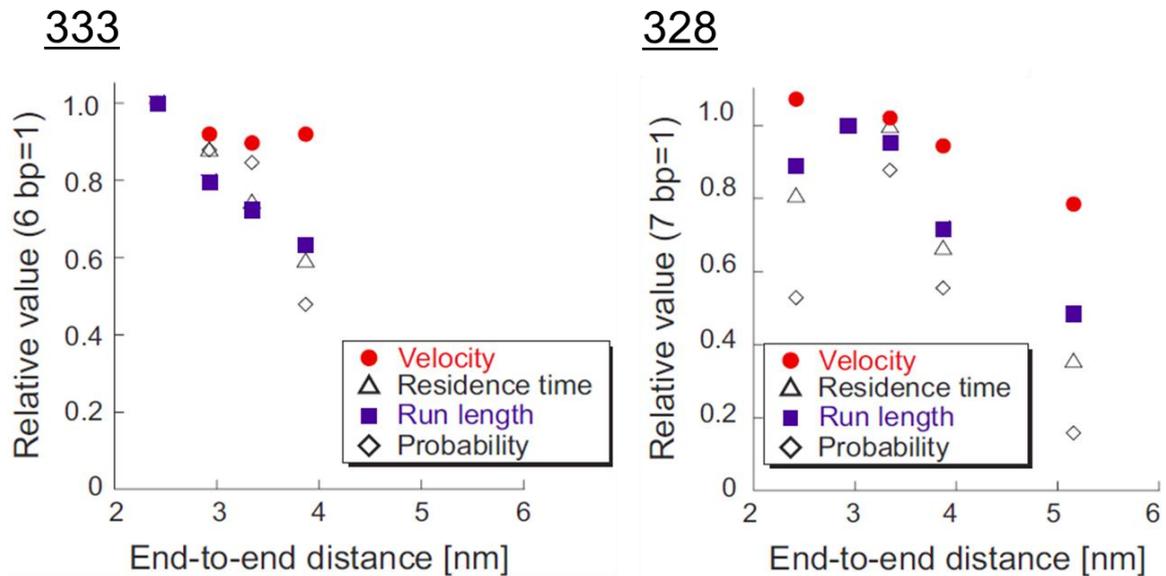


図 2-41 DNA 長変化による運動性能の変化 (328 接続)

左から運動速度、連続歩行距離、滞在時間で、上から 6、7、8、10、15 bp。平均運動速度は単純平均から算出、歩行距離と滞在時間は積分形の single exponential でフィッティングした。

A



B

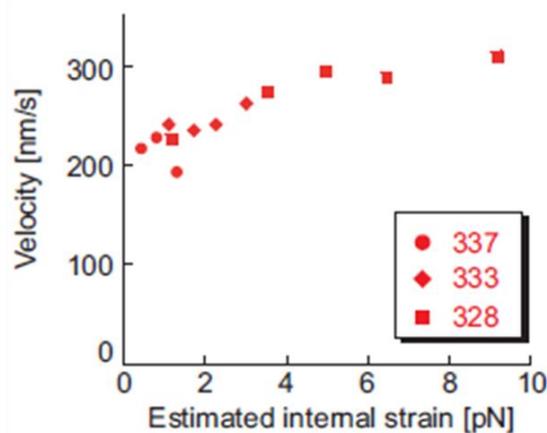


図 2-42 頭部間張力による運動速度変化は小さい

A) 図 2-40、41 で定量化した運動速度、連続歩行距離、滞在時間および運動確率と DNA 長の相関。左が 333、右が 328 接続。DNA 長に対して、運動速度が 20%以内の変化であったのに対し、運動確率、連続歩行距離および滞在時間はより変化が大きかった。

B) 337、333、328 を接続した 6 – 10 bp の DNA 二重鎖-キネシンにおける、運動速度と頭部間張力の相関。接続場所に関わらず相関が見られたが、張力が 1 桁変わっているのに対して、速度は 30%程度しか変化しない。EMBO J. から転載許可を得て本著者論文より転載。

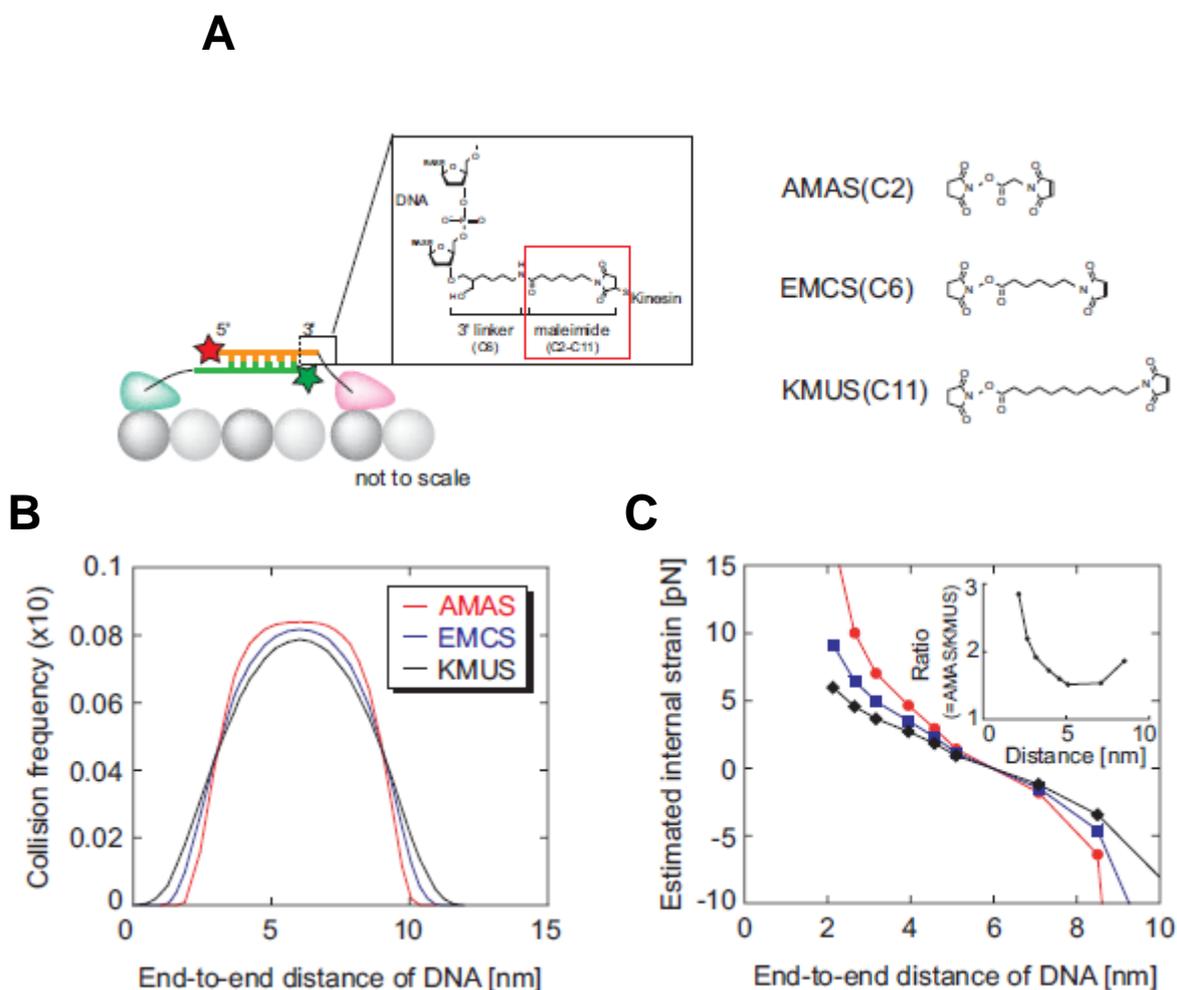


図 2-43 DNA リンカーの異なる DNA 二重鎖-キネシン

A) 用いた3つのDNAリンカーと、DNA二重鎖-キネシン上での挿入箇所。バネ部分の長さかわることで、バネの硬さが変わると考えた。B) 328 接続においてDNAリンカーを変えた時の、結合サイトへのアクセス確率(左)と頭部間張力(右)の違い。頭部間張力については、同じDNA長におけるAMASとKMUSでの頭部間張力の比率を右上に示した。*EMBO J.* から転載許可を得て本著者論文より転載。

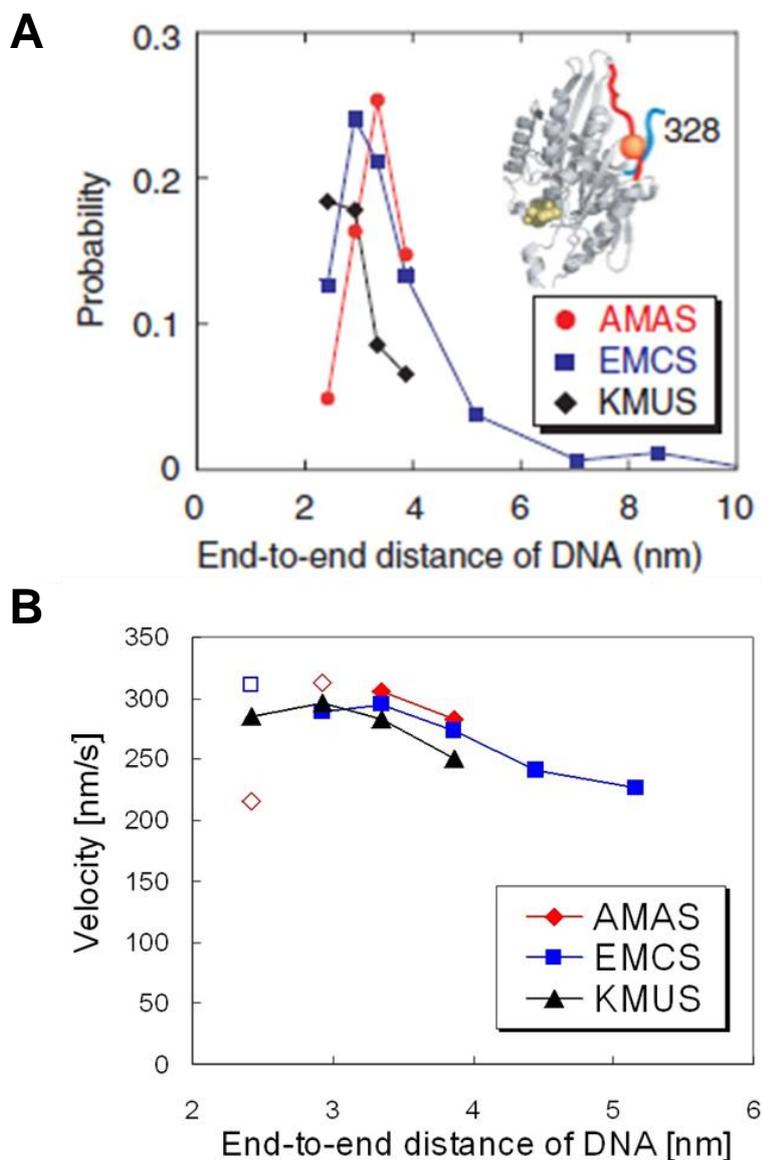


図 2-44 DNA リンカーの違いによる運動確率と運動速度の変化

A) 328 接続で DNA リンカーを変えたコンストラクトにおける、DNA 長変化による運動確率の変化。EMCS は 6 – 25 bp、AMAS、KMUS は 6 – 10 bp をプロット。B) 同じく、運動速度の変化。EMCS は 6 – 15 bp、AMAS、KMUS は 6 – 10 bp をプロット。中抜きの点は運動確率のピークより短い DNA のコンストラクトであることから、張力との相関を見る際にはこれらのデータは使用しなかった。図 A は *EMBO J.* から転載許可を得て本著者論文より転載。

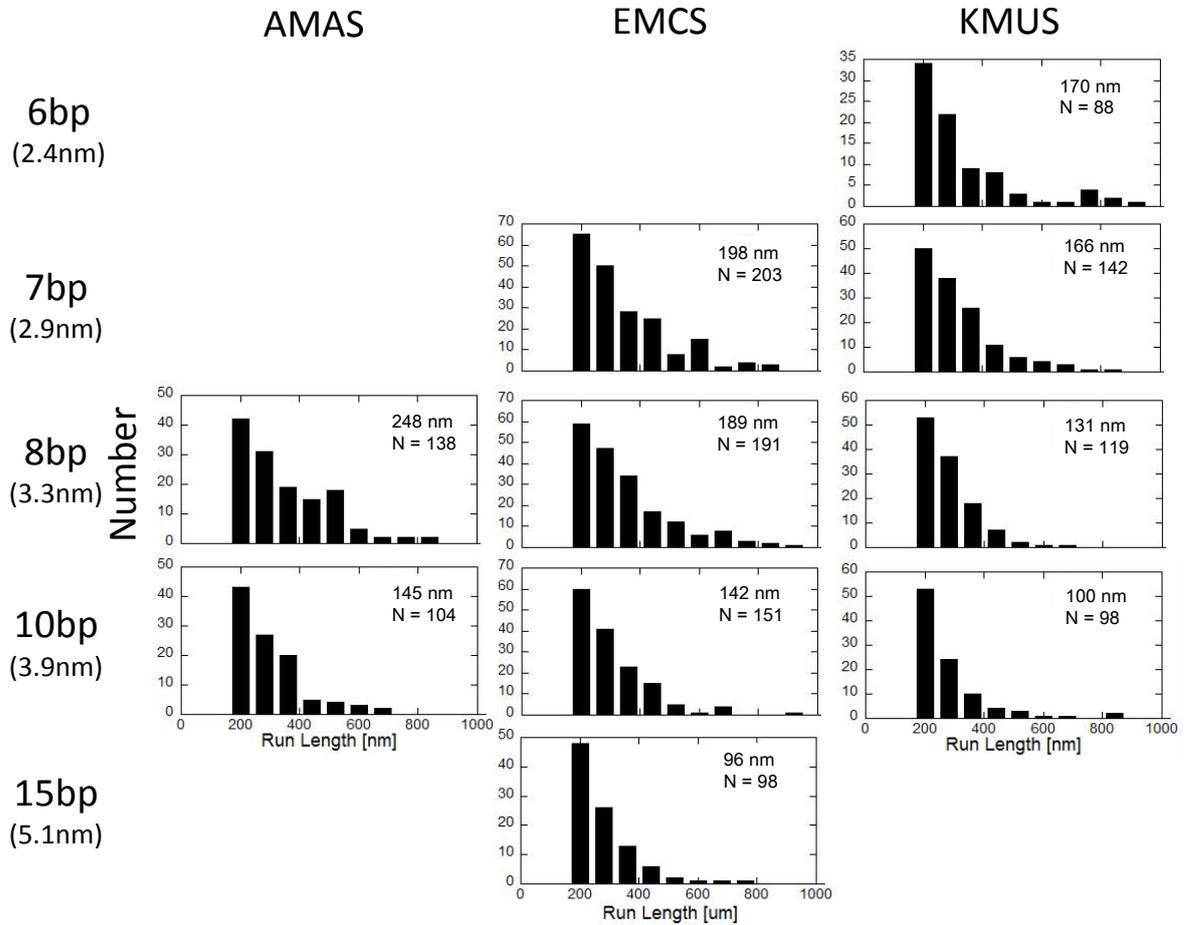


図 2-45 DNA リンカーの違いによる連続歩行距離の変化

328 接続で DNA リンカーを変えたコンストラクトにおける、DNA 長変化による運動確率の変化。積分形の single exponential でフィッティングした。

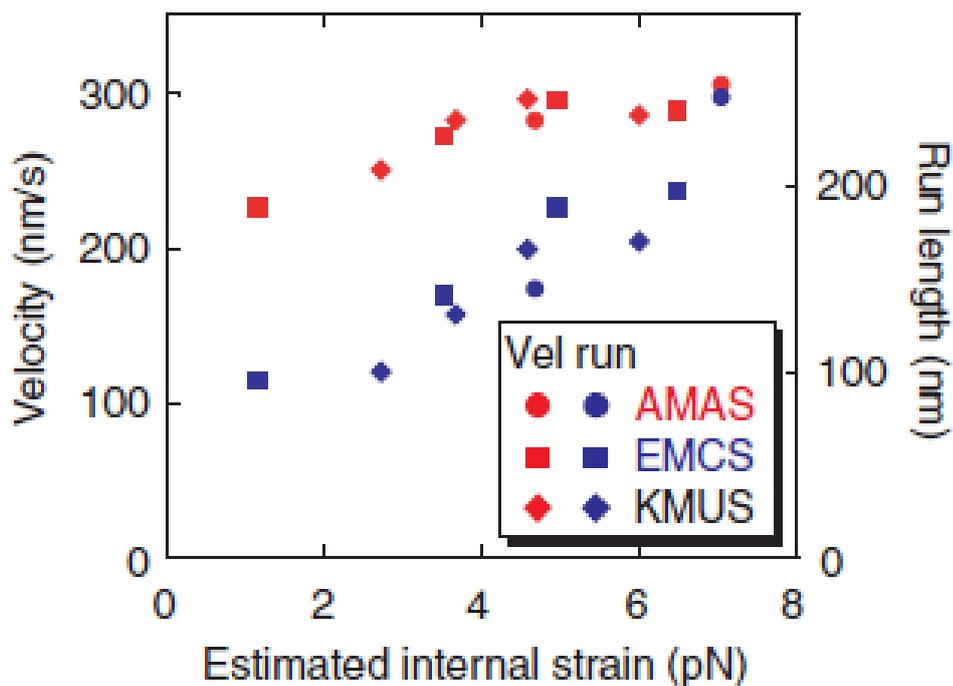


図 2-46 頭部間張力は運動速度より連続歩行距離に影響する

頭部間張力と運動速度(赤)、および連続歩行距離(青)の相関。縦軸は左に運動速度、右に連続歩行距離のスケールを示した。頭部間張力が1–7 pNと変化する中で、運動速度は20%程度しか変化しなかったのに対し、連続歩行距離は約2.5倍の変化が見られた。*EMBO J.* から転載許可を得て本著者論文より転載。

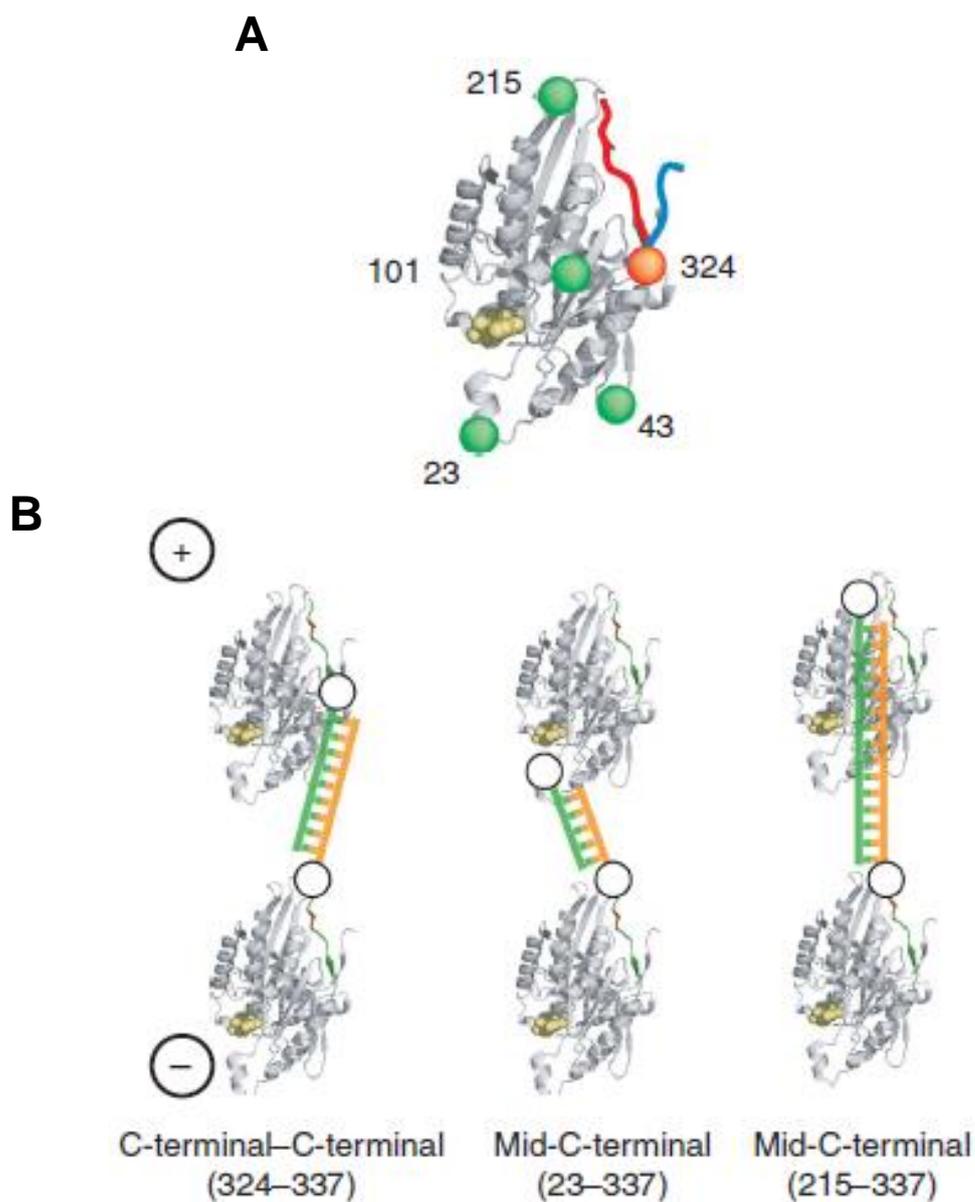


図 2-47 ヘテロ DNA 二重鎖-キネシン

A) 337 のモノマーとヘテロに接続させた箇所。B) 各接続場所のヘテロ DNA 二重鎖-キネシンについて、337 が後方の結合サイトに結合した両足状態における、予想される配置。*EMBO J.* から転載許可を得て本著者論文より転載。

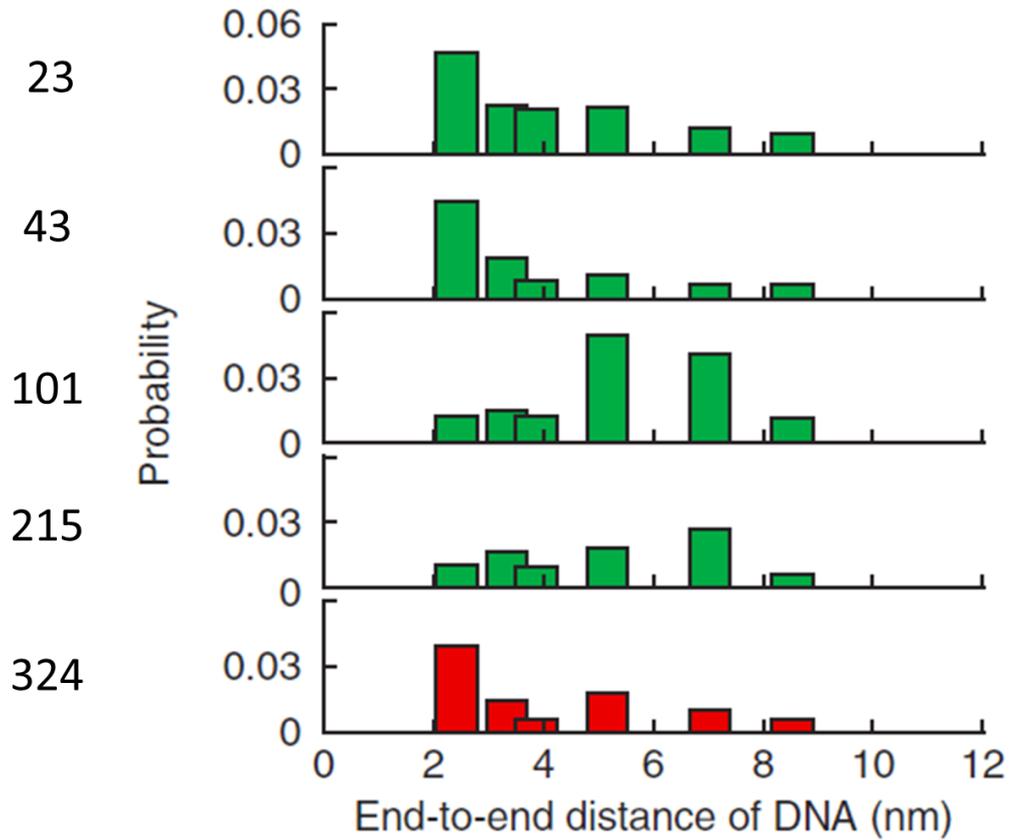
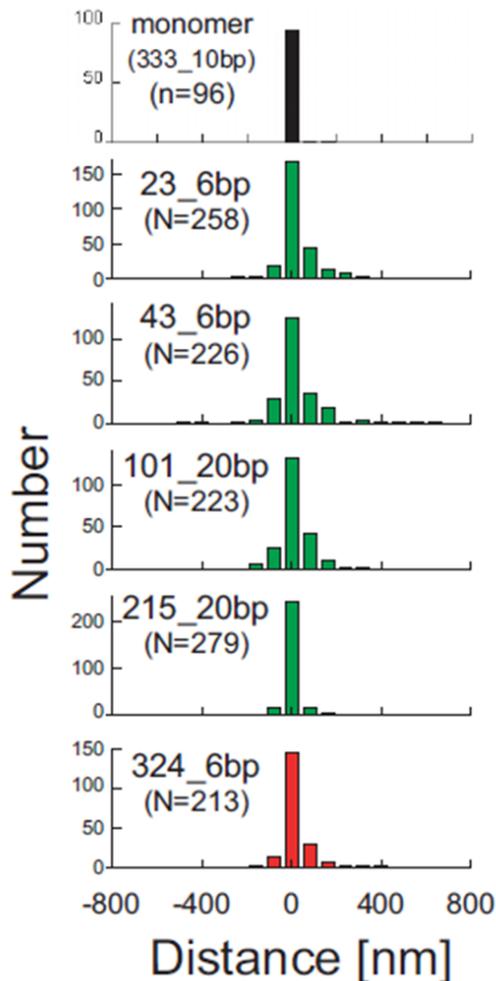


図 2-48 ヘテロ DNA 二重鎖-キネシンの運動確率

23、43、101、215、324を337と接続したヘテロDNA二重鎖-キネシンの運動確率。DNA長は6 – 25 bpまで変化させた。双方向運動でも適用可能な運動確率を評価した。*EMBO J.* から転載許可を得て本著者論文より転載。

A



B

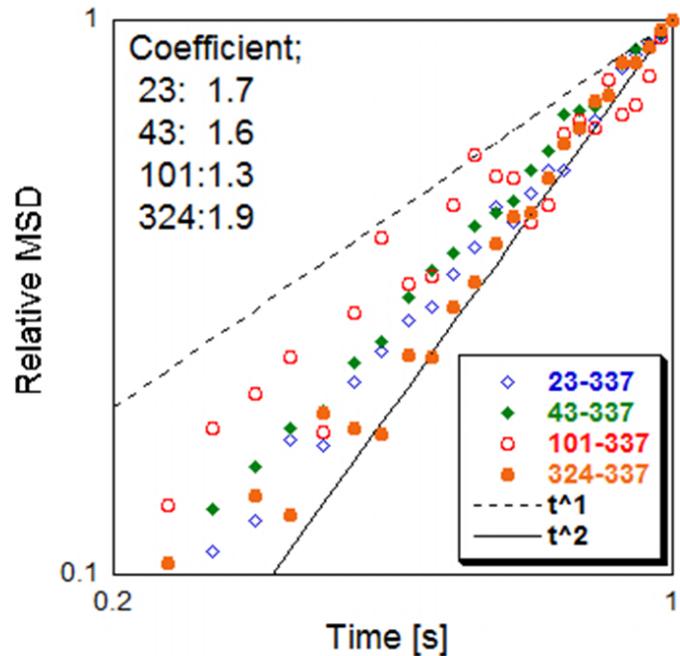


図 2-49 ヘテロ DNA 二重鎖-キネシンの変位および平均二乗変位解析

A) 23、43、101、215、324 を 337 と接続したヘテロ DNA 二重鎖-キネシンの変位解析。上に、参照としてモノマーDNA-キネシンの変位を示した。DNA 長としては、各接続場所で運動確率がピークとなったものを用いた。215 では変位そのものが小さく変位の偏りは見られなかったが、他のコンストラクトは、変位が若干片側方向へ偏っていることが確認できた。B) 23、43、101、324 を 337 と接続したヘテロ DNA 二重鎖-キネシンの平均二乗変位解析。ネックリンカー根元を接続した 324 は予想通り一方向運動であったが、23、43 についても一方向運動に近い傾向が見られた。これは、ネックリンカー以外に 23 や 43 の位置する頭部後方も張力の検知に関わっている可能性を示唆している。図 A は *EMBO J.* から転載許可を得て本著者論文より転載。

第 3 章 DNA シート-キネシンを用いた

複合体内の分子間協調の探索

3-1) 概要

細胞内で、キネシンは、逆方向性モーター蛋白質のダイニンと共に、複数の分子で協調して小胞輸送を担っている。小胞輸送では、積荷によって運動方向を制御する必要があり、何らかの方法によって、協調機構が機能していると考えられる。例えば、Gross らは、*in vitro* の実験で得られるパラメーターで細胞内の小胞輸送を説明しよう試みたが、両方向のモーター蛋白質による単純な力学的な綱引きでは、説明できなかった(Kunwar *et al.*, 2011)。また、小胞は均一な組成でできているわけではなく、様々なマイクロドメインが存在しており(Kusumi *et al.*, 2005)、協調機構の基盤となっている可能性がある。更に、小胞体上で、モーター蛋白質は荷物アダプター蛋白質を含む様々な蛋白質で複合体を形成しており、空間的な配置が重要となる。例えば、ダイニンに関しては、輸送複合体の試験管内再構成が行われており(McKenney *et al.*, 2014)、クライオ電顕を用いた複合体解析も進んでいる(Urnavicius *et al.*, 2015; Carter *et al.*, 2016)。しかし、従来の運動解析は、主に関わっている分子数や分子の数変化に着目が置かれていた。これは、主に用いられてきた 2 つの方法(光ピンセットや蛍光一分子観察)では、ナノメートル精度での分子配置決定が困難だったからである。より詳細な解析のためには、分子配置を考慮しつつ、輸送複合体の運動解析が可能な実験系が必要であった。

3-1-1) 目的

分子間協調を調べるにあたり、蛋白質分子の種類・数や接続場所を制御した複合体の再構成とその運動解析が重要である。そのために本研究では、ナノメートル精度で分子配置可能な DNA origami に着目し、複合体内の分子間協調の解明を目指した。本研究ではその最初のステップとして、シート状構造(60 x 90 nm)の DNA ナノ構造(DNA シート)を用い、DNA シート上に野生型キネシン分子および低運動活性のキネシン変異体をさまざまな空間配置で結合させた DNA シート-キネシンの運動性能評価を行ない、キネシン分子の数や種類がどのように複合体の運動に影響を与えるかを調べた。

3-1-2) 本章の構成

本章では、まず、DNA シート-キネシンの作製方法を述べる(3-2 節)。次に、運動観察を行う観察手法について述べ(3-3 節)、そして、分子数や、固定化された分子の活性が複合体全体の活性にどのように影響を与えるかを評価する(3-4 節)。最後に得られて結果に関して考察を行う(3-5 節)。

3-2) DNA シート-キネシンの作製手法の確立

本節では、DNA シート-キネシンの作製方法を説明する。作製にあたっては、キネシンを DNA シートに結合させるが、複数の方法を比較した。生化学的解析や AFM(原子間力顕微鏡)で評価した結果、DNA ハイブリダイゼーションと比べて、タグ蛋白質(Halo タグおよび SNAP タグ蛋白質)を用いた手法が有効であった。

3-2-1) 作製方法概要

本研究で用いた DNA シートは、DNA ナノ構造を構築するための手法の一つである DNA origami という手法を用いて作製した(Rothemund 2006)。この手法は、M13mp18 という 7249 nt の環状 DNA をベースに、40 nt 程度の短い staple と呼ばれるオリゴ DNA をつなぎとして編み込むことにより、2 次元ないし 3 次元の構造を構築する手法である。Staple の塩基配列をうまく設計することにより、さまざまな形状のナノ構造を構築することが可能であることが報告されている(図 3-1A)。本研究では、できるだけ単純な構造という方針で、60 x 90 nm のシート状の構造をとる配列を用いた(図 3-1B)。本研究では用いたシート構造は、1 層構造の DNA ナノ構造であるので、ナノ構造の形成時間が短く、また、収率も高いので、複雑なナノ構造でしばしば必要となる精製操作(ゲル切り出し等)が不要である。このため、蛋白の固定方法の評価が容易であると期待された。一方で、DNA ナノ構造の観察においては、作製したナノ構造が連結や凝集をせずに単粒子状態を保つ事が重要であるので、DNA シート同士が結合しにくいような工夫も施した。

DNA シートに蛋白質を特異的に結合させるためには、DNA シート上の特定の場所に、結合用の「鍵」を提示する必要がある。この際、鍵が DNA シートの表面そのものに存在する場合は、蛋白質がアクセスしづらく、結合定数が下がる可能性がある。そこで、シート上からリンカー-DNA 鎖(7 塩基)を伸ばして、その先に鍵を提示するようにした。固定場所としては、DNA シートの片側の表面に 3 x 4 の計 12 箇所を用意した(図 3-2A)。ターゲットの蛋白質を特異的に結合させるための鍵はいろいろと手法が考えられるが、本研究では①DNA ハイブリダイゼーション、②タグ蛋白質-タグリガンド の 2 つの手法を検討した(図 3-2B)。

①DNA ハイブリダイゼーションは、第 2 章で検討した DNA 二重鎖-キネシンのダイマー化と同様に、センス鎖を鍵として提示することで、対応するアンチセンス鎖を標識した蛋白質のみを特異的に結合させる手法である。DNA は配列情報を持っているので、配列を変えるだけで、新たな鍵を設計する事が可能であり、非常に多数の鍵を用意可能である。また、合成依頼した DNA 鎖を加工せずにそのまま用いる事が可能であるので、費用や手間の点でも有利である。さらに、配列を工夫する事で、キネティックスも含めて結合・解離のコントロールも可能であり(toe-hold 法、Zhang and Winfree 2009)、複合体の構成を動的に変えたい用途においては非常に有用な手法であると考えられる。一方、ハイブリは可逆反応であることから、濃度や配列の設計によっては解離する側に平衡が偏り、結果的に結合効率が低くなる可能性がある。また、DNA シートの形成自体にハイブリを利用しているため、鍵の配列が DNA シート形成を妨害する可能性がある。

②タグ蛋白-タグリガンドについては、共有結合性の Halo タグおよび SNAP タグの 2 つを検討した。共に、天然の酵素(Halo タグの場合は、バクテリア (*Rhodococcus rhodochrous*)の haloalkane dehalogenase 由来、Los *et al.*, 2008)を遺伝子改変し、反応中間体でリガンドがタグ蛋白質に共有結合したままにしたものである。リガンドは、DNA origami を作製する際の高い温度(~85 度)にも耐えられるので、タグリガンド付 staple を用いる事で、特定の場所に蛋白質結合用の鍵を定時させる事が可能である。Halo タグ、SNAP タグともに不可逆結合のため、最初に高濃度条件下で結合させておけば、低濃度条件であっても結合効率が高い状態が実現できる。また、Halo タグ蛋白については表面の Cys 残基が無いので、特定表面残基に色素結合用の Cys 残基を導入したキネシン分子と融合させて、FRET 観察が可能になると期待された。FRET 観察を用いれば、キネシンが運動に伴って観察される構造変化検出が可能となり(Tomishige *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2007)、個別の分子の活性を観察しながら、輸送複合体の運動を観察する事が可能になると期待される。なお、SNAP タグ蛋白については、結合速度が速いことが報告されている SNAP_f タグ蛋白を用いた。

実際のおおよその作製手順としては、①、②ともに下記の通りである。

1. M13mp18 と staple オリゴ DNA を混ぜ合わせる
2. PCR を使って、85°C に一度上げたのち 40 分かけて室温まで下げ(-1 度/30 秒)、シート DNA を形成させる
3. スピнкаラム(GE MicroSpin S-300HR)を用いて、フリーのオリゴ DNA を除去
4. 精製後の DNA シートと、アンチセンス鎖ないしタグ蛋白のついた蛋白質

の溶液を混ぜ、室温で結合させる

5. 過剰な蛋白質を除去する(2色同時観察による一分子観察時)

3-2-2) DNA シート-キネシン作製方法評価の手法

DNA シートに蛋白質を結合させる手法を比較検討するために、AFM による評価およびアガロースゲルの電気泳動による評価を行なった。本節では、各手法の概要および DNA シート-キネシンの評価を行なう上での手法の最適化について述べる。

3-2-2-1) AFM による測定

AFM(Atomic Force Microscopy, 原子間力顕微鏡)は、試料表面の凹凸を nm~Å レベルで測定するために開発された顕微鏡である。図 3-3 のように、AFM では、カンチレバーを高速に共振周波数にて振動させており、カンチレバーの先端にあるチップがサンプルに接すると、カンチレバーの振動が変化して表面を検知する。チップを 2 次元に走査させて、高さが変わると振動が変化するため、段差を測定することが可能である。振動の変化はカンチレバーにレーザーをあて、その反射光のポジションで検知している。チップが試料に接した時に振動が敏感に変化することから、非常に高精度で凹凸を測定することが可能である。また、微細加工技術を用いてチップの先端を先鋭化させることで、2 次元の分解能も高めている。一方で、高速に振動するカンチレバーを試料に押し当てることから、基本的には破壊測定である。また、試料をマウントする基板として、面精度が高い特別な基板を用いる必要がある。

AFM は、DNA ナノ構造の形状測定においてしばしば用いられる。本研究でも、DNA シートへの蛋白質結合の確認だけでなく、DNA シートの形状や孤立しているかどうかの確認にも用いた。

具体的な手順としては、3-2-1 に従って DNA シート-キネシンを作製したのち、十分に希釈した上で、AFM 測定用の基板上に吸着させ、測定を行なった。測定には、金沢大学の安藤敏夫研究室で開発され、生体分子計測研究所が販売している液中高速原子間力顕微鏡を用いた。

3-2-2-2) アガロースゲル電気泳動による測定

アガロースゲル電気泳動における移動度の違いを利用して、DNA シートとキネシンの結合定数の定量を行なった。結合させる時間を変えたサンプルを用意し、

それらのサンプルの結合比率を電気泳動で確認することで、結合比率の時間変化を追うことが可能である。Cy5 標識した DNA シートと Cy3 標識したキネシンを用い、蛍光ゲル撮影装置(GE 社、ImageQuant LAS4000)にてゲルを撮影した。泳動条件としては、 Mg^{2+} が多い方が DNA 構造は安定である半面、発熱が生じるため、TBE ベースの泳動条件において、ゲル中の $MgCl_2$ 濃度は高め(10 mM)にしつつ、泳動バッファーとしては $MgCl_2$ 2 mM を用いた。

最初に、通常 DNA の泳動で用いられる 1~2%程度のアガロースゲルにて、Halo タグで接続した DNA シート-キネシンを泳動させたところ、DNA シートの Cy5 側は 1 つのバンドしか見えず、Cy3 側では 2 つのバンドが分かれて見えたものの、明確に分かれておらず比率を計算するのは困難であった。そこで、バンドが明確に分かれる条件を検討したところ、0.2%のアガロースゲルを使うと Cy3 側のキネシンのバンドは明確に分かれることがわかった。しかし、この方法でも Cy5 側のバンドは分かれなかった。キネシンに対して DNA シートが非常に大きいことから、キネシンの結合によってもほとんど泳動度が変化しないためではないかと考えられる。そこで、Cy3 側のバンドを用いて結合比率の定量を行なった。一方、0.2%のアガロースゲルは非常に柔らかく、撮影前に変形してしまったことから、構造支持のために 1%アガロースゲルを作製した後、その上に 0.2%アガロースゲルを形成させた。また、サンプルをロードする際に確実に 0.2%アガロースゲル部分のみに apply するために、コームの高さを調整し、0.2%ゲル部分のみにウェルを作製した(図 3-4)。

Cy3 のキネシン側のバンドを用いた定量に関して、基本的には DNA シートの濃度に対して、より拡散しやすいキネシンをモル比で多めに混ぜ合わせたことから、直接的な結合効率の定量にならないことに注意が必要である。つまり、仮に DNA シートにキネシンが 100%結合していたとしても、フリーのキネシンのバンドは残ってしまうことから、DNA シートに結合したキネシンとフリーキネシンの比率から、間接的に結合効率を見積もる必要がある。泳動結果を安定させ比率をより正確に見積もるために、①DNA シートやキネシンを濃度調整してから、30 分ほど時間を空け濃度が均一化したのちに反応させる、②DNA シートやキネシンの溶液を低吸着処理したチューブで扱う、③DNA シートとキネシンを結合させる際に、吸着防止でカゼインを 50 μ g/ml 混ぜる、といった細かい工夫も行なった。

電気泳動後のゲルのイメージと強度プロファイルの代表的な例を図 3-5 に示す。具体的には、まず Cy3(キネシン)側の 2 つのバンドについて、DNA シートと一致したバンドの輝度を I_{bound} 、一致しない方のバンドの輝度を I_{free} とすると、全キネシンのうち DNA シートに結合する相対的な結合比率 R は、

$$R = I_{bound} / (I_{bound} + I_{free})$$

となる。DNA シート上の結合サイトの数に関わらず DNA シートとキネシンの結合を単純な 1 段階反応だと仮定し、結合比率の時間変化を指数関数で近似し結合速度

を見積もった。一方、各アッセイにおける DNA シートとキネシンの濃度比から理想的に結合効率が 1 だった時の結合比率 R_1 を予測できるので、十分反応時間が長かった場合の飽和結合比率 R_{sat} との割合 R_{sat} / R_1 が、DNA シート 1 分子に結合したキネシンの数の実測値となる。

3-2-3) DNA シートとキネシンの接続方法の検証

DNA シートとキネシンの接続方法の検証を行なった。まずは、DNA-キネシンと同様に、DNA 鎖のハイブリダイゼーションでの接続を試みたが、AFM で確認したところ、キネシンを過剰に加えた飽和状態においても DNA シートに対するキネシンの結合効率が悪かった(3 割程度)。続いて、Halo タグや SNAP タグの電気泳動で Bulk レベルでの結合定数の定量評価を行ない、Halo は結合速度が遅いものの、Halo、SNAP とも一定の結合速度と結合効率が得られることが確認できた。

3-2-3-1) DNA ハイブリダイゼーションによる接続

前述したとおり、DNA シート上には接続場所を設定できる箇所が 12 箇所あり、各々の場所において結合の鍵を提示するかどうかで、蛋白質が結合する場所を特定することができる、という特徴がある。まず AFM を用いて、蛋白質が DNA シートに結合する場所を、設計どおりコントロールできているかどうかを確認した。サンプルとしては、DNA シートは、キネシンを結合させたい位置からフリーのセンス鎖 20 nt を表面に提示させたもの、蛋白質は、第 2 章でも用いたキネシンのモノマー K336CLM 337C に 20 nt のアンチセンス鎖 DNA を標識したものをを用いた。1-3 箇所に同じ配列のセンス鎖を導入した DNA シートに対し、アンチセンス鎖を標識したキネシンを混ぜ合わせ、室温にて 3 h ほど置いた。その後適当な濃度に希釈して基板上に垂らして AFM で観察したところ、図 3-6 のように、センス鎖を導入した場所と DNA シート上のキネシンらしき白い点のパターンが一致したことから、想定した場所にキネシンを接続できていることが確認できた。

続いて、実際の実験系を想定し、キネシンダイマーの DNA シートへの結合効率がどの程度かを見積もった。サンプルとしては、DNA シートはそのままキネシンダイマーとして K490CLM 416C に 20 nt のアンチセンス鎖を標識したものをを使用した。まずアガロースゲル電気泳動での見積もりを試みたが、DNA シートのバンドと一致するキネシンダイマーをほとんど見られず、見積もりができなかった。この結果は、①キネシンのアンチセンス鎖と DNA シート上のセンス鎖を結合させる条件は比較的高濃度で、平衡がハイブリ側に傾いている状態に対して、泳動中は希釈された状態に 30 - 40 分ほど置かないといけないこと、②泳動中に電圧をかけると溶液

温度が上昇し、平衡がさらに解離側に傾きやすいこと、などにより、泳動中にキネシンが解離してしまった可能性が考えられた。そこで、次に AFM による見積もりを試みた。図 3-4A の結合サイトの 1、3、8 の位置からセンス鎖を出した DNA シートを用い、高濃度でキネシンと DNA シートを結合させた後に、十分に希釈して AFM で観察したところ、DNA シートにキネシンが結合している状態をはっきり観察することができた(図 3-7A)。続いて、各 DNA シートに結合しているキネシンの数をカウントし分布を見たところ、3 箇所ともにキネシンが結合している DNA シートは見られず、1 箇所のみないし全く結合していない DNA シートがほとんどであった(図 3-7B)。結合数ゼロが多いのは、キネシンが結合している側が基板に吸着し、その裏側の設計上キネシンが結合しない面を観察している DNA シートを観察しているためだと考えられるが、それを加味したとしても結合効率は高くないと考えられる。

以上から、DNA ハイブリダイゼーションを用いた接続方法は効率が悪く、DNA シートとキネシンを接続する方法としては適さないと結論付けた。

3-2-3-2) タグ蛋白-リガンドによる接続 (Halo/SNAP)

本セクションでは、タグ蛋白-リガンドによる接続方法である Halo タグ、SNAP タグの結合定数、結合効率の測定、および最適化を行なった。

まず、不可逆的な接続方法の優位性を確かめるため、前セクションと同様 AFM で結合効率を見積もり、比較を行なった。AFM の観察で結合定数を見積もることは難しいものの、ハイブリによる接続方法との結合効率の比較は可能である。サンプルとしては、DNA シートとしては前セクションでの検討と同様 1、3、8 の位置に Halo タグリガンドを提示したもの、キネシンダイマーとしては K490CLM 216C に Halo タグを融合させたものを用いた。DNA シートとキネシンを混ぜ合わせ 3 h 室温に置いた後 AFM で観察し、DNA シートに結合しているキネシンの数をカウントした(図 3-8)。その結果、ハイブリでの接続と比べ、2 箇所、3 箇所にキネシンが結合している DNA シートが多数見られた。3 箇所の各結合サイトへの結合は独立・無相関の反応で、かつすべて同じ確率で結合すると仮定し、フィッティングにより結合効率を見積もると 0.8 となった。ただし、キネシンが結合する面が基板と結合している DNA シートについては結合数が実際よりも少なく見積もられる可能性があることから、結合効率や結合定数の定量は生化学的な手法を用いる必要がある。以上から、Halo タグによる接続は DNA ハイブリでの接続より結合効率が高いことがわかったが、この結果はハイブリでの接続が可逆的なのに対し、Halo タグでの接続が不可逆であるためだと考えられ、希釈した状態で結合効率を高めるには不可逆的な接続方法を用いることが不可欠であることを示している。

AFM にて結合効率が比較的高いことがわかったが、本研究ではさらに結合効

率を高めるために、1箇所の結合サイトから1つの Halo/SNAP タグリグンドが出る、という通常の手法の代わりに、1箇所のサイトから3つの Halo/SNAP タグリグンド (Halo x3 および SNAP x3 タグリグンドと表記)を提示できるものを用いた。SNAP x3 タグリグンドを用いて図 3-7 に示した方法で DNA シートに結合するキネシンの数を測定したところ、通常の SNAP タグリグンドだと、3箇所の結合サイトをもつ DNA シートにキネシンドイマーを結合させた時、結合したキネシンの数が 2 - 2.5 個と、期待される 3 個より少し低かった。一方、SNAP x3 タグリグンドを用いると、2.5 - 3 個と結合効率が高かった(図 3-9)。一方、結合速度自体は大きな違いはなかった。DNA シートを用いた複合体構築においては、多数の蛋白質を1つの複合体に結合させるケースも想定されるため、結合効率ができるだけ 1 に近い方が望ましいことから、Halo x3/SNAP x3 タグリグンドを用いることとした。これ以降は、特に断らない限りは Halo x3/SNAP x3 タグリグンドを用いた。

反応速度について、蛋白質同士の結合など、数ナノレベルの分子同士の結合に Halo タグや SNAP タグを用いた際の結合速度が十分速いことが知られているのに対し、本研究で用いた DNA シートは非常に大きく拡散が遅く、さらに DNA シート上の結合サイトが限定、固定されていることから、DNA シート上の結合サイトとキネシンが接触する過程が律速過程であると予想される。一方、DNA 二重鎖自体は表面にマイナスチャージをもっているために DNA ナノ構造体の表面は基本的にマイナスチャージを持つことから、DNA ナノ構造体との衝突確率はイオン濃度に大きく依存すると考えられる。そこで、反応速度にとって最適な塩濃度、特に一価イオンの K^+ 濃度を検討した。なお、二価イオンである Mg^{2+} については、DNA 構造体の安定性に関わっており、低いと構造体が支持できない可能性があるのに対し、逆に高すぎると DNA 構造体同士がスタックしてしまう可能性があるため、生成時と同じく 10 mM に固定した(50 mM まで増やしても速度が大きく変わらないことは確認)。Halo/SNAP 共に結合サイトが1箇所(図 3-2A の 1)だけ出た K^+ 濃度を 20 - 100 mM まで変えたところ、Halo タグ、SNAP タグともイオン濃度が低い 20 mM の条件で反応速度が速いことが確認できた(図 3-10)。また、DNA シート 1 分子に結合したキネシンの数(結合効率)も 1 に近く、高い効率かつ一定の速度で結合が可能であることが確認できた。

Halo タグと SNAP タグの結合速度を比較するため、速度定数を測定した。具体的には、DNA シートに対し濃度過剰な条件下でキネシンの濃度比を変えながら、結合速度を測定して、濃度に対する運動速度の傾きを速度定数として定量した(図 3-11A)。その結果、Halo タグに対して SNAP タグの方が、3 - 4 倍ほど結合速度が速いことがわかった(図 3-11B)。これは、Halo タグ単体の等電点が 4.9 であるのに対して(キネシンとの複合体は 5.2)、SNAP タグ単体では、6.0 であり(キネシンとの複合体は 5.6)、この影響がでていると考えられる。

今までの測定は、片方のタグ蛋白質(Halo タグのみ、SNAP タグのみ)と融合したキネシンのコンストラクトを用いて行なったが、実際の検討はDNAシート上にHalo タグリガンド、SNAP タグリガンドの両方を配置し、Halo タグ蛋白、SNAP タグ蛋白両方を融合させた蛋白質を混ぜて行なうことが想定される。そこで、予期しない Halo タグリガンド-SNAP タグ蛋白、または SNAP タグリガンド-Halo タグ蛋白のクロスでの結合が生じないことを確認した。Halo/SNAP タグリガンドを結合サイトから出したDNAシート 15 nMに対して、SNAP/Halo タグ蛋白キネシンを 120–125 nM と過剰に入れた条件で 6 h 置いて、電気泳動で確認したところ、DNAシートと一致するキネシンのバンドは見られなかった(図 3-12)。よって、予期しないクロスでの接続はほとんど生じないと結論付けた

3-2-4) 作製方法まとめ

DNA シート-キネシンの作製は、3-2-1)に記載の手順に従って行なった。DNAシートとキネシンの接続方法については、DNA ハイブリダイゼーションを用いた接続は適さないことがわかったため、Halo タグと SNAP タグを用い $[K^+] = 20 \text{ mM}$ 条件下で結合させることにした。以上により、高効率かつ一定以上の速度で、DNAシート上の特定の場所にキネシンを結合させることができる。

3-3) DNA シートキネシンの一分子蛍光観察への導入

第 2 章にて、DNA 二重鎖-キネシンについて検証済みであることから、DNA がキネシンの活性そのものや一分子蛍光観察に影響を及ぼさないことについては確認済である。一方、DNA 二重鎖-キネシンと DNA シート-キネシンで DNA 構造体の大きさが全く異なることから、DNA シートの非特異的吸着の影響については再度検証を行なう必要がある。特に、DNA シート全体はマイナスチャージを帯びていることから、非特異的吸着を防ぐにはイオン濃度を適切に設定することが重要である。また、運動性能の解析にあたり、DNA シート-キネシン同士が観察条件下で多量体化せず、1 分子として孤立しているかどうかを確認する必要がある。

本節では、適切なイオン濃度の検討および DNA シート-キネシンが 1 分子であることの確認を行なった。

3-3-1) 観察条件

蛍光一分子観察時の溶液条件、観察条件については、基本的には DNA 二重鎖-キネシンの観察条件を踏襲した。観察時のイオン条件については、DNA 二重鎖-キネシンの場合と同様、DNA シートの構造安定性を確保するため、 Mg^{2+} が 5 mM の状態で観察を行なった。一方、一価イオンの K^+ については、低い条件で観察を行なったところ、ガラス面への非特異的吸着が目立った。DNA シートのマイナスイオンが一因と考え、 K^+ を 100 mM に上げたところ非特異的吸着が改善したことから、 $[K^+] = 100 \text{ mM}$ で観察を行なった。

3-3-2) DNA シート-キネシンの一分子観察の確認

DNA シートが 1 分子で観察できているか確認するため、また観察時に DNA シートに結合するキネシンの数が想定通りか確認するため、蛍光の輝度分布を測定した。

DNA 二重鎖-キネシンと同様、AMPPNP 条件下で DNA シート-キネシンを軸系上に固定し退色させた分子の明るさを 1 分子の明るさとみなし、ATP 条件下で運動する DNA シート-キネシンの蛍光の明るさと比較することで 1 分子にあたるかどうかを調べた。また、キネシンの接続数を 3 箇所にしたキネシンについても ATP 条件下での蛍光の明るさを測定し、DNA シートの明るさが 1 分子相当なのに対し、キネシン側の明るさが想定通り 3 分子相当になるかどうかを調べた。接続方法としてはキネシンの CLM を用いることができる Halo タグ、キネシンとしては K490CLM 215C を用いた。DNA シートを Cy5、キネシンを Cy3 で標識し、514 nm と 635 nm

で励起して、DualView 装置を用いて観察を行なった(図 3-13)。

DNA シートとキネシンを結合させる際、モル比でキネシンを多めに入れるため、最終的にフリーのキネシンが残る。キネシンを色素標識しない場合は問題ないが、本検討は Cy3 標識するため、フリーのキネシンが観察の邪魔になってしまう。そこで、フリーのキネシンを除去するために、スピнкаラム(GE MicroSpin S-300HR)を用いてフリーのキネシンの除去を試みた後に観察を行なった。

Halo タグリガンドの接続が 1 箇所の DNA シート-キネシンを AMPPNP 条件下および ATP 条件下、さらに接続が 3 箇所のを ATP 条件下で観察し、2-4-2 と同様の方法で明るさの定量を行なった(図 3-14)。その結果、Cy5 の DNA シート側については、どの条件においても同様の明るさ分布になり、1 分子であることが確認できた。一方、Cy3 のキネシン側については、接続が 1 箇所のは、一部 Cy3 蛍光が観察されない DNA シートがあったもののおおむね AMPPNP 条件下に分布が近かったのに対し、接続が 3 箇所のは 3 分子相当の明るさと思われる輝点もあるものの、2 分子、1 分子と思われる分子の方が多かった。3-2 の測定では DNA シート上の Halo タグリガンドと Halo タグ蛋白を融合させたキネシンの結合効率が高かったことから、本検討ではキネシンの標識ないしフリーの分離がうまくいっていない可能性がある。キネシン単独で測定した時の標識率は 90%以上であることから、フリーの分離がうまくいっていない、つまりフリーのキネシンだけでなく DNA シート上のキネシンもスピнкаラムの過程で、Halo タグリガンドの伸びたオリゴ DNA ごと抜けてしまっている可能性がある。キネシンが抜けないように、キネシンが吸着しにくい溶液条件でスピнкаラムを行なったところ、今度はフリーのキネシンが多すぎ一分子観察が困難であった。フリーのキネシン除去条件の最適化は今後の課題である。

以上から、DNA シートに関しては 1 分子で運動していることが確認できた。キネシン側については、フリー除去の過程が最適化できなかったことから、これ以降の運動性能の検討は無標識のキネシンを用い、フリーのキネシンの除去をせずに行なった。

3-4) 結合する蛋白分子の数・種類による運動性能変化

続いて、DNA シートに結合した分子の数・種類による DNA シート-キネシン複合体の挙動の変化を観察した。

3-4-1) 結合するキネシンの数による運動性能の違い

まずは、野生型キネシンの数を変化させた時の運動を検証した。キネシンとしては K490CLM に Halo タグ蛋白質を融合させたもの、DNA シートは、結合サイトとして図 3-4 のポジション 1 - 9 のうち 1 ~ 9 箇所 に Halo タグリガンドを提示したものをを用いた。具体的な結合サイトとしては、1 箇所 のものは 1、3 箇所 のものは 1、2、3、9 箇所 のものは 1-9 全てを用いた。運動を観察したところ、DNA シート-キネシンの運動速度はキネシン結合サイトの数を変えてもほぼ同程度なのに対し、連続歩行距離については結合サイトが増えるほど長くなる様子が観察された(図 3-15)。第 2 章で用いた解析と同様の方法で運動速度や連続歩行距離の定量を行なったところ、1、3、9 箇所の結合サイトをもつ DNA シート-キネシンの運動速度が 490、533、557 nm/s と大きく変わらなかったのに対し、連続歩行距離は 0.5、1.4、4.0 μm と大きな違いが見られた(図 3-16)。野生型キネシンの K^+ 100 mM 条件下での運動速度、連続歩行距離がそれぞれ 550 nm/s, 0.8 μm であることを考えると、複合体にキネシンが複数個結合することにより、運動速度は変化しないが連続歩行能力については上昇することがわかった。

ただ、野生型はもともと単独で運動することから、連続歩行距離が伸びたという結果は、単純に複合体が軸糸から外れにくくなった、つまり、複合体内のキネシンの数が多いほど少なくともそのうちのひとつが軸糸に結合している確率が高くなった結果であり、結合させたキネシン同士が複合体内で協調しあったためだとは必ずしも言えない。そこで、DNA シート上のキネシン分子が協調しうるのかを探るため、単独では運動しないキネシンとして、キネシンモノマーを結合させた時の運動を検証した。用いた試料としては、DNA シートはダイマーのケースと同じ、キネシンとしては純粋なモノマーではなく、キネシンダイマーの 2 つの頭部のうち、片側の頭部のみ除いたヘテロダイマー(片足キネシン)を用いた。この片足キネシンはコイルドコイルの部分はダイマーと同様残っており、頭部が 1 つ欠けている以外の要因については、ダイマーのケースと条件が同じため、結果の比較が容易である。運動を観察したところ、片足キネシンを 1 箇所だけ接続した場合はキネシンモノマーと同様に、軸糸上に短時間滞在した後運動せずすぐに外れてしまったが、3 箇所、9 箇所接続した DNA シート-キネシンはキネシンモノマーと異なり運動を見せた(図 3-17)。運動性能は、3 箇所、9 箇所接続したものについて、それぞれ運動速度

が、360 nm/s、321 nm/s、連続歩行距離が 0.6 μm 、1.1 μm となり、連続歩行距離はダイマーの場合と比較してかなり短くなったものの、運動速度は半分強と予想外に高い運動性能を見せた(図 3-18)。

3-4-2) 結合するキネシン種類による運動性能の違い

続いて、異なるタグを用いれば異なる蛋白質が結合できる、という DNA ナノ構造体の特徴を生かし、DNA シートに運動性能の異なる複数種のキネシンを接続し、複合体の構成分子の変化による運動の変化を観察した。具体的には、野生型キネシンに加えて、ATP 加水分解が非常に遅い変異体(K490CLM E237A)を混ぜ合わせた。DNA シートの 1 - 9 のポジションに SNAP/Halo タグリガンドのいずれかを接続し、SNAP タグで結合された野生型キネシンの中に、Halo タグで結合された加水分解の遅い変異体を 1 箇所ないし 3 箇所接続させて、運動の変化を確認した。運動を観察したところ、変異体を混ぜた時は、運動速度が落ちてしまうことがわかった(図 3-19)。具体的に、1 箇所に変異体が混じっている時は 110 nm/s、3 箇所の場合は 44 nm/s と、変異体が多くなるほど運動性能が低下することがわかった。

以上の結果から、Halo タグと SNAP タグの両方を使うことによって、複数種のキネシンを DNA シート上に接続できていること、また複合体を構成する分子の種類や数による運動性能の変化を評価できることが確認できた。

3-5) 結果まとめ

本研究では、分子間協調を調べるための手法として、蛋白質分子の種類・数や接続場所を制御した DNA ナノ構造体-蛋白質に着目し、その最初のステップとして、キネシン分子の種類・数や接続場所を制御した DNA シート-キネシンの再構成、およびその運動性能評価を行なった。AFM や電気泳動による評価により、Halo タグおよび SNAP タグを用いて、DNA シート上のキネシンの結合数や場所を制御できることを確認できた。さらに、蛍光一分子観察により DNA シート-キネシンに複数種の蛋白分子を配置できること、ならびにキネシンの結合する数や種類の違いによる運動性能の変化を評価できることを確認できた。

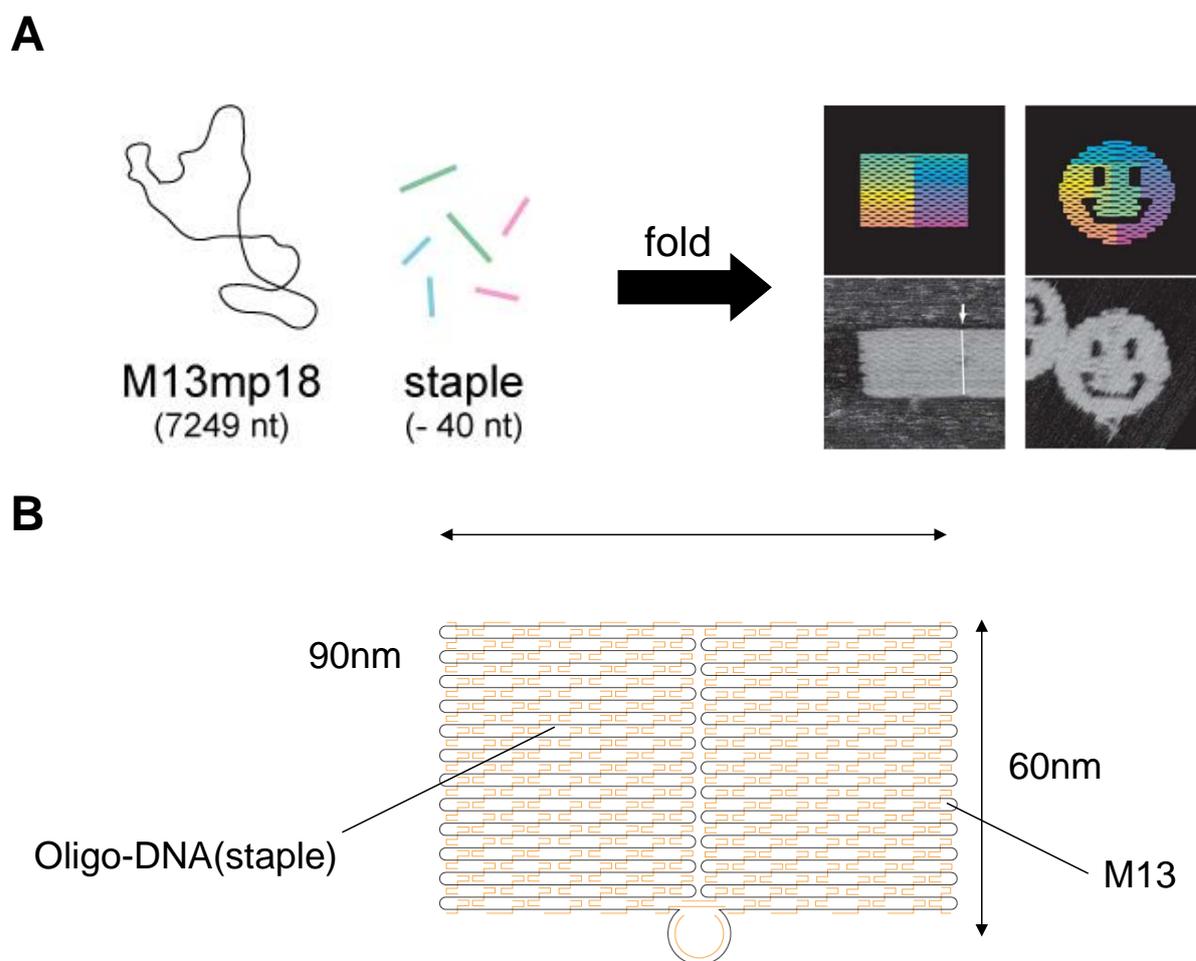


図 3-1 DNA シート

A) DNA origami を用いた DNA ナノ構造の例。Rothemund 2006 より転載許可を得て転載。 B) DNA シートの概要。

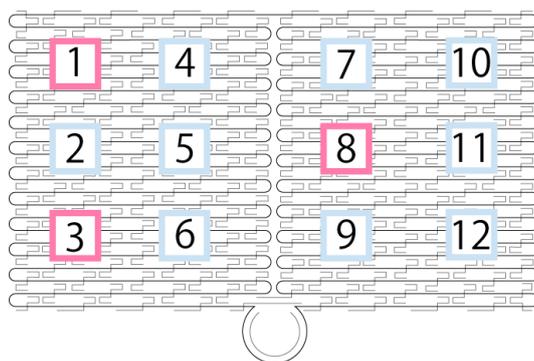
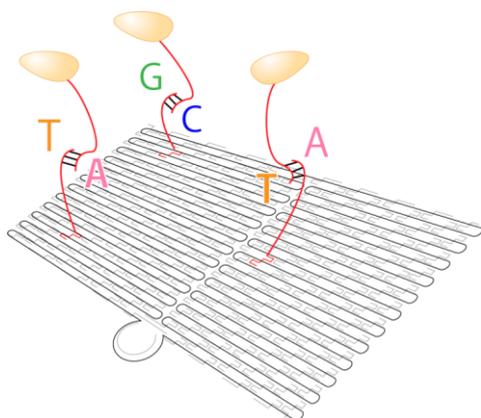
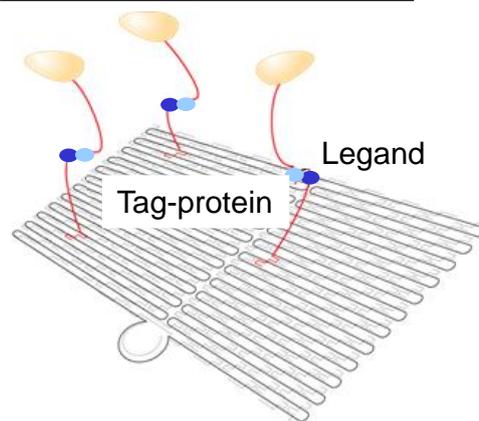
A**B**①DNAハイブリダイゼーション②タグ蛋白質/タグリガンド

図 3-2 DNA シートへの蛋白質の接続

- A) DNA シート上で蛋白質と接続する鍵を配置することができる 12 箇所のサイト。
B) DNA シートと蛋白質を接続する 2 つの手法。

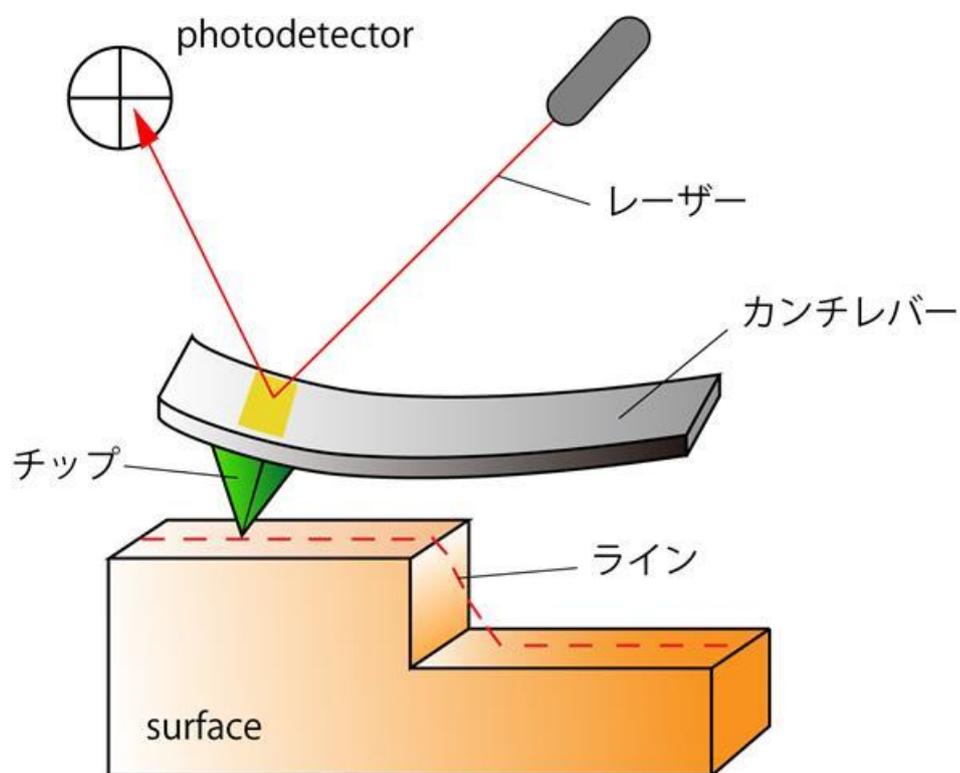


図 3-3 AFM(Atomic Force Microscopy, 原子間力顕微鏡)の概要

カンチレバーの振動の変化をカンチレバー表面で反射させたレーザーで測定することにより、高精度でサンプル表面の凹凸を測定することが可能である。

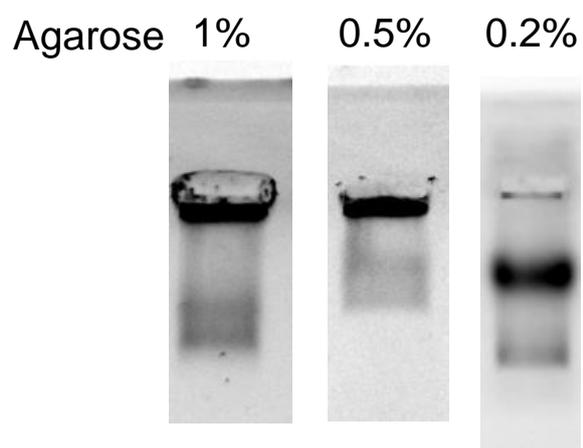
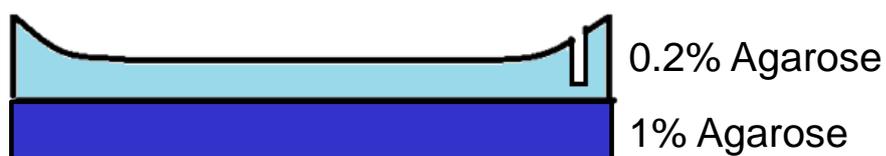
A**B**

図 3-4 アガロースゲル電気泳動

A) アガロース濃度によるキネシン単体(上)とキネシン+DNA シート(下)のバンドの分離の違い。アガロース濃度が低いほど、2つのバンドは明確に分かれる。 B) 本研究で用いたアガロースゲルの断面。1%アガロースゲルを作製した後、その上に0.2%アガロースゲルを形成させた。

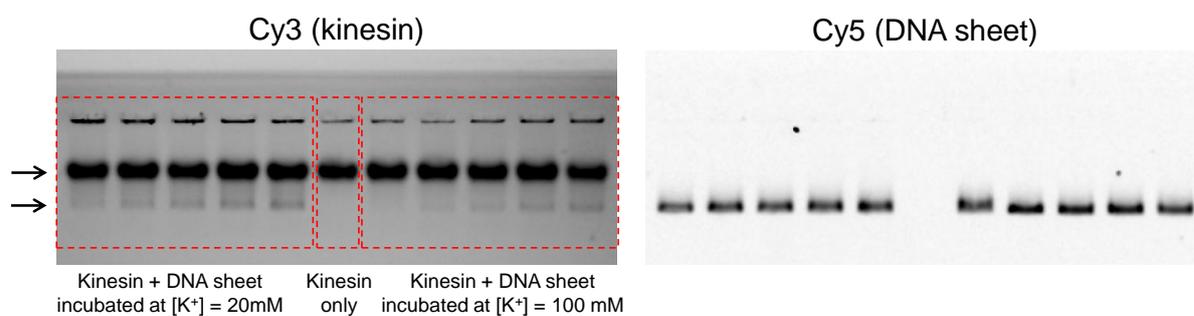
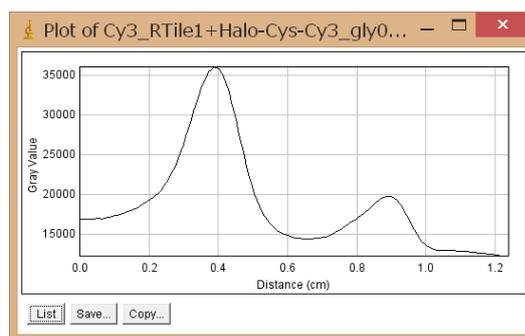
A**B**

図 3-5 電気泳動結果の解析

A) 電気泳動後のゲルを撮影したイメージの一例。DNA シートのバンドと一致する Cy3 の下のバンドが、DNA シート+キネシンのバンド。 B) 1 つのレーンの強度プロファイルの一例。ピークがはっきりわかれている。

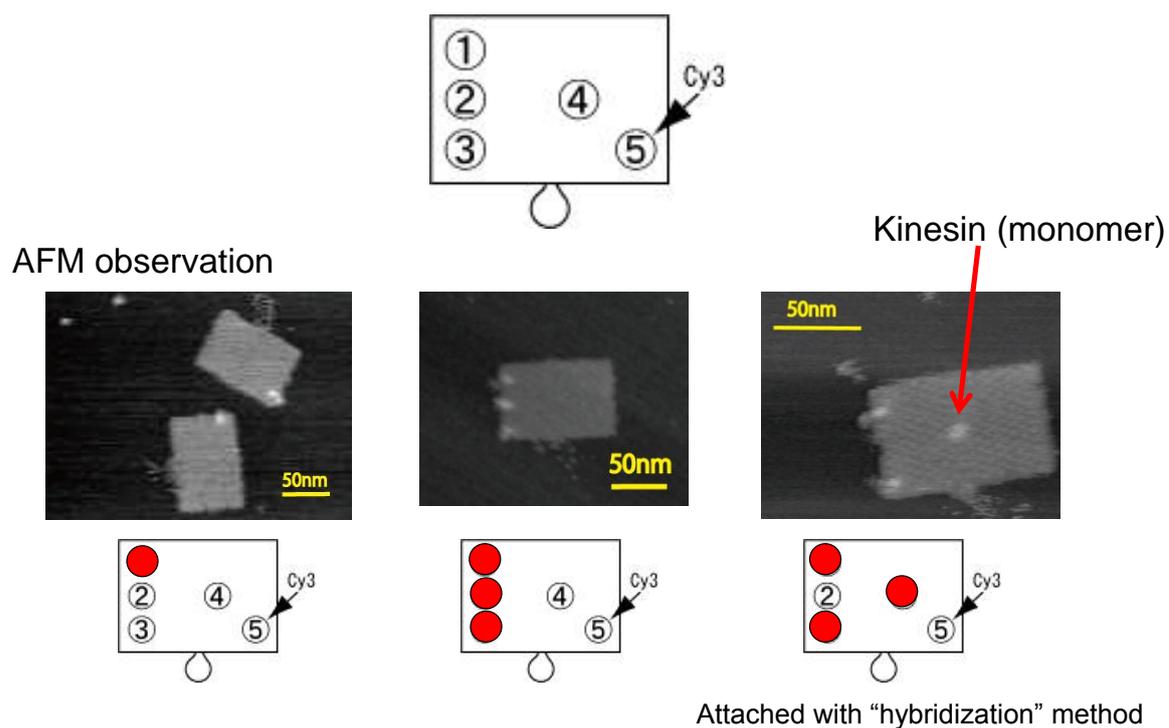


図 3-6 キネシンの接続場所の確認

AFM により、DNA シート上のキネシンモノマーを、白い点として検出できている。設計どおりの場所に接続していることがわかる。

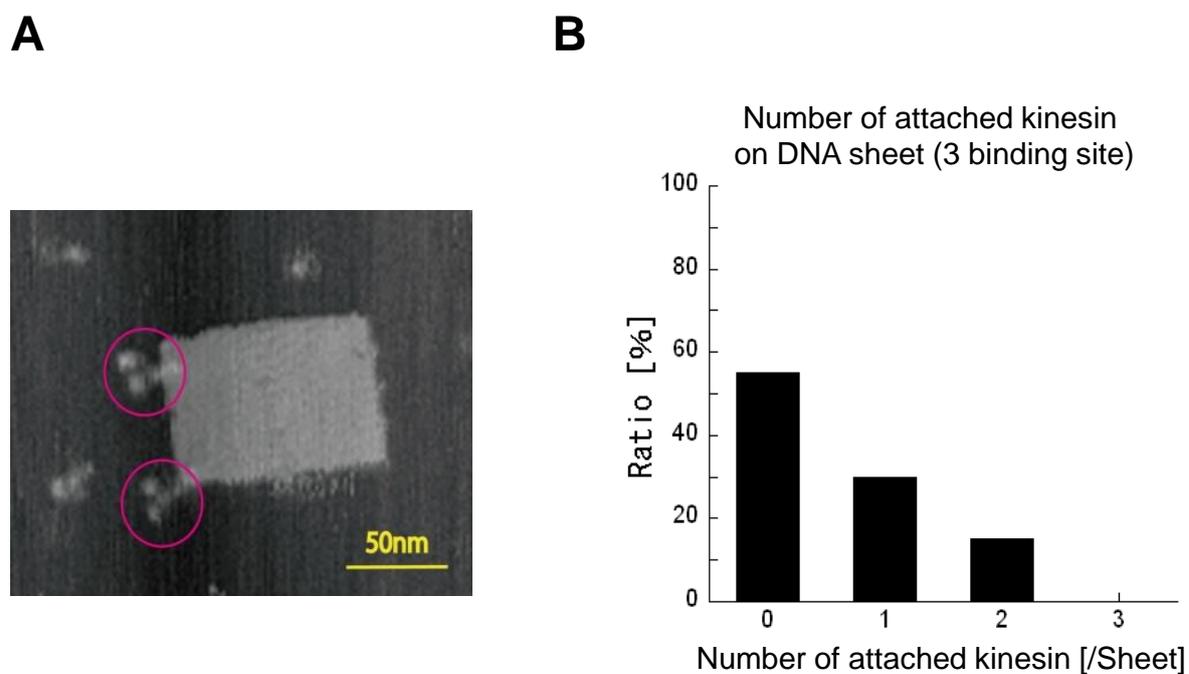


図 3-7 DNA ハイブリダイゼーションによる接続の結合効率

- A) AFM により DNA シートに結合するキネシンダイマーをイメージングできている。
B) 結合数をカウントした結果、結合効率が低いことがわかった。

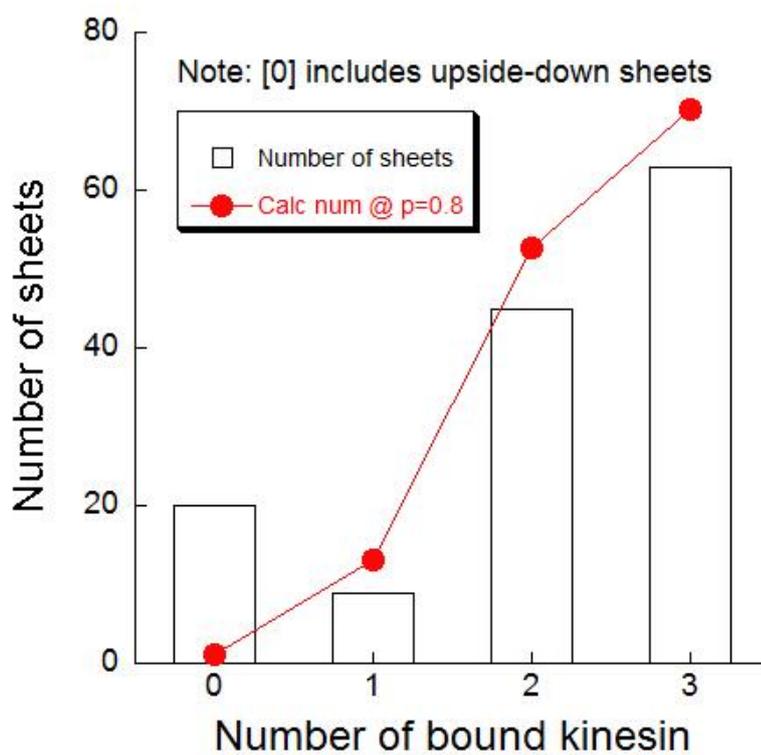


図 3-8 Halo タグによる接続の結合効率

Halo タグにより DNA シートに結合するキネシンドイマーの数を、AFM によりカウントした。ハイブリダイゼーションによる接続より効率が低い。

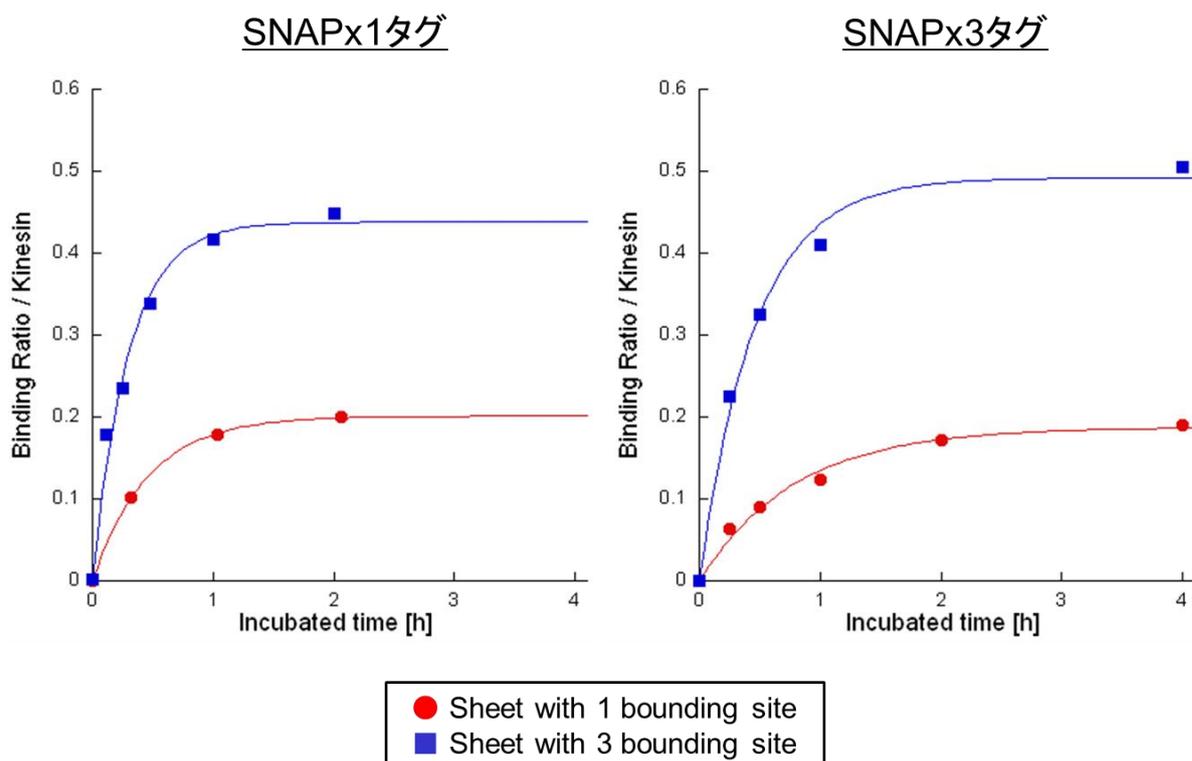


図 3-9 SNAPx1 タグと SNAPx3 タグの結合効率の違い

SNAPx1 タグと SNAPx3 タグを用いて、1 箇所(赤)、3 箇所(青)の結合サイトをもつ DNA シートとキネシンを結合させた時の結合効率を比較した。十分な時間置いた後の、2 つの DNA シートにおける結合効率の比が、SNAPx1 タグは約 2.1 倍だったのに対し、SNAPx3 タグは約 2.6 倍であった。

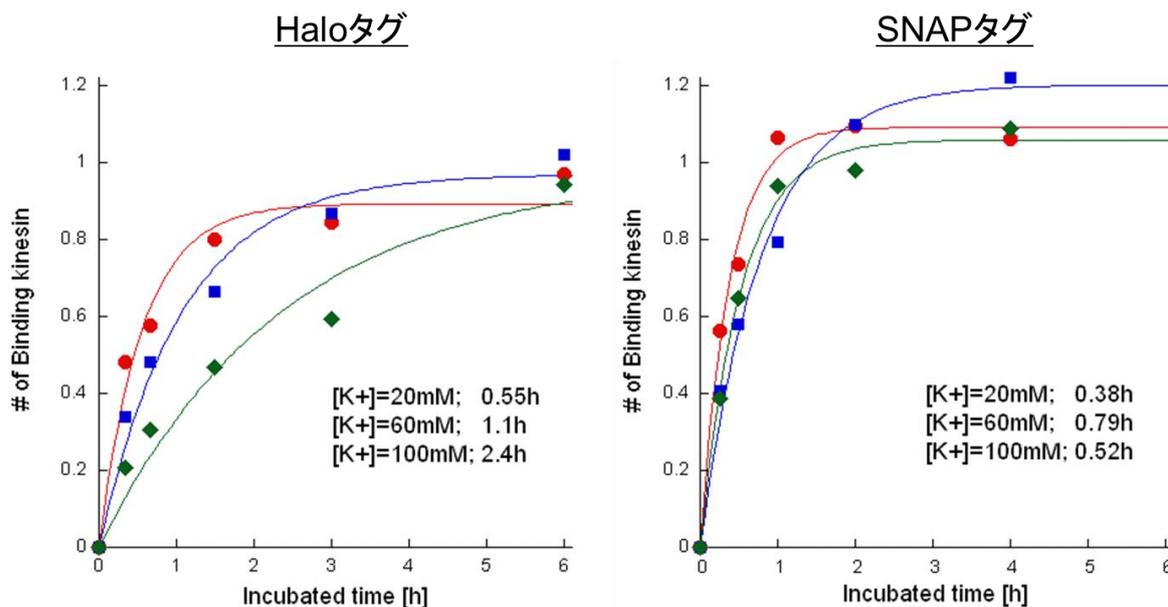


図 3-10 イオン濃度による結合速度の違い

Halo/SNAP タグリガンドの結合サイトを 1 箇所もつ DNA シートとキネシンを結合させた時の結合速度を、K⁺濃度 20、60、100 mM の 3 つの条件で比較した。フィッティングで平均結合時間を求めた結果、イオン濃度が低い条件が最も結合速度が速いことがわかった。

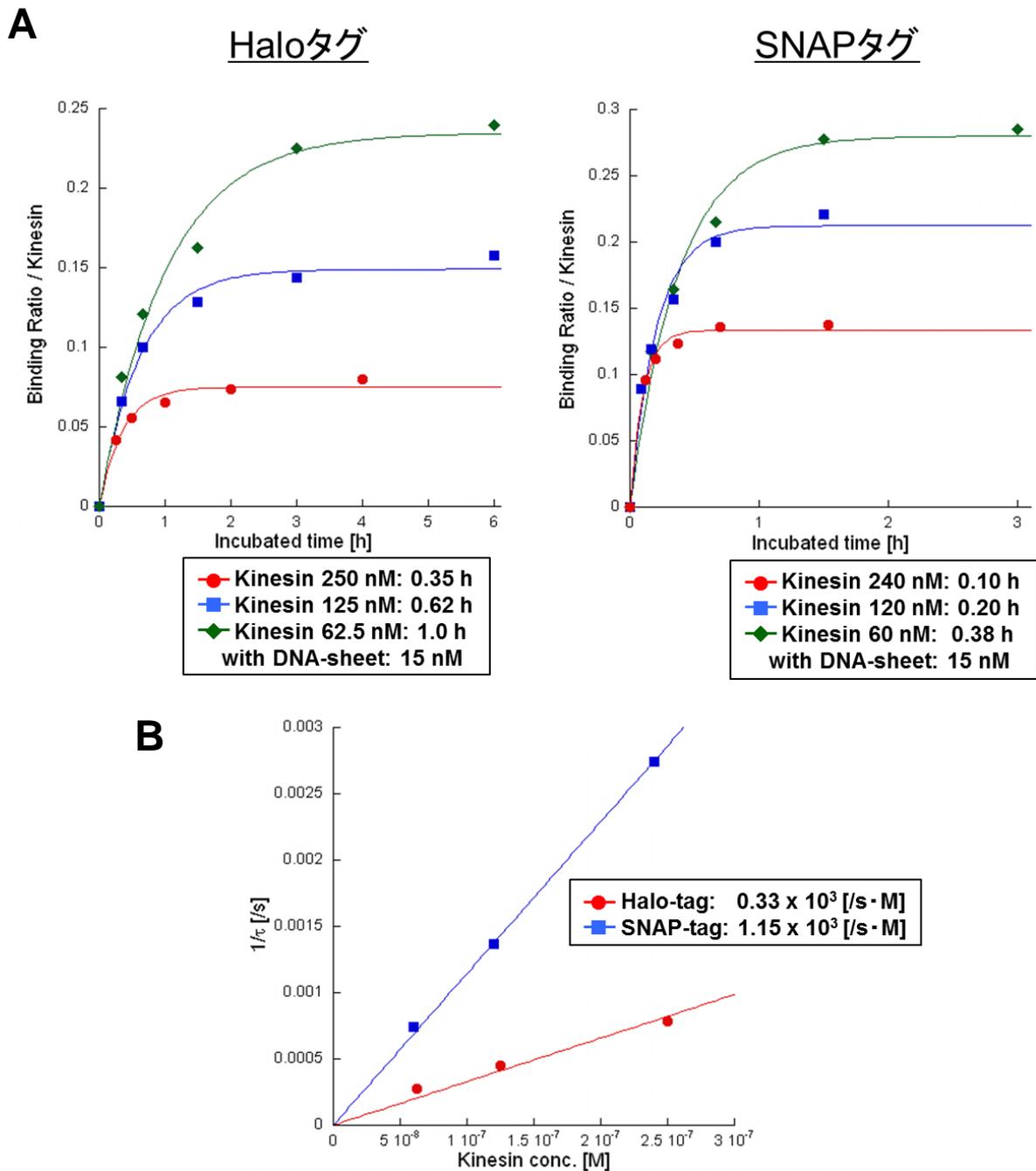


図 3-11 Halo タグと SNAP タグの結合定数の比較

A) DNA シートとキネシンのモル比を 4~25 倍の範囲で変えた時の平均結合時間を測定した。B) キネシン濃度を横軸、結合速度(=平均結合時間の逆数)を縦軸にとり、線形近似した傾きから速度定数を求めた。

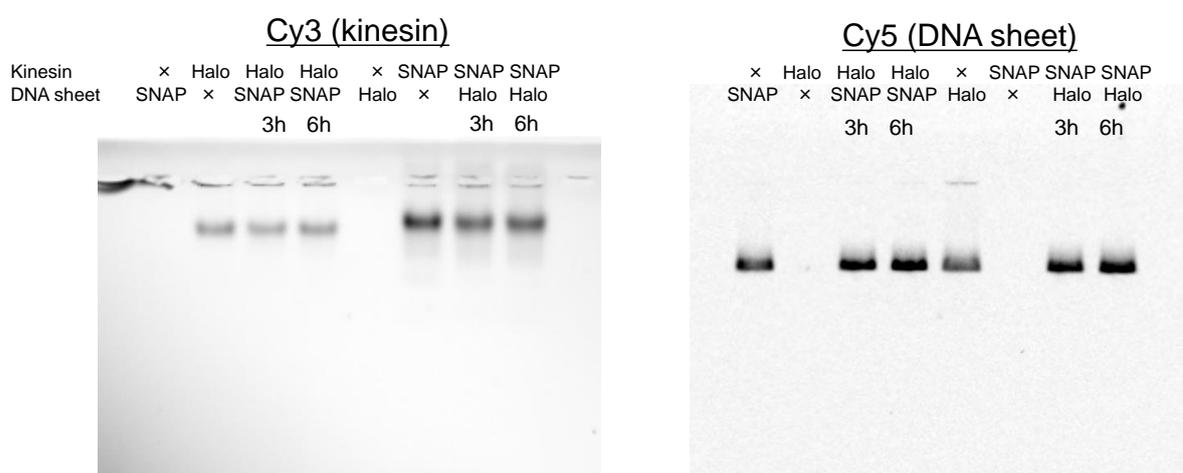


図 3-12 Halo タグと SNAP タグのクロスでの接続の確認

Halo タグリガンド-SNAP タグ蛋白、ならびに SNAP タグリガンド-Halo タグ蛋白の予期しない結合がないか、DNA シートとキネシンの組み合わせをクロスさせて確認を行なった。どの条件においても DNA シートとキネシンで一致する明確なバンドは見られなかった。

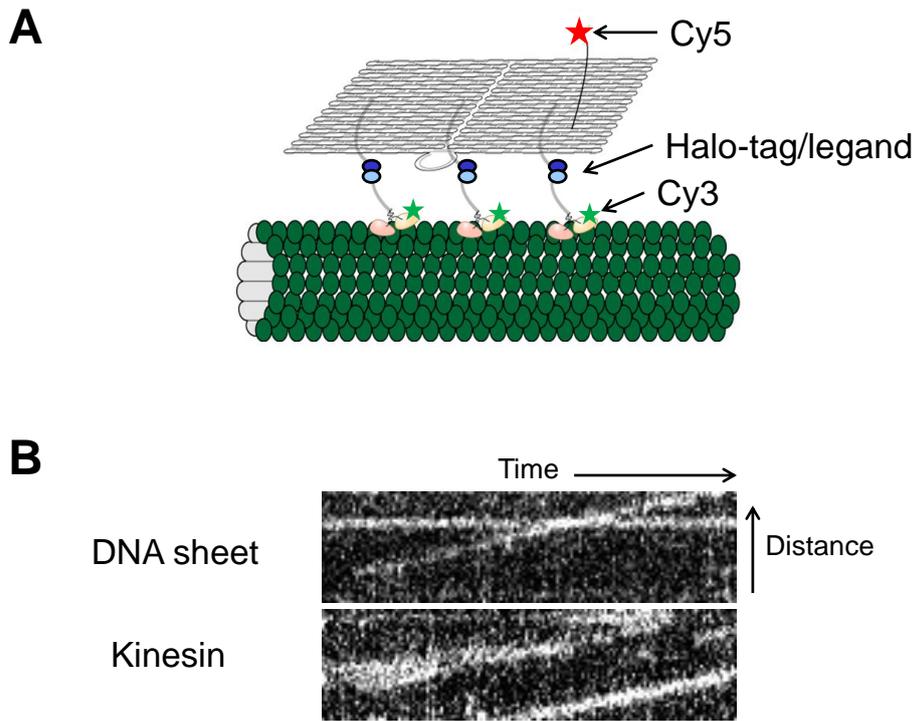


図 3-13 DNA シート-キネシンの一分子蛍光観察

A) 運動観察時の DNA シート-キネシンの概要図。 B) Cy5 の DNA シートと Cy3 のキネシンの輝点が同時に運動するカイモグラフ。Dualview 装置により 2 色同時に観察した(図 2-9 を参照)。

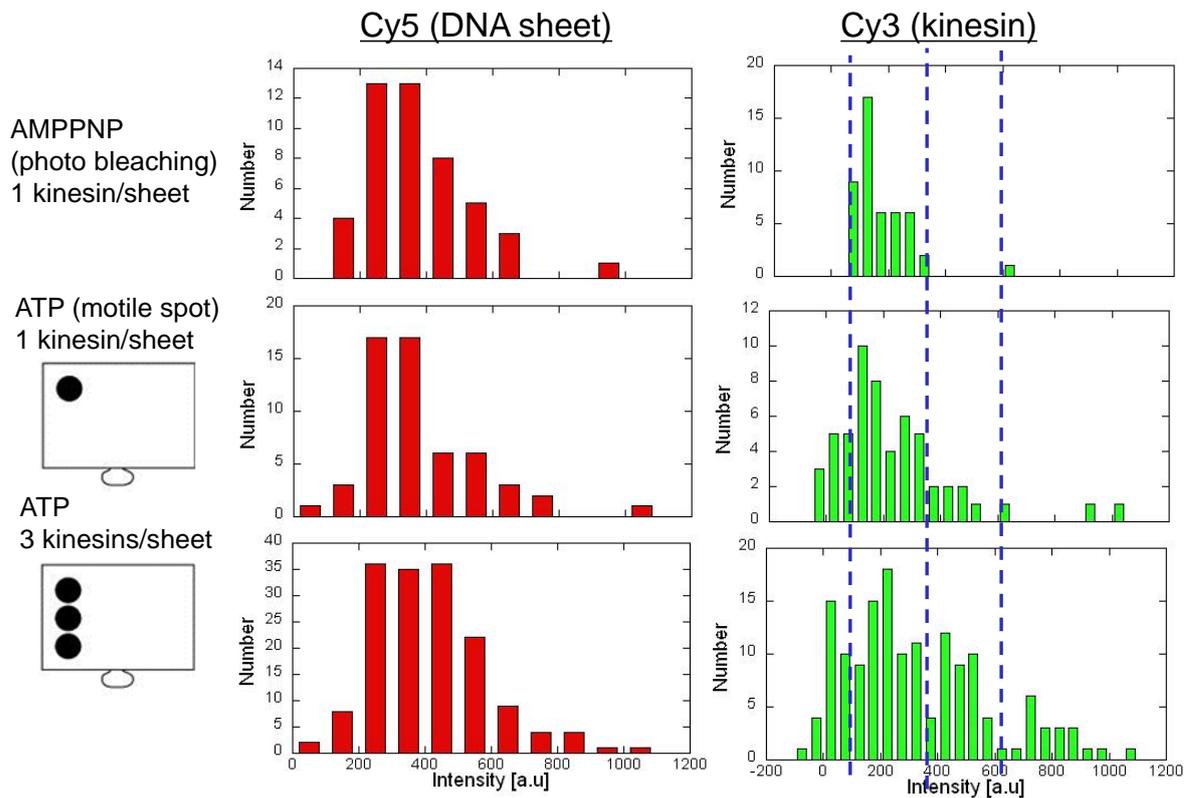


図 3-14 DNA シート-キネシンの 1 分子の確認

AMPPNP 条件は Cy3 と Cy5 の輝点が一致し、かつ別々のタイミングで退色した分子、ATP 条件は Cy3 と Cy5 の輝点が一致した分子について明るさを定量した。Cy3 のグラフ上の点線は、0 - 3 個の Cy3 分子に相当すると思われる明るさの境界を示した。

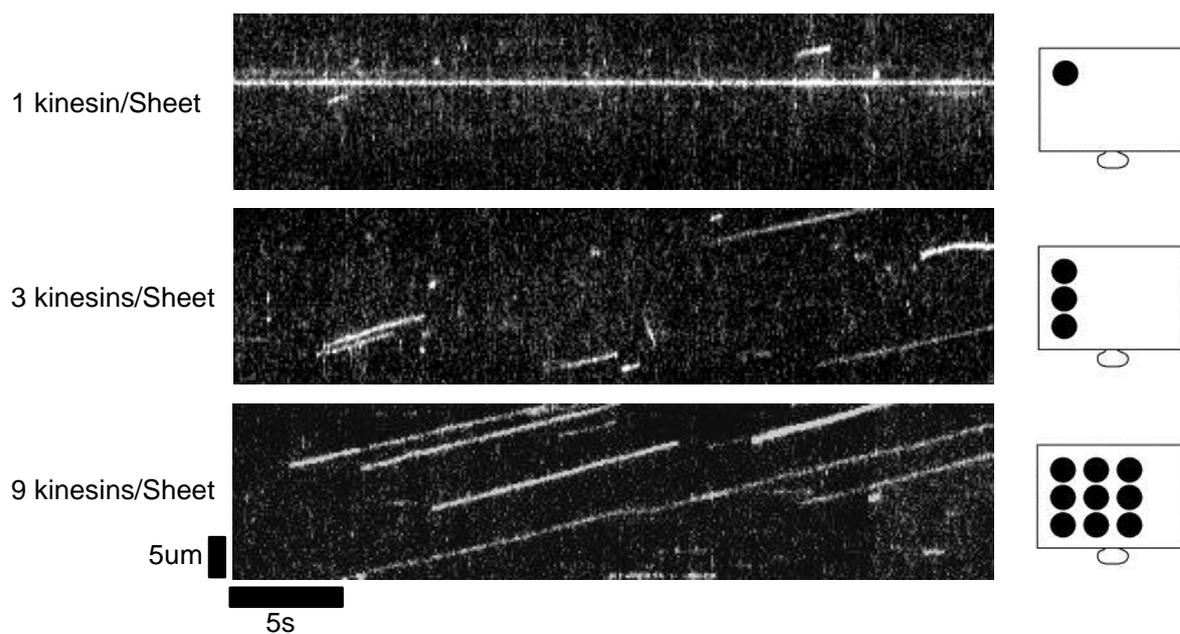


図 3-15 DNA シートのキネシンダイマー結合数によるカイモグラフの変化

Halo タグリガンドを 1、3、9 箇所出した DNA シートと、Halo タグ蛋白を融合したキネシンを混ぜ合わせ運動を比較したカイモグラフ。画像は DNA シートに標識した Cy5 の輝点。

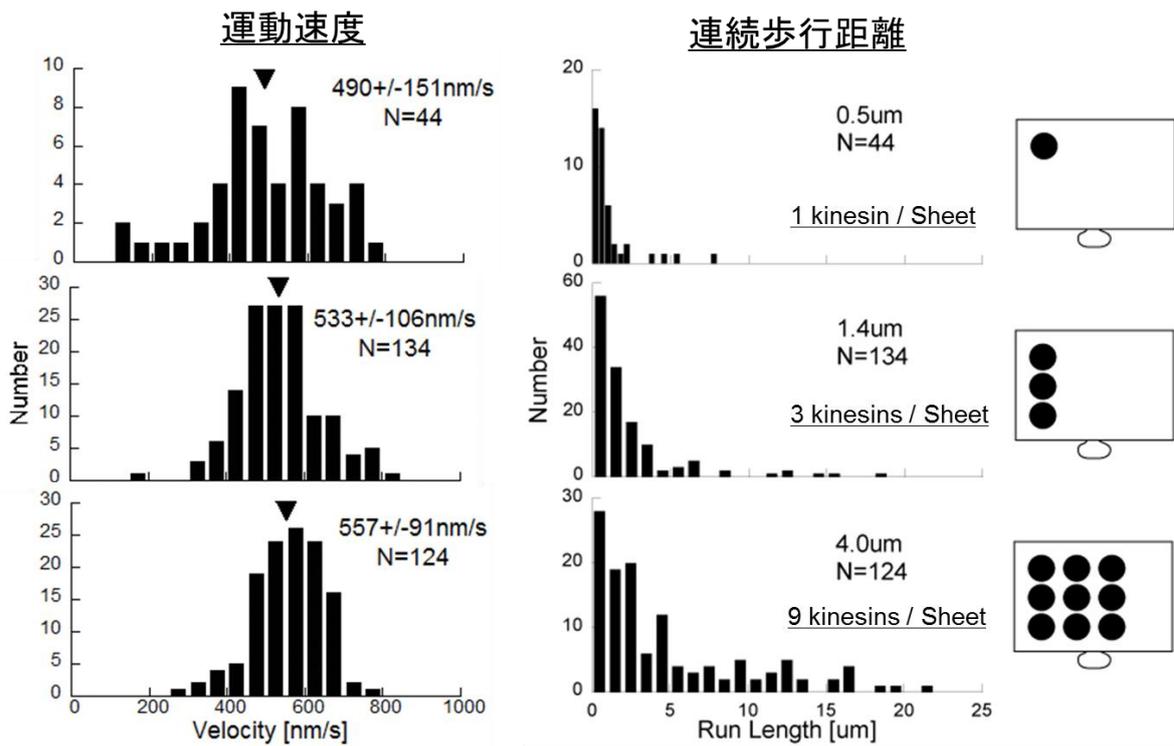


図 3-16 DNA シートのキネシンダイマー結合数による運動速度・連続補強距離の変化

Halo タグリガンドを 1、3、9 箇所出した DNA シートと、Halo タグ蛋白を融合したキネシンを混ぜ合わせ運動を比較した運動速度と連続歩行距離。運動速度は単純平均、連続歩行距離は Single exponential のフィッティングにより平均値を求めた。

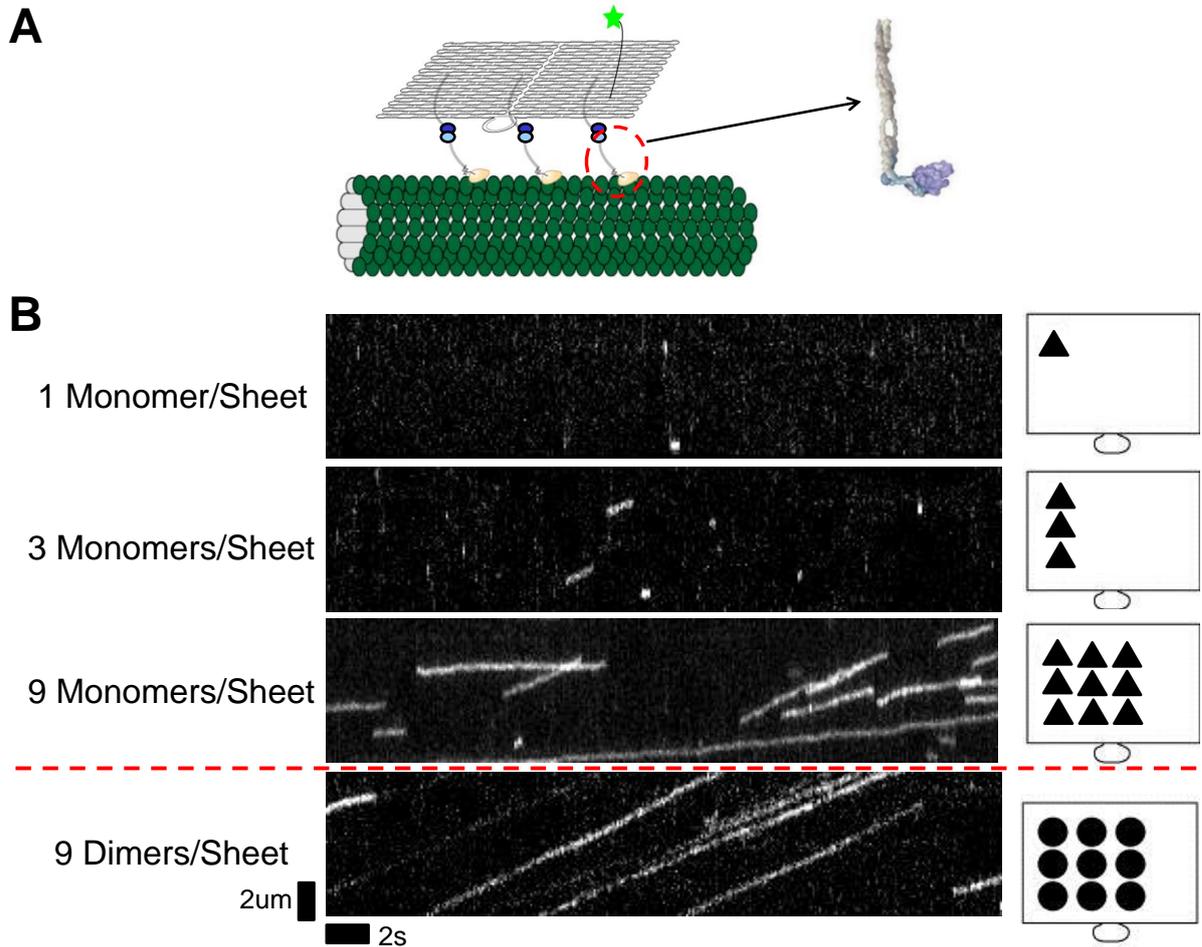


図 3-17 DNA シートのキネシンモノマー結合数によるカイモグラフの変化

A) 運動観察時の DNA シート-キネシンモノマーの概要図。 B) Halo タグリガンドを 1、3、9 箇所出した DNA シートと、Halo タグ蛋白を融合したキネシンモノマーを混ぜ合わせ運動を比較したカイモグラフ。画像は DNA シートに標識した Cy5 の輝点。

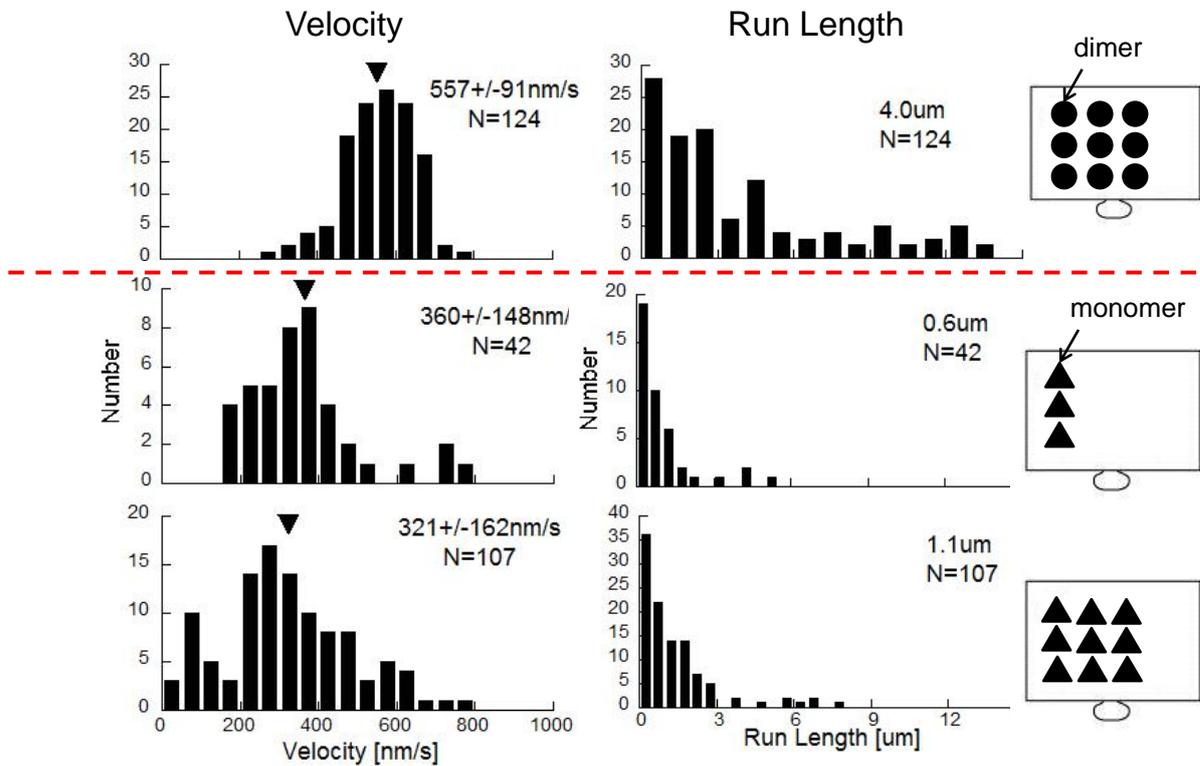


図 3-18 DNA シートのキネシンモノマー結合数による運動速度・連続補強距離の変化

Halo タグリガンドを 3、9 箇所出した DNA シートと、Halo タグ蛋白を融合したキネシンを混ぜ合わせ運動を比較した運動速度と連続歩行距離。上に比較のためにダイマーを 9 箇所接続した DNA シート-キネシンの測定値を示した。運動速度は単純平均、連続歩行距離は Single exponential のフィッティングにより平均値を求めた。

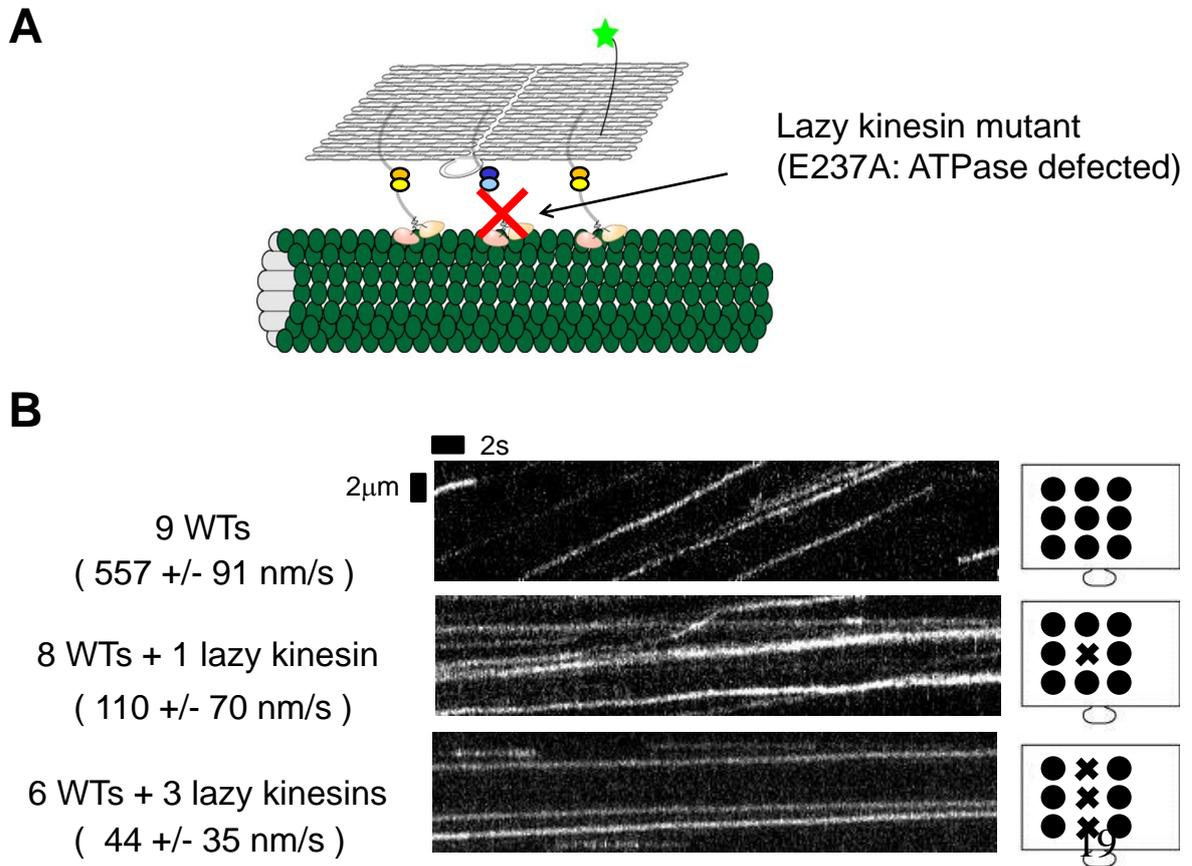


図 3-19 DNA シートの変異体結合数によるカイモグラフの変化

A) 野生型キネシンと、ATP 加水分解が非常に遅い変異体(K490CLM E237A)を混ぜ合わせた DNA シート-キネシンの概要図。 B) SNAP タグリガンドを 9、8、6 箇所、Halo タグリガンドを 0、1、3 箇所出した DNA シートと、SNAP タグ-野生型キネシンおよび Halo タグ-K490CLM E237A を混ぜ合わせ運動を比較したカイモグラフ。画像は DNA シートに標識した Cy5 の輝点。

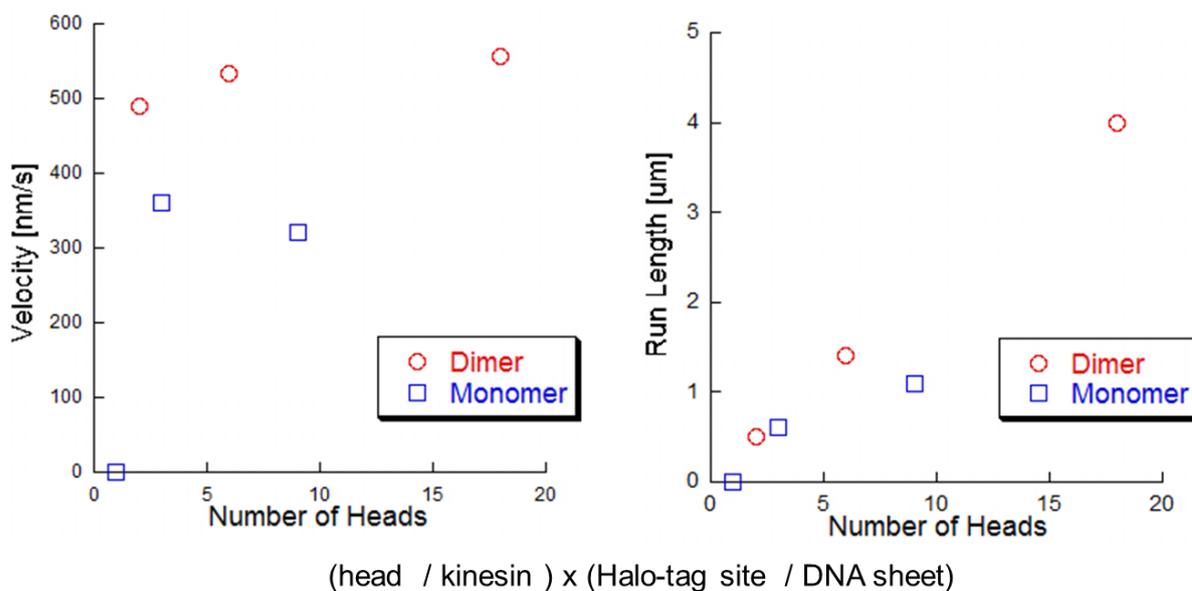


図 3-20 DNA シート上のキネシン頭部の数と運動性能の相関

図 3-16、図 3-18 で定量した、DNA シート-キネシンダイマーおよび DNA シート-キネシンモノマーの運動速度、連続歩行距離の測定結果について、DNA シート 1 分子に結合したキネシン頭部の数との相関をプロットした。

第 4 章 考察および結論

我々は DNA-蛋白質複合体を用いたアプローチにより、キネシンの分子内協調機構、並びに複数分子間の協調機構の解明を目指した。分子内協調に関しては、分子内協調を担うネックリンカーが持つ 2 つの機能(docking による位置バイアスと、頭部間張力によるコミュニケーション)をそれぞれ個別に評価することに成功し、docking による前方への位置シフトはキネシンの運動に必須であること、また、ネックリンカーを介した頭部間張力は運動自体には必須でないものの、キネシンの長距離歩行の鍵であることを明らかにした。また、複数分子間の協調については、蛋白質の間に働く張力が複合体の運動性能に影響している可能性が示唆された。

本章では、過去に行なわれた研究結果を踏まえつつ、本研究で得られた結果に基づいて、キネシンの運動メカニズムについて議論する。

4-1) キネシン 1 分子の運動メカニズムについての考察

4-1-1) キネシンの運動に対するレバーアームの寄与

キネシンは外部からの負荷に抗して運動し、仕事を発生させており、レバーアームはこの仕事を発生させる源であると考えられてきた。レバーアームの概念は、ミオシンモーター蛋白質で発展した(Huxley 1969; Rayment *et al.*, 1993; Finer *et al.*, 1994; Dominguez *et al.*, 1998; Yildiz *et al.*, 2003; Shiroguchi and Kinoshita 2007; Kodera *et al.*, 2010)。ミオシンは、頭部と尻尾の部分からなり、頭部は、球状のドメインとレバーのように伸びたドメインからなる(Spudich 2001)。球状ドメインにはアクチン結合部位と ATP 加水分解部位が含まれ、スーパーファミリーの中でよく保存されている、球状ドメインと尻尾をつなぐ、レバーのように伸びたドメインはヘリックスに複数の軽鎖モジュールが結合しており、軽鎖結合部位の数はスーパーファミリーの中で異なっている。このレバーの軽鎖結合部位の数を増やすと速度が上昇したり(Uyeda *et al.*, 1996)、step size が大きくなったりした(Purcell *et al.*, 2002)。また、結晶構造で、ATP 加水分解に伴って、アクチンに対する結合角度の変化が観察された(Rayment *et al.*, 1993; Dominguez *et al.*, 1998)。さらに、多くのミオシンはアクチンの+端(barbed end)に向かって運動し、ATP 加水分解の際は、レバーが+端の方向へと変化するが、このレバーの変化方向を逆にすると(一端に動くようにする)、ミオシンの運動方向が逆になった。すなわち、レバーの変化が運動方向を決めていると考えられた。これらの結果、球状ドメインの微小な構造変化がレバーア

ームで増幅され、ミオシンの運動を引き起こしていると考えられた。

一方、ミオシンに比べて、分子量が小さなキネシンでは、結晶構造において、ミオシンのレバーアームに相当する部分が見当たらず(Kull *et al.*, 1996)、どのようにして一方向性の運動を実現しているのかは謎にまつまれている。Vale らは、キネシンと逆方向に運動する Ncd の頭部ドメインをキネシンの代わりに用いても、キネシン方向に運動する事を示し、運動の方向を決めている要素が頭部ドメインの外にある事を示した(Case *et al.*, 1997)。続いて、複数の手法(EPR、FRET、クライオ電顕)を用いて、頭部ドメインと尻尾(コイルドコイル部分)をつなぐネックリンカーがヌクレオチド状態依存的に、頭部に結合したり(dock 状態)、解離(undock 状態)したりし、それに伴って、ネックリンカーの先端(C 末)、ひいては、尻尾の部分が運動方向へとバイアスされる事を示した(Rice *et al.*, 1999)。このネックリンカー仮説は、ネックリンカーと頭部ドメインをクロスリンクした場合や(Tomishige *et al.*, 2000)、ネックリンカー配列をランダムコイルにした場合(Case *et al.*, 2000)では 1 方向運動が観察されなくなった事から支持された。

1999 年に岡田らは、単頭のキネシン(KIF1A)が異方性をもった拡散過程により、前方方向(微小管の+端方向)に動いたことが示した(Okada and Hirokawa, 1999; Okada *et al.*, 2003)。さらに、光トラップの実験により、ステップ中のキネシンの浮いた頭部は、ほとんどの時間、拡散状態にあることがわかった(Nishiyama *et al.*, 2001, 2002; Carter and Cross, 2005)。これらの結果は、キネシンが異方性をもった拡散過程(biased diffusion)のみで一方向への連続歩行が可能であることを示唆しており、ネックリンカーの docking による前方シフト(レバーアーム)がなくてもキネシンは連続歩行可能ではないのか?という疑問が出て来た。

レバーアームが運動に必要なということであれば、よりエネルギー効率の高い、さらには ATP 加水分解のエネルギーの不要な分子モーターが構築できる可能性があるため、レバーアームの必要性については過去より検証が行なわれてきた。しかし、高感度計測(光ピンセットや FRET、FIONA 等)を用いた計測では、時間分解能・空間分解能の限界により、実際の歩行の観察に基づいた結論は出ていなかった。また、変異体を用いた解析では、ネックリンカーの構造変化が ATP 加水分解と共役している部分もあるので、結果の解釈に議論の余地があった。逆に言えば、レバーアームの運動への寄与を明らかにするには、キネシンの加水分解を阻害せずに、レバーアームの実効長を変化させ、運動活性への影響を評価すれば良い。本研究では、野生型のキネシン頭部(天然型のネックリンカーを保持)の様々な場所間を硬い棒である DNA でつなぐ事で、ATP 加水分解には影響を与えない一方、歩行運動に必要な二足(頭部)間距離を実現した。そしてこの系の結果を用いて、レバーアームがキネシンの連続歩行に必須であるかどうかについて考察を行なう。

また、一方、レバーアームを利用していないとすると、微小管から解離した

後ろ頭部は拡散を利用して前方の結合サイトへと移動していると考えられる。ただし、単純な拡散では、一方向性の運動とならないことから、前方に何かしらのバイアスのかかった異方性をもった拡散過程(biased diffusion)を利用して運動していると推定される。そのバイアスを生み出す為には、キネシン頭部が前方にあるのか後方にあるのかを認識する必要があるが、単純に考えると、2つの頭部間をつなぐネックリンカーを介して認識を行なっていると考えられる(ここでは「C末間コミュニケーション」と呼ぶ)。一方、必ずしもネックリンカーを介さなくても、頭部が何かしらの入力により前後を認識すれば動けるという考え方もある。そこで、我々はDNA二重鎖-キネシンを、1)レバーアームあり xC末コミュニケーションあり(第2章では『dockingあり x 頭部間張力あり』と表記)、2)パワーストロークなし xC末コミュニケーションあり、3)パワーストロークあり xC末コミュニケーションなし、4)パワーストロークなし xC末コミュニケーションなし、の4種類に分類し、運動の比較によりパワーストロークとC末コミュニケーションの切り分けを試みた。また、コミュニケーションを担っている実体は、両頭部間を接続しているリンカー一部に働く張力であると考えられている。接続点により、同じリンカー長でも張力の働く程度は変わってくることから、各コンストラクトにおいてDNAの長さを変化させることにより、最適なコミュニケーションがとれるコンストラクトを探した。

我々の結果では、各接続場所でDNAの長さを様々に変化させた時、C末(1に相当)とN末(3に相当)を接続したDNA二重鎖-キネシンのみで一方方向への連続歩行が観察された。しかし、N末のコンストラクトの運動確率は低かった。さらに、(N末でもC末でもない)頭部中央部を接続したDNA二重鎖-キネシン(4に相当)に関しては、どの条件でも連続歩行は見られず、拡散運動のみが観察された。C末(ネックリンカー)同士を接続したコンストラクトについても、接続場所をネックリンカーの根元に近づけるにつれ(実効レバー長が短くなり、前方へのシフト量が減る)、連続歩行距離が短くなり、根元(324)に接続したところ、ほとんど連続的な運動は観察されなかった(2に相当)。これらの結果は、ネックリンカーによる前方バイアスが運動に必要な事を示唆する。

しかし、蛋白質だけのコンストラクトの結果では、多分子観察系ではあるが、反証する結果も出ており、この節でより詳細に検討する。ネックリンカーをランダムコイル配列に置換した、蛋白質だけのコンストラクトは、安定的なdocking状態をとれないことが、過去の研究により示されており(Case *et al.*, 2000)、“(2)パワーストロークなし xC末コミュニケーションあり”に相当すると考えられる。Caseらの論文において、ランダムコイルにネックリンカーを置換したコンストラクトのATPaseはWTの1/3程度であったが、多分子キネシンを用いたgliding assayにおける微小管の滑り速度は1/400まで低下した。しかし、速度の低下幅は大きい、微小管の滑り運動は観察されており、多分子系とは言え、キネシンの運動そのものには、ネ

ックリンカーの docking による前方バイアスが不要の可能性もある。そこで、この可能性を検証するために、一分子観察を行った。また、Case らが用いたコンストラクトを最適化した。具体的には、本文中の 2-6-1 で議論したように、ネックリンカーの docking により浮いた頭部の到達範囲が前方にシフトすると考えられるが、Case らの変異体の場合、安定的に docking できないことから、docking によるシフトがない分、前方への到達範囲が狭くなっていると考えられる。そこで、到達範囲が狭くなった事を補償するために、ネックリンカーとコイルドコイルの間にポリグリシンを挿入したコンストラクトを作製し、ランダムコイル配列によって到達範囲を広げ、運動能を検証した。なお、我々の作製した変異体は Case らが論文で用いたコンストラクトとは若干異なる。Case らは、ネックリンカーのうち 323-332 番目のアミノ酸をランダムコイル配列に置換した。一方、我々は 325-334 番目の配列を置換し、さらに L335 と T336 の間に polyglycine を挿入した。置換部位を変更したのは 2 つの理由がある。1 つ目は、分裂に関わる Eg5 キネシンの結晶構造 (PDB:1II6) のデータから、K323(1II6 における K357) は保存配列である D49(1II6 における D69) と水素結合を形成していると考えられているためである。2 つ目は、Conventional Kinesin(K490CLM) の point mutation の実験により、F48A/D49A の変異を入れたコンストラクトは微小管に結合できないことが判明し、さらに K323E の変異体についても、運動速度は WT と変わらないにも関わらず連続歩行距離は WT の 1/4 に低下してしまっただからである。これらの結果は、Conventional kinesin の K323 と D49 は、Eg5 の場合と同様に相互作用していることを示唆している。よって、我々は K323 が連続歩行に重要な配列であると考え、置換する部位を C 末側に 2 残基(323-332 ⇒ 325-334)だけシフトさせた。

一分子観察の結果から、ネックリンカー置換しただけの変異体(ネックリンカーの長さは野生型と同じ 14 残基(323-336))は、Case らの多分子観察(gliding assay) の報告の通り運動は観察されなかった。一方、2-9 残基のグリシンを挿入し、片足あたりのネックリンカーの長さを 16 - 23 残基とした変異体は、連続的な運動を示したが、連続歩行性(10 - 15%)も速度(10 - 25 nm/s)も低かった。さらに挿入したグリシンを増やした変異体(グリシンを 12 個挿入し、片足あたりネックリンカー長が 26 残基)では、再び連続的な歩行は観察されなかった。速度のピーク(25 nm/s)はグリシン 5 個を挿入したコンストラクト(片足あたりのネックリンカー長は 19 残基)で観察されたが、この結果は、連続的な歩行にとって最適な両頭間距離があるのではないかということが示唆される。一方、DNA 二重鎖-キネシンでは、ネックリンカーの根元で接続したコンストラクトにおいて、DNA の長さを細かく変化させても動きは観察されなかった。ネックリンカー変異体では、まっすぐに同じプロトフィラメントを歩くのではなく、千鳥足で動いていると考えられるが(元々歩いていたプロトフィラメントの横のプロトフィラメントに結合し、プロトフィラメント間をフラフラ

しながら歩く)、DNA 二重鎖-キネシンでは、頭部間距離の分布がより厳密なので、蛋白質のみの変異体よりも千鳥足で動ける度合いが低いのかもしれない。

この我々のポリグリシン挿入ネックリンカー変異体の一分子観察の結果を、Case らのネックリンカー置換変異体の多分子系の結果(FRET 観察ではネックリンカーが頭部に安定的に dock しないが、一方で多分子系では微小管の滑り運動活性は有す)と合わせて考えると、ネックリンカーの docking によるレバーアームはキネシンの連続的な歩行にとって不要である、と解釈できる。これは、本論文 2 章の結論とは一致しないように見える。しかし、我々は、ランダムコイル配列に置換されたネックリンカーも一時的に頭部に結合することで、実際のネックリンカーと実質的に同様に機能することが可能なのではないか、つまり、ランダムコイル配列が一瞬頭部に相互作用することでレバーアームを生み出しているのではないかと予想している。実際、生化学実験において、ネックリンカーを取り除くと ATPase が WT の 1/10 に低下したのに対し(Okada *et al.*, 2003; Nitta *et al.*, 2008)、ネックリンカーを置換した場合の ATPase への影響は限定的である(WT の 1/2~1/3 ほど、Case *et al.*, 2000; Nitta *et al.*, 2008)。加えて、ネックリンカーと頭部は β -sheet 構造により結合している、つまりアミノ酸鎖の主鎖同士が相互作用している。よって、置換した配列が β -sheet 構造よりランダムコイル構造をとりやすい傾向があるとしても、ネックリンカーの側鎖部分と頭部が一時的に相互作用することは可能であると考えられる。光ピンセットの実験の結果から、8 nm ステップの立ち上がりの時間はおよそ 100 μ s ほどであるので(Nishiyama *et al.*, 2001; Carter and Cross 2005)、ネックリンカー置換配列と頭部が安定的に結合できず、dock 状態を維持できる時間が 1 ms にも満たない場合でも、実質的には通常のネックリンカーと同様に働くことが可能であると考えられる。加えて、シミュレーションによる解析も、浮いた頭部が次の結合サイトに到達するのに、必ずしもネックリンカーの全長が dock する必要がないことを示している(Czovek *et al.*, 2008)。これらの事を考え合わせると、ネックリンカー置換変異体において運動が観察された結果は、ネックリンカー置換部の頭部への一時的な docking の可能性を排除できず、レバーアームが連続的な運動に不要であることを示すためには不十分であると我々は考えている。

一方で、われわれの、DNA 二重鎖-キネシンでは、①N 末でも C 末でもない頭部中央部で接続した DNA 二重鎖-キネシン(“(4)パワーストロークなし xC 末コミュニケーションなし”の条件)で運動が観察されなかった事、また、②キネシンの運動活性が実効レバーアーム長に依存した事(“(1)レバーアームあり xC 末コミュニケーションあり”の条件)等から、レバーアームなしではキネシンは効率的に運動することはできず、連続的な歩行にとってレバーアームが必須であると結論づけた。

4-1-2) キネシンの運動に対する頭部間張力の寄与

野生型のキネシンは、微小管に結合してから解離するまで、100 歩以上連続的に歩行する。このような高い連続歩行のためには、少なくとも片方の頭部が常に微小管に結合している、という状態を維持し続けることが重要である。本研究では、連続歩行性を生み出す頭部間の協調的な動きにとって、ネックリンカーを介して 2 つの頭部間に働く張力が重要な役割を果たしていることを明らかにした。本節では、頭部間張力がキネシンの連続的な運動を可能にするメカニズムについて考察する。

4-1-2-1) 頭部単体と微小管の結合の強さを決める要因

キネシンは、ヒトが二足歩行するように、2 つの頭部を交互に微小管と結合・解離させて運動している。ヒトの二足歩行の場合は重力が常にかかっていることから自然に地面から解離することはないが、キネシンの場合は、微小管との結合を維持しない限り溶液中を拡散して微小管から外れてしまう。そのため、微小管から外れずことなく歩行するためには、頭部と微小管の結合状態を厳密に制御することが重要である。キネシンの運動メカニズムの詳細について述べる前に、キネシンの頭部と微小管の結合の強さを決める頭部のヌクレオチド状態について述べる。

過去の研究より、キネシンの頭部に結合するヌクレオチドの種類によって、微小管との結合の強さが異なることがわかっている。上村らは、キネシンモノマーを結合させたビーズを用い、モノマーを微小管に結合させた状態から光ピンセットにてビーズを引っ張ることにより、結合が維持できる限界の負荷、破断力を測定した。その結果、微小管のプラス端側(キネシンの進行方向側)・マイナス端どちらから引っ張った場合も、溶液がヌクレオチドを含まない条件および AMPPNP(加水分解しない ATP アナログ)を含む条件では破断力が高く(7 – 10 pN)、ADP を含む条件では破断力が低い(3 – 4 pN)ことがわかった(Uemura *et al.*, 2002)。破断力は化学反応の活性化エネルギーと類似のものとして捉えることができるため、同じ力がかかっている状況でも、破断力が強いものほど解離速度が遅く、破断力が弱いものほど解離速度が速いと考えられる。よって、キネシン頭部は、ヌクレオチドが結合していない状態(以下、『 ϕ 状態』と記す)および ATP が結合する状態(以下『ATP 状態』)では微小管との結合が強く解離しにくい状態、一方 ADP が結合する状態(以下『ADP 状態』)では微小管との結合が弱く解離しやすい状態である。

キネシンが二足歩行の際に、微小管から解離せず連続的に歩行するには、2 つの頭部のヌクレオチド状態を制御することが必要である。具体的には、各頭部が ATP 状態→ADP 状態→ ϕ 状態→ATP 状態→・・・ というサイクルを繰り返すのに対し、2 つの頭部が結合の弱い ADP 状態に同時にならないよう、何らかの方法で制

御を行なっていると考えられている。また、一方向に進むためにもヌクレオチド状態の制御が重要であると考えられる。すなわち、片足状態において、微小管に結合した頭部は結合の強い ϕ 状態ないし ATP 状態なのに対し浮いた頭部は ADP 状態であると想定されるが、浮いた頭部が ADP 状態 \rightarrow ϕ 状態へ移行するのに対し、何かしらの方法でその移行が前方の結合サイトのみで起こるように制御を行なっていると考えられている。

以上を踏まえると、歩行中に図 4-1 のようなヌクレオチド状態のサイクルを繰り返していると考えられている。実際、低濃度 ATP 条件下で ATP 結合を律速過程とした場合、キネシンは片足結合状態で ATP の結合を待っていること (Hackney 1994; Hackney *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2007; Guydosh and Block 2009)、また、片足状態のキネシンに ATP が結合した後、浮いた頭部がチューブリンに結合したのと同時に ADP が放出されて、両足状態へと遷移することが報告されている (Hackney 1994; Hackney *et al.*, 2003)

このモデルをベースに頭部間張力の寄与について議論を行なう。

4-1-2-2) 頭部間張力に関する過去の研究の結果との比較

キネシンの運動に対してキネシンの頭部間の協調が果たす役割について、過去に行われた生化学実験 (Hackney *et al.*, 2003) と一分子観察 (Yildiz *et al.*, 2008) で異なる結論が導かれている。主に頭部間張力と運動速度、および頭部間張力と連続歩行距離の相関についての見解が大きく分かれている。生化学実験においては、頭部間張力の減少が主に連続歩行距離に影響しているのに対し、一分子観察においては、運動速度に影響している、という結果が報告されている。本研究における DNA 二重鎖-キネシンの結果では、DNA の長さの変更による頭部間距離の伸長により、速度ならびに歩行距離の両方が減少した。しかし、速度への影響は歩行距離への影響に対し比較的小さかった。それに加え、DNA とキネシン頭部間の炭素鎖を変更することにより、両頭部間の距離を同一に保ったまま、頭部間のバネの性質のみを変化させる実験を行なった。その結果、頭部間張力は主に歩行距離に影響することがわかった。これらを合わせて考えると、今回の結果は Hackney らの生化学実験の結果を支持している。一方、Yildiz らの一分子観察の結果との解離は、コンストラクトの違いに起因するものではないかと、我々は推測している。我々と Yildiz らは、同じコンストラクト (K560CLM) 由来のコンストラクトを用いているが、彼らは 1 つの頭部に対しリジンを 2 残基挿入している (つまりダイマー 1 分子につきリジン 4 残基)。リジン残基のもつ正電荷がキネシンの走行距離を大幅に増加させることが知られていることから (Okada and Hirokawa 1999; Thorn *et al.*, 2000; Tomishige *et al.*, 2002)、リジンを挿入した効果がネックリンカー伸長により歩行距離が減少する影響を打ち

消してしまった可能性がある。実際、Yildiz らが用いた GS 変異体(グリシン-セリンのリPEAT配列を挿入してネックリンカーを伸長)に近い変異体(ポリグリシンでネックリンカーを伸長した変異体)を我々は観察したが、共に歩行距離の減少が観察された(野口・山田 富重研究室 2007 年度卒業論文)。速度に関しては、Yildiz らが用いたコンストラクトは、ネックリンカーとコイルドコイルのつなぎ部分にいくつかのフリーな節目があり、浮いた頭部は微小管上の様々な結合サイトに到達しうる。その中には、もともとの(後方の)結合サイトへの再結合や、横方向へのステップなど、速度の低下を引き起こす要因も含まれる。実際、ATP 加水分解とステップ運動のカップリングの強さを表す指標である Randomness factor を計算すると、両者のカップリングが弱くなっていることがわかり、それにより、無駄なステップの存在が示唆される。実際、彼らはネックリンカー伸長変異体でサイドステップが増えていることも示している。つまり、Yildiz らが用いたコンストラクトが速度低下を示したのは、ネックリンカーの伸長により 2 つの頭部にかかる張力が変化したためというよりむしろ、側方や後方へのステップといった無駄なステップが増えたためであるかもしれない。一方、DNA 二重鎖-キネシンの頭部はバネ(アミノ酸鎖、炭素鎖)を介して硬い棒(DNA)で接続されている。そのため、我々は頭部間の距離とバネの効果とを独立に評価することができ、より詳細に運動メカニズムを解析できると考えた。

4-1-2-3) 頭部間張力が協調に寄与するメカニズムの仮説

頭部間張力はキネシンの 2 つの頭部間で生じる。よって、その効果は片足状態ではなく両足状態で現れるはずである。生じる効果としては、次の 2 つのパターンが考えられる。

<1>両足状態から片足状態への遷移に寄与する

<2>片足状態から両足状態への遷移に寄与する

<1>のパターンにおいて、想定される頭部間張力の寄与としては、<1-1>後ろ足の結合を促進する、もしくは<1-2>前足の解離を阻害する、の 2 つがある。また、2)のパターンについても同様に、<2-1>解離した足が元のサイトに再結合することを阻害する、もしくは<2-2>前方のサイトへの結合を促進する、の 2 つが想定される(図 4-2)。キネシンの連続歩行にとって、どれかひとつのメカニズムがクリティカルである、もしくは複数のメカニズムの組み合わせが重要であることが考えられる。以下で、それぞれのメカニズムについて議論する。

<1-1>後ろ足の解離の促進

Yildiz らの論文(2008)において提唱されているモデルである。彼らはネックリンカーとコイルドコイルの間に、ポリプロリンおよびグリシンとセリンのリPEAT

配列を挿入し、これらのコンストラクトの運動性能を 1 分子レベルで評価した。彼らは、プロリン残基の挿入数を増やしていくにつれ、コンストラクトの速度は減少するものの、歩行距離は WT とほぼ同様のままであることを見出した。それに加えて、光ピンセットによって外力(彼らは「assist force」と呼んでいる)を加えることにより、速度が回復することも報告した。両足状態での 2 つの頭部間の距離は一定である(=隣接する結合サイト間の距離)ことから、プロリンの挿入数を増やすと 2 つの頭部間のバネは緩むことになり、それが頭部間張力の減少を引き起こす。加えて、assist force が後ろ足の解離を促進したと解釈できる結果も得られたことから、Yildiz らは、速度の減少の原因は、頭部間張力の減少により後ろ足の解離の促進が弱まったからである、と結論づけた。

<1-2>前足の解離の阻害

両足状態では、図 4-1 の Step 3 のように後ろ足が ATP 状態、前足が ϕ 状態をとると考えられている。この時、ATP が前足に結合してしまうと、両方の頭部とも ATP 状態となり、両方の頭部が加水分解を同時に起こして解離してしまう可能性があると考えられる。これを防ぐために、前足に ATP が結合するのを防ぐ機構があるのではないかと考えられてきた。

具体的な機構については明らかになっていないが、想定されている機構としては、前方の頭部のネックリンカーが後方に引っ張られることにより、ATP の結合が抑制されている、というものである。これは、ネックリンカーを介して、両方の足が張力を及ぼしあうことで、お互いの化学状態(あるいは、状態間遷移速度、反応速度)といったものを制御しあっているとする仮説に基づいた考え方である。この仮説は、光ピンセットを用いた実験において、足の ADP 状態と ϕ 状態の間の平衡の偏りが、負荷を掛ける方向に依存したことから提唱された(Uemura and Ishiwata 2003)。

<2-1>解離した足の元のサイトへの再結合の阻害

両足状態での後ろ足は、ATP 加水分解を起こし、Pi を放出することにより ADP 状態となる。これが後ろ足の解離の引き金となり、キネシンは片足状態となる。もし、解離した足が元のサイトへ再結合してしまうと、再結合した頭部は ADP を放出し ϕ 状態となる。それは、ATP を 1 分子消費したのに、ステップが起らないことを意味し、エネルギーの無駄遣いとなってしまう。しかし、ATP なしの溶液条件では片足状態と両足状態の遷移はゆっくりであることから(0.01 - 1 /s, Hackney *et al.*, 1994, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2007)、解離した頭部の再結合を防ぐためのメカニズムが存在すると考えられる。このエネルギーの無駄遣いを防ぐために、解離した足の元の結合サイトへの衝突確率を何らかの手段で下げている、もしくは元の位置に衝突したとしても ADP の放出自体が阻害されている、のいずれ

かのメカニズムが考えられる。前者の具体的なメカニズムとして、解離した足が、“微小管に接地している他方の足”に結合することにより元の位置への結合を防いでいるのではないかという仮説が提案された(Alonso *et al.*, 2007)。後者の具体的なメカニズムとしては、<1-2>と同様、ネックリンカーを介して働く頭部間張力により達成されていると考えられる。つまり、浮いた頭部が後方に結合しようとしても、前方に引っ張られていることで ADP 放出が阻害され、強い結合(ϕ 状態)に遷移できない、というものである。これは、ネックリンカーを頭部とクロスリンクし dock 状態に固定させると、ADP の放出が阻害された (Hahlen *et al.*, 2006)、ならびに、ネックリンカーを伸長した変異体においては、片足状態(Step 1)が維持できず ADP が放出された(Hackney *et al.*, 2003)、といった結果から支持される。

<2-2>前方への結合の促進

<2-1>と逆に、Step 2 から Step 3 への移行において、後方から引っ張られることにより ADP 放出が促進されているのではないか、という仮説である。

また、FIONA を用いてキネシンの足の振る舞いを観察した実験では、ATP 飽和条件下(1 mM)において、解離した頭部のほとんどは、接地している頭部のすぐ前方にある結合サイトに正しく結合することが確認できた(全ステップ中 95%)。つまり、横方向や後方の結合サイトに到達しうるにもかかわらず、それらの結合サイトへステップする確率は低い。これも頭部間張力が重要な役割を果たしており、誤った結合サイトへ到達しても、ADP 放出が阻害されているためではないかと考えられる。

4-1-2-4) 本論文の結果の解釈

我々の DNA 二重鎖-キネシンを利用した実験の結果、DNA や DNA リンカーの長さを変えることにより頭部間張力を変えると、張力の低下に伴い歩行速度の低下や連続歩行距離の低下が起こることがわかった。速度が頭部間張力の変化に対して影響が比較的小さかったのに対し、歩行距離や微小管への滞在時間、歩行確率といった性能は大きな影響を受けることを示した。

本論文の結果から、前述した 4 つのメカニズムのどれが支配的なのかを決定するため、まずは 4 つのメカニズムが失われた際に何が起こるかを考える。特に、運動速度と歩行距離のどちらに効くかどうかを考える。

<1-1>後ろ足の解離の促進

このメカニズムが失われると、Step 3 から Step 4 への移行が長くなることから、速度の減少が起こる。一方、前足に ATP が結合するまでの結合時間と比較して、

後ろ足の加水分解にかかる時間が相対的に長くなることになるため、両足で同時に加水分解が起きて微小管から解離しやすくなる効果も生じると予想される。すなわち歩行距離も短くなる可能性がある。しかし、速度の方がより直接的な影響を受けることから、速度の減少の方がより顕著だと考えられる。

<1-2>前足の解離の阻害

このメカニズムが失われると、Step 3において前足に ATP が結合することとなり、その結果、両足同時の解離や冗長なステップ(特に後方へのステップ)の増加が引き起こされると考えられる。つまり、速度、歩行距離共に減少するはずである。もし、両足同時の解離が支配的であった場合、歩行距離のみが減少する。

<2-1>解離した足の元のサイトへの再結合の阻害

このメカニズムが失われると、頭部間張力の減少により元の結合サイトへの結合頻度が増加する。これは、Step 4 から Step 5 へ移行する際に余分なステップを経る、ないしは Step 1 に戻るということであるから、速度の減少につながると考えられる。一方、前後両方の頭部がφ状態になると、両足同時で加水分解、およびそれに伴う同時解離が発生する可能性があるため、歩行距離の減少が生じると考えられる。つまり、速度と歩行距離の減少の両方が起こりうると考えられる。

<2-2>前方への結合の促進

このメカニズムが失われると、まずは前方の結合サイト以外への冗長なステップ(横方向、後方共に)が増加することが予想される。その場合、速度と歩行距離の減少が起こると考えられる。一方、歩行距離により影響が出ると考えられる場合もある。具体的には、Step 5 から Step 6 への移行に際し、通常は後ろ足の加水分解より前足の ADP 放出の方が早い、頭部間張力の減少に伴って ADP 放出の促進が失われると仮定すると、後ろ足の加水分解の方が相対的に早くなると考えられる。その場合、両足とも ADP 状態となり解離してしまうことから、歩行距離への影響が大きいと考えられる。しかし、(頭部間張力が減少していると考えられる)ネックリンカーを伸長した変異体では、野生型よりも ADP 放出がむしろ早くなることが報告されていることから(Hackney *et al.*, 2003)、頭部間張力によって ADP 放出が促進されるとは考えにくい。よって、頭部間張力の減少により、速度と歩行距離両方の減少が起こると考えられる。

本論文では、頭部間張力の減少は、歩行距離への影響が速度への影響よりも大きかった。この結果から、我々は<1-2>のメカニズムが支配的であると考えた。これは、<1-2>のメカニズム以外は、頭部間張力の減少が、歩行距離よりも速度に対す

る影響が大きい一方、<1-2>のメカニズムにおいては、頭部間張力の減少がキネシンダイマーの微小管からの解離を直接引き起こすため、歩行距離により大きな影響が出るためである。我々の主張を支持する実験結果として、ネックリンカー伸長変異体(ポリグリシンを挿入した蛋白変異体、図 1-5)のネックリンカーの状態を調べた実験がある。頭部への ATP 結合に続いてネックリンカーの docking が起こることが知られていることから、1 分子 FRET を用いてネックリンカーの位置を見ることにより、ATP 結合を検出することができる。1 分子 FRET の結果により、野生型のキネシンは、AMP-PMP 飽和条件下において片足のみ dock 状態をとるのに対し、ネックリンカー伸長変異体は両頭部とも dock 状態をとることが示されている(Toishige *et al.*, 2006; Isojima, Toyokita and Tomishige 私信)。従って、歩行中も、この変異体の両足に ATP が同時に結合すること(および、それに引き続く両足同時の ATP 加水分解)が発生しうると考えられる。DNA 二重鎖-キネシンにおいてもこういった現象が起こっているかもしれない。

なお、レバーアームについては、Step 4 から Step 5 への移行に関連している。レバーアームは必須であるという本研究の結果から、レバーアームは Step 5 への移行を促進するというよりは、進めるためのトリガーであると解釈できる。Step 4 の片足状態では両方のネックリンカーがランダムコイル状態であるが、図 2-22 の頭部間距離を踏まえると、片足状態では前方または後方の結合サイトへ届く確率は非常に低いと考えられる。ATP が結合してネックリンカーが docking すると前方の結合サイトへ届く確率が上がり Step 5 へ移行できると考えられる。このメカニズムが寄与していることは、低濃度 ATP 条件下ではキネシンは片足結合状態で ATP の結合を待っている、という結果からも示唆される。そのため、<2-1>の阻害そのものは歩行に寄与しているものの、頭部間張力による阻害ではなく、物理的にアクセスできないという空間配置による阻害であると考えられる。

しかし、キネシンの歩行メカニズムについてまだ完全に結論が出たわけではない。特に、我々の結果は、頭部間張力による後ろ足の解離の促進を完全に否定するものではない。光ピンセットの結果から、キネシン頭部の ADP Affinity の異方性が示されており(Uemura *et al.*, 2002; Uemura and Ishiwata 2003)、両足状態において ADP の後ろ足からの解離が頭部間張力により阻害されている可能性がある。つまり、微小管との結合が比較的弱い ADP 状態を維持し、結合が強い ϕ 状態への遷移を防ぐことにより、結果的に微小管からの解離を促進している、と推測することが可能である。また、この機構は、<2-1>で示した解離した足の元のサイトへの再結合の阻害にも寄与しているのではないかと考えることができる。しかし、こういった static な観察やモノマーの観察から推測される後ろ足の解離促進の機構が、実際キネシンの運動に寄与しているかどうかについては、①運動中のキネシンダイマーに対し、②頭部の状態(両足状態の前足/後ろ足、片足状態の接地した足/浮いた足)を区別

しながら、③頭部に結合しているヌクレオチドを(ネックリンカー状態の検出を通してではなく)直接検出しなくては、最終的な結論は出せないと考えられる。これは、従来のイメージング手法では難しく、未だに結論は出ていない。

我々は DNA 二重鎖-キネシンという新たなアプローチをとることにより、キネシンが歩行中にどういったメカニズムを利用しているのか一定の結論を得ることができた。超解像顕微鏡(FIONA)、光ピンセットなどを用いた歩行ステップの更なる解析、ならびに ATP 結合の直接観察と 1 分子 FRET によるキネシン頭部の構造変化観察の組み合わせにより、頭部協調メカニズムの詳細が明らかになっていくであろう。その際には、それぞれのメカニズムの寄与を見積もるために、歩行中における反応時定数の定量的な比較が必須であると考えられる。

4-1-2-5) 頭部間張力に影響を受けるドメインについて

この節では、頭部間張力がキネシンの運動を制御するメカニズムが、キネシン頭部のどのような構造により生み出されているのかについて、本論文におけるヘテロダイマーの結果をもとに簡単に述べる。ヘテロダイマーのうち、いくつかのコンストラクト(23-337 および 324-337)において連続的な歩行が見られたことから、頭部間張力はキネシン頭部の後方部分に対して働いていることが示唆される。Yildiz ら(2008)は、外力を加えることによりネックリンカー置換変異体がステップ状の運動ができるようになることを示し、この結果を頭部間張力が(ネックリンカーに対してではなく)頭部の機能に直接影響を及ぼしている、と解釈した。我々の結果は彼らの結果を支持するものであり、さらに我々の結果から、特定のドメインが頭部間張力をセンシングしている可能性を示すことができた。

キネシン頭部単体の構造に紐づけて、さらに前節までで議論したメカニズムも踏まえ、より詳細な分子機構の考察を試みる。構造解析技術の進展により、様々なヌクレオチド状態の結晶構造が解かれた。これらの結晶構造を反応中間体と考え、各構造間の遷移について、ヌクレオチドポケット周りのリレーや微小管とのコミュニケーションの解釈が報告されている(Song and Endow 1998; Yun *et al.*, 2001; Kikkawa 2001; Nitta *et al.*, 2004)。また、クライオ電顕との組み合わせる事で、動作中の構造を決定しようという試みもなされている(Kikkawa *et al.*, 2000; Kikkawa and Hirokawa 2006)。これら過去の検討結果から、キネシンは頭部のヌクレオチド状態によって大きく 2 種類の構造を取ると考えられる(図 4-3)。1 つ目の” closed ”型では、ネックリンカーの結合に関わる足のアミノ酸はネックリンカーからはアクセスできない位置に配置しているため、ネックリンカーはランダムコイル鎖を取っている。ADP 状態や ϕ 状態ではこの closed 型を取っていると考えられている。ATP が結合すると、ヌクレオチドポケットの変化によって、足の構造が” open ”型に変

わり、頭部表面の結合するサイトにネックリンカーがアクセス可能になり docking できるようになる。ネックリンカーは dock 状態になることで β -sheet 構造をとり、レバーアームが生じる。

4-2-4)での議論から、頭部間張力は、Step 3 の両足結合状態において前足への ATP 結合を阻害することで、長距離歩行に寄与していると考えた。Step 3 で前足のヌクレオチド状態は ϕ 状態であることから、キネシン頭部は closed 型の構造をとっている。一方、Step 4 の片足結合状態においても、微小管に結合した軸足の方は ϕ 状態をとっているが、次のステップに進むには ATP が結合する必要があるため、この Step では ATP が比較的結合しやすいと考えられる。この状態では、ネックリンカーを介した頭部間張力は働かない。このような差を鑑みると、後方への張力により、溶液中の ATP のヌクレオチドポケットへのアクセスが何らかの形で制限されるのではないかと考えることができる。ネックリンカーを介さない張力でも、ヌクレオチドポケットのアクセスに影響を及ぼすことができれば、ある程度歩行に寄与すると考えられる。ヘテロダイマーの検討において一方向運動に近い運動を示した 23 や 43 はヌクレオチドポケットに近く、ランダムな運動を示した 215 は遠いことから、本論文の結果はこの仮説が正しいことを示唆する結果だと考える。ただ、101 についてはヌクレオチドポケットに近いのにも関わらずランダムな運動を示したことから、ポケットからの距離が単純に影響しやすさに関連しているわけではないと考えられる。構造と機能の相関のさらなる解明については、時空間分解能の向上や力をイメージングできるプローブなどのイメージング手法のブレークスルー、ならびに分子動力学的手法による動的な挙動の検証が必要であろう。

4-1-3) キネシン分子の運動メカニズムまとめ

この節では、前節までの議論を踏まえて、キネシンの運動メカニズムを考察する。

キネシンでは、頭部のヌクレオチド状態によって、レールへの結合の強さが変わるが、結合サイトへのアクセスしやすさや頭部間張力によって、その遷移速度や平衡を制御していると考えられる。天然のキネシンにおいては、制御を効率良く行うために、ネックリンカーと呼ばれる構造を用いているのであろう。ネックリンカーには、以下の役割があると考えられる

1. 移動

頭部に結合し、伸びた β -sheet 構造を取る事で、浮いている頭部を前の結合場所に届くようにする。また、長さをかろうじて届く距離になっている事で、余計な場所に結合する確率を下げ、正味の運動に寄与しない結合・解離

を抑制する。

2. 伝達

他方の頭部がレールに結合しているのかどうかの情報を、伝える。

3. 促進・抑制

ある状態を安定化したり、状態間の遷移速度を促進・抑制したりする。また、頭部間張力を最大化して、遷移確率の制御をより効率的に行う。

キネシンの運動メカニズムをまとめると、キネシンの頭部には、元々異方性があり、バイアスを生み出す事ができる。しかし、効率が悪い。そこで、自然はキネシン頭部の端同士を短いペプチド鎖でつないだ蛋白質を選択した。効率的な細胞内輸送や分裂は、細胞の増殖に重要であり、進化の過程で生き延びる確率が高かった物と考えられる。短いペプチド鎖に複数の役割を与える事で、“エネルギー効率50%で、100歩連続的に進む”という高機能を実現しており、非常に巧妙な仕組みを用いているといえよう。

キネシンの運動メカニズム解明を目指した従来の研究では、実験的手法の限界から、主にキネシンの構造と機能の相関について、静的な状態の検証が主に行なわれてきた。それにより静的な状態についてはかなり解明され、状態間の遷移のメカニズムについても様々な示唆が得られていたが、動的な検証、すなわち実際の歩行に対する寄与の直接的な検証については、アプローチが限られていた。本研究では、DNA二重鎖-キネシンという新たな手法を用いることにより、「実際の歩行に対してこれまで提唱されてきたメカニズムがどのように寄与するか」という、従来アプローチできなかった動的な検証を行なうことができた。また、蛋白質変異体ではなくDNAやリンカーを用いることで、従来よりも定量的な実験系が構築できた。これは、分子動力学的手法による数理的検証との連携もより容易になったということの意味するであろう。本研究で確立したDNA-蛋白質複合体は、構造と機能の相関のさらなる検証において不可欠な、実験と数理的検証のスムーズな橋渡しを行なうための有用なツールであるといえよう。

4-2) DNA シート-キネシンの検証結果の解釈

4-2-1) DNA ハイブリダイゼーション法の効率向上

本研究では、DNA ナノ構造の 1 つである DNA シートにキネシンを接続して、複合体の再構成を試みた。キネシンと DNA シートの接続方法として、“DNA のハイブリダイゼーションを用いた接続”と“タグ蛋白-リガンドを用いた接続(共有結合)”の大きく 2 つを検討したが、ハイブリによる接続の効率が悪かったことから、本研究では、運動の観察にはタグ蛋白-リガンドを用いた。ここでは、ハイブリ方式の効率が悪い要因について考察し、効率を上げる可能性について検証する。

DNA のハイブリダイゼーションを用いた接続方法の結合効率がタグ蛋白-リガンドを用いた方法と比較して低い最大の要因は、ハイブリダイゼーションが可逆反応だからではないかと考えられる。そのため、蛍光一分子観察や AFM 観察のために希釈した後は、濃度が nM 以下となるため、平衡が解離側に傾く、つまり一度解離してしまうとキネシン分子が再度結合サイトにアクセスする確率が非常に低いことから、特に希釈後時間がたつと結合数が減ってしまうと考えられる。これに対しては、DNA 二重鎖に結合してハイブリを安定させる蛋白質を用いる方法(Nguyen et al., 2017)や、ハイブリ後に化学架橋してしまうといった方法(Yoshimura and Fujimoto 2008)が対策として考えられる。また、ハイブリダイゼーション自体の結合を強くしてハイブリ側に平衡を傾けるための方法として、蛋白との接続に用いる配列について結合安定性の比較的高い G-C 配列を増やす方法が考えられる。ただし、鍵の部分は DNA シートの形成に影響を与えない配列である必要があるため、鍵の配列は完全に自由ではなくある程度制約を受ける。

一方で、同じく 20 bp の DNA で結合した DNA 二重鎖-キネシンの電気泳動の結果(図 2-6A)と比較しても、DNA シートの結合効率は低い。その原因としては、① DNA シート自体が全体的にマイナスチャージを持つ一方、キネシン(393 aa の頭部部分の等電点は 6.2)も中性領域では弱くマイナスにチャージしており、キネシンに結合したアンチセンス鎖が DNA シートにアクセスしにくくなっている、② DNA シートは、DNA 二重鎖-キネシンで用いた DNA-キネシンモノマーと比べて分子量が大きく拡散が遅いことから、高濃度であっても衝突頻度が低く平衡が解離側に傾きやすい、といった可能性が考えられる。マイナスチャージの影響を軽減させる方法として、3-3)の DNA シート-キネシンの一分子蛍光観察の条件検討と同じく、電荷を遮蔽するためにイオン濃度を上げれば、効率を高められるかもしれない。その際、キネシンは表面に電荷を有する蛋白質であるため DNA シートの電荷の影響を受けやすいことから、効率を高める上でも電荷の影響を慎重に加味する必要があるが、電荷が少ない蛋白質であれば比較的効率を高める検討が容易である可能性がある。

3章で述べたとおり、DNA ハイブリダイゼーションの接続方法は鍵の設計自由度が高く、結合効率を高められればさまざまな構造の複合体再構成が構築できると考えられ、キネシン以外の蛋白での応用も期待される。今後様々なアプローチを検討する必要があると考えられる。

4-2-2) DNA シート-キネシン運動に対する分子間協調の寄与の考察

本研究で評価した DNA シート-キネシンの運動性能について、キネシン 1 分子の運動性能を踏まえつつ考察を行なう。

4-2-2-1) ダイマーおよびモノマーを接続した DNA シート-キネシンの運動

ダイマーおよび片足キネシンを結合させた DNA シート-キネシンについて、DNA シート 1 分子に結合したキネシン頭部の数と、運動速度および連続歩行距離の相関を見ると、速度は、ダイマーとモノマーでは違いがあるものの、結合分子数が変わっても運動速度が大きく変わらなかった(図 3-20)。

ダイマーについては、キネシンダイマーの結合数に関わらず運動速度がダイマー単独と変わらなかったことから、運動速度に影響を及ぼすような強い力が分子間に働いているとは考えにくく、運動速度はキネシン 1 分子の性能がそのまま表れたものと考えられる。一方、連続歩行距離はキネシン結合数が増えるほど長くなったが、これは能動的な協調によるものというよりは、キネシンが多数いることで微小管から外れにくくなった結果と考えられる。すなわち、DNA シートに結合するキネシンのうち、1 分子でも微小管に結合していれば DNA シートは運動し続けられる、逆に言うと、全ての分子が外れない限りは動き続けられる。キネシンの数が増えるほど同時に外れる確率は下がるため、それにより歩行距離が自然と長くなったと考えられる。

モノマーの結果については、モノマーが 1 分子では運動できないことから解釈が異なる。DNA シート-キネシンを前方に移動させるドライビングフォースは、キネシンダイマー 1 分子の運動と同じく、キネシン頭部の docking によるレバーアームであると考えられる。DNA シートに結合するモノマーが docking することで、DNA シート-キネシンの拡散中心位置全体が前方へシフトし、解離している他のモノマーもより前方の結合サイトにアクセスできるようになる、と考えられる。一方で、図 4-1 のように 2 つの頭部が密接に協調して、二足歩行しているとは考えにくい。キネシンダイマーでは、2 つの頭部が協調しており、例えば、図 4-1 の Step 4 においては、微小管に結合した頭部が ATP 状態になるまで、浮いた頭部は微小管上の結合サイト、特に後方のサイトへのアクセスが制限されており、冗長なステップが抑制されている。しかし、本研究で用いたキネシンモノマーは、図 3-17 のようにキネシン頭部と DNA シートの間に 10 nm 以上の長さのコイルドコイル部を持つため、

頭部のアクセス範囲の自由度が高く結合サイトを制限できないからである。すなわち、DNA シート上のモノマー同士では、空間配置による制御が効きにくいと考えられる。また、キネシンを協調させるもうひとつ要因である、張力に関しても、モノマー同士では、制御が効きにくいと考えられる。モノマー間の張力がキネシンダイマー1 分子内の頭部間張力と同様に働くためには、2 つの頭部間の距離がコイルドコイル部も含めたモノマー全体の長さと同程度となり、モノマー間をピンと張る必要がある。つまりコイルドコイルで脚が長くなった分、両足状態では大股になる必要がある。しかし、コイルドコイルは硬い棒ではなく、柔らかいためにアクセス範囲が限定できず、前方の結合サイトだけではなく側方や後方のサイトに結合するケースが頻繁に発生すると考えられる。そのため、モノマー間は必ずしもピンと張った状態ではなく、キネシンダイマーの場合と同じメカニズムによる制御は働かないと考えられる。

それでは、DNA シート-モノマーキネシン複合体はどのようにして微小管との結合を維持し、連続歩行を行なっているのだろうか。モノマーが微小管との強結合を維持するには、 ϕ 状態か ATP 状態である必要があることから、まずは ϕ 状態・ATP 状態の時間が長くなっている可能性が考えられる。実際、モノマーの ATP 加水分解はダイマーに比べて 10 倍程度遅いという報告がある(Hancock and Howard 1999)。しかし、DNA シート-キネシンの運動速度は、ダイマーのケースの約半分にしか減少していないことから、この説明には難がある。他の可能性としては、加水分解して微小管に離れてもすぐに再結合しやすいという可能性がある。特に本研究では、キネシンは DNA シートという大きい構造体に結合していることから、複合体全体の拡散速度はキネシンモノマー単体と比較して非常に遅い。さらに、モノマーが 1 分子でも微小管に結合していると、そのモノマーがアンカーとして働き、DNA シート-キネシンは微小管近辺に存在するはずである。そのため、モノマー単体が微小管から解離した場合には、拡散により速やかに微小管から離れてしまう一方、DNA シート-キネシンの場合、解離したモノマーの拡散範囲が微小管近辺に限定され、再結合しやすくなっている可能性がある。またこの仮説が正しいとすると、DNA シート-キネシンの速度がキネシン 1 分子の半分程度である一方、bulk でのモノマーの ATP 加水分解速度がダイマーよりも 10 倍遅いという矛盾についても説明できる。Bulk の測定では、いったん解離したモノマーが、微小管から離れると、微小管の濃度が低いので、微小管への再結合時間が遅くなり、見かけ ATP 加水分解速度の測定値が遅くなる。一方で、DNA シート上のキネシンのように、速やかに再結合が起こるケースではその分 ATP 加水分解速度が速くなり、また運動に寄与すると考えられるためである。

では、分子間張力が全く働いていないのだろうか？可能性としては、いくつか考えられる。例えば、進行方向の前方に結合したモノマーには後方への張力が働き、4-2)で検証した<1-2>の機構、すなわち前方頭部への ATP 結合、およびそれに続く解離の抑制が働いている可能性がある。しかし、DNA シートとキネシン頭部の接続部が長くやわらかいために、その効果は限定的であると考えられる。

以上から、モノマー同士・ダイマー同士を結合した DNA シート-キネシンの運動性能は、定性的に検証した限りでは、分子間協調の効果よりは、キネシンの数が増えたことにより微小管から解離する確率が減少したことが影響している可能性がある。今後、個々の分子の運動や構造変化(ネックリンカーの docking 等)を観察する事で、より詳細な議論が可能になると期待される。

4-2-2-2) 変異体を接続した DNA シート-キネシンの運動

ダイマーを結合させた DNA シートにおいて、運動機能の低下した変異体を輸送複合体に導入したところ、輸送複合体の速度が低下し、その低下の度合いは変異体の数に依存した。キネシンは負荷依存的に速度が低下する事が知られているので (Svoboda and Block 1994)、この結果は変異体が負荷となったことによるものと考えられる。一方で、負荷となっている変異体キネシンも一定の張力がかかると、破断力によって微小管から解離する事が考えられる(Kawaguchi and Ishiwata 2001; Uemura *et al.*, 2002, 2003)。本研究で用いた変異体である E237A は、ATP 加水分解が遅い変異体であることから、図 4-1 の Step 2 か Step 3 の状態が支配的であると考えられる。E237A でも野生型と破断力が変化しないと仮定すると、前方から引っ張られた時の破断力は、過去の結果から 6 pN(Step 2、片足だけ強結合状態)もしくは 12 pN(両足とも強結合状態)であると想定される(Uemura *et al.*, 2002)。今回の実験系では、この 2 つのバランスで、速度が決まると考えられる。

もしも、野生型のキネシンが独立に複数作用して力を発生しているとする、力学的には、バネが並列に並んでいると考えられ、発生する力の総和は、相互作用している野生型分子の数に線形に比例すると考えられる。野生型キネシンが後方から引っ張られた時の破断力は 9 – 10 pN 程度であることから(Uemura *et al.*, 2002)、今回の実験系では数に勝る野生型が変異体に打ち勝つ事が期待された。しかし、実験結果からは、変異体による負荷の方が影響が大きいことが示唆された。予想に反する結果が生じた理由としては、実際に微小管と相互作用して力を発生させている野生型分子の数が、DNA シートに結合しているキネシン数と比較して少数である可能性が考えられる。1 つには、微小管の曲率の影響により、空間的な制約から実際に相互作用できる分子数が少ない可能性、他方は、相互作用できる分子は多数あるもののキネシンが負荷に長時間耐えられない可能性である。後者においては、光ピンセットを用いた実験から、運動中のキネシンは 6 pN を超える負荷がかかると、急激に解離しやすくなり、数百ミリ秒程度しか、負荷に耐えられないことが報告されている(Jamison *et al.*, 2010)。今回の実験系においても、変異体由来の負荷によって野生型キネシンの一定数が解離してしまい、同時に作用するキネシン数が想定よりも少ない可能性がある。キネシンでは、FRET による構造変化観察を用いて、キネ

シンのヌクレオチド状態の同定が可能である(Tomishige *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2007)。FRET を観察するには、表面の Cys 残基を他のアミノ酸に置換した CLM(Cystein-Light Mutant)のキネシンを用いて特定の位置に色素を導入する必要があるが、今回検討した Halo タグ蛋白-リガンドには、表面に Cys 残基がないので、CLM キネシンと融合させ、部位特異的な色素導入が可能である。今後、FRET 観察用キネシンを DNA シートに結合させる事で、個々の分子がどのように輸送複合体の運動に寄与しているかを明らかにできる可能性がある。

一方で、逆方向性モーター蛋白質であるダイニンは、*in vivo* において、協調的に働いていることが報告されている(Rai *et al.*, 2013)。この実験では、マクロファージの食作用(phagocytose)を利用して、0.7 μm のプラスチックビーズを細胞内に導入し、光ピンセットを用いてビーズに負荷をかけることで、細胞の周縁部方向への輸送(微小管の+端への輸送)と、核方向への輸送(微小管の-端への輸送)の負荷依存性を調べた。その結果、キネシンと比べてダイニンは協調的に機能していることが示唆された。その後の実験により、モデル小胞においては、ダイニンは、小胞体上のマイクロドメインにおいてクラスターを形成しており、このため、協調して運動が可能になっていることが報告されている(Rai *et al.*, 2016)。今後、ダイニンを用いて今回の実験系と同様な実験を行うことで、キネシンとダイニンのより詳細な比較が可能となるかもしれない。

本研究では、DNA-蛋白質複合体を用いる事で、複合体内の蛋白質分子の数、種類、結合位置の制御に成功した。また、これらのパラメーターに応じた複合体の運動様式の変化も観察されたことから、本手法が分子内協調だけでなく分子間協調の寄与を調べる上でも有用である可能性が示された。本手法は、キネシンに限らず様々な蛋白質に適用可能であることから、本研究で用いたアプローチが他の研究でも応用されることを期待したい。

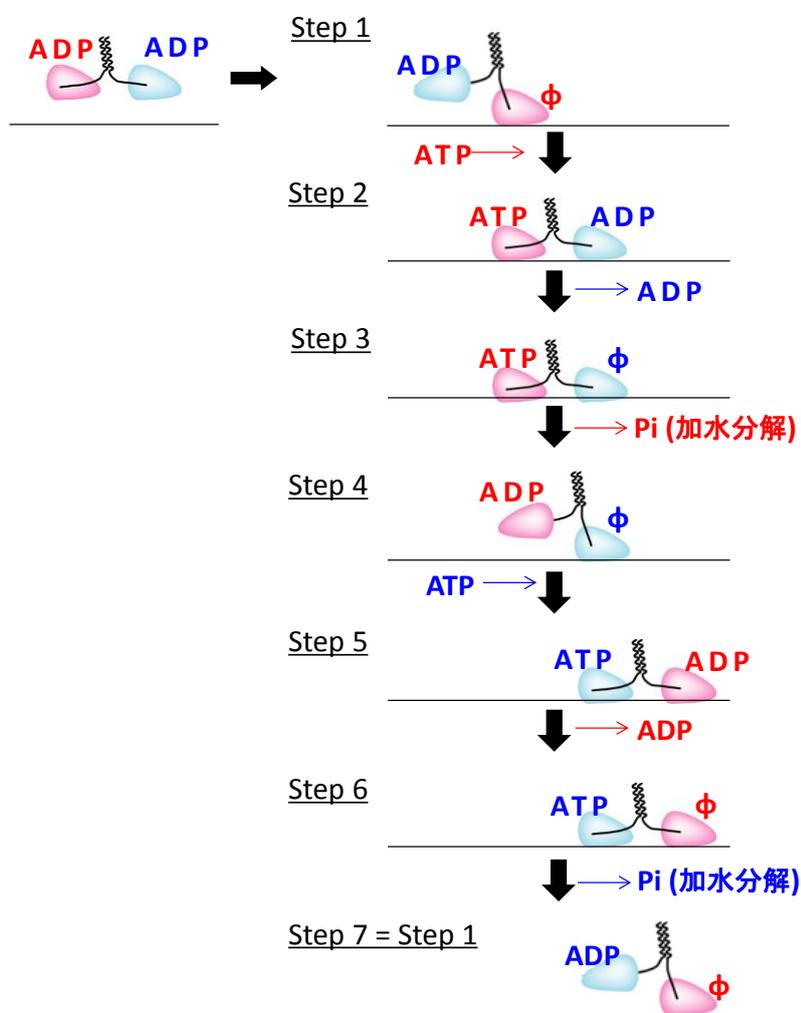


図 4-1 キネシンの歩行における2つの頭部のヌクレオチド状態変化

2つの頭部は、交互にヌクレオチド状態を変化させながら運動していると考えられている。

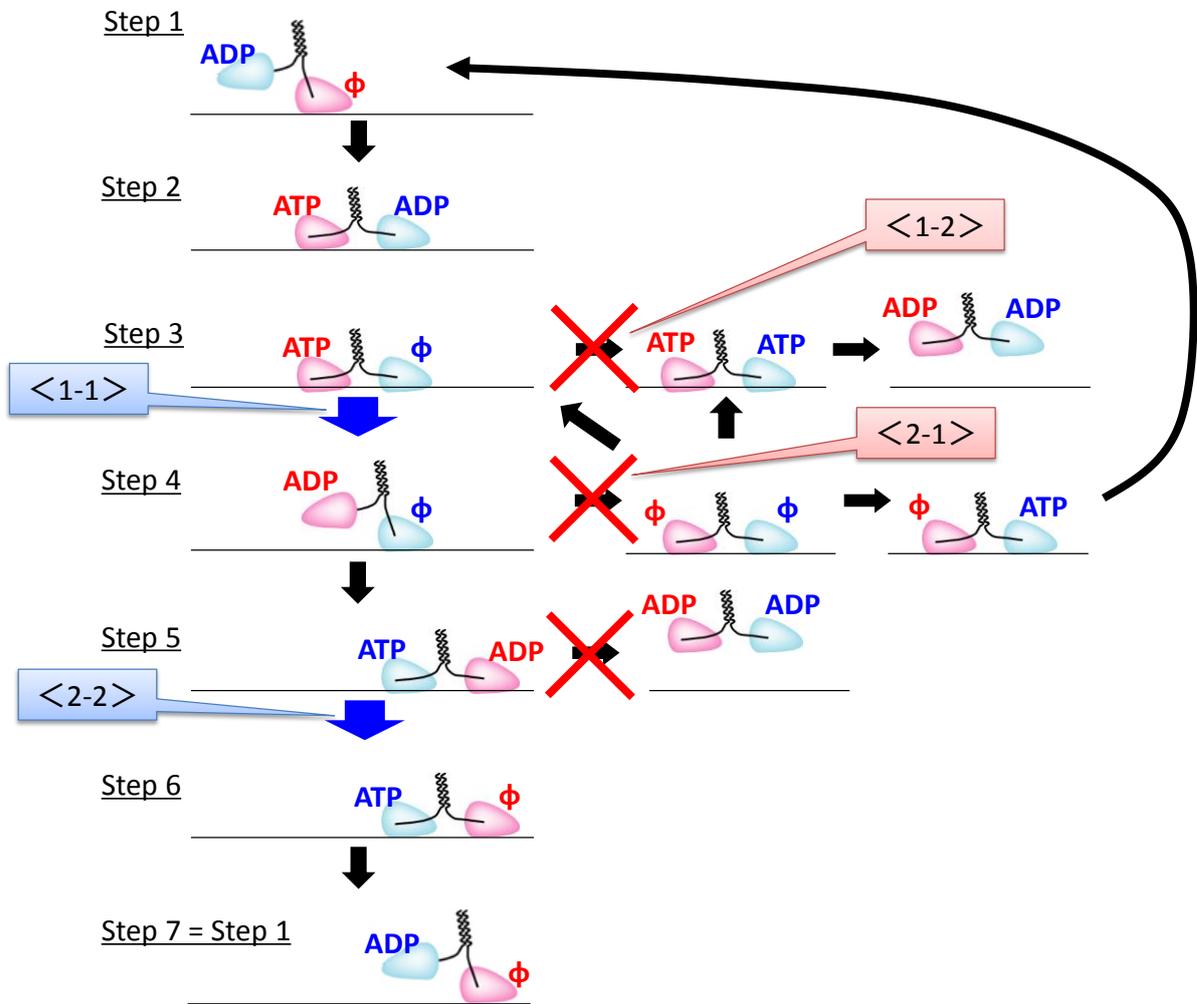


図 4-2 頭部間張力の寄与における 4 つのモデル

キネシンの運動中の状態遷移において、頭部間張力はある状態遷移を促進している、ないし冗長な状態遷移を抑制しているのではないかと考えられている。

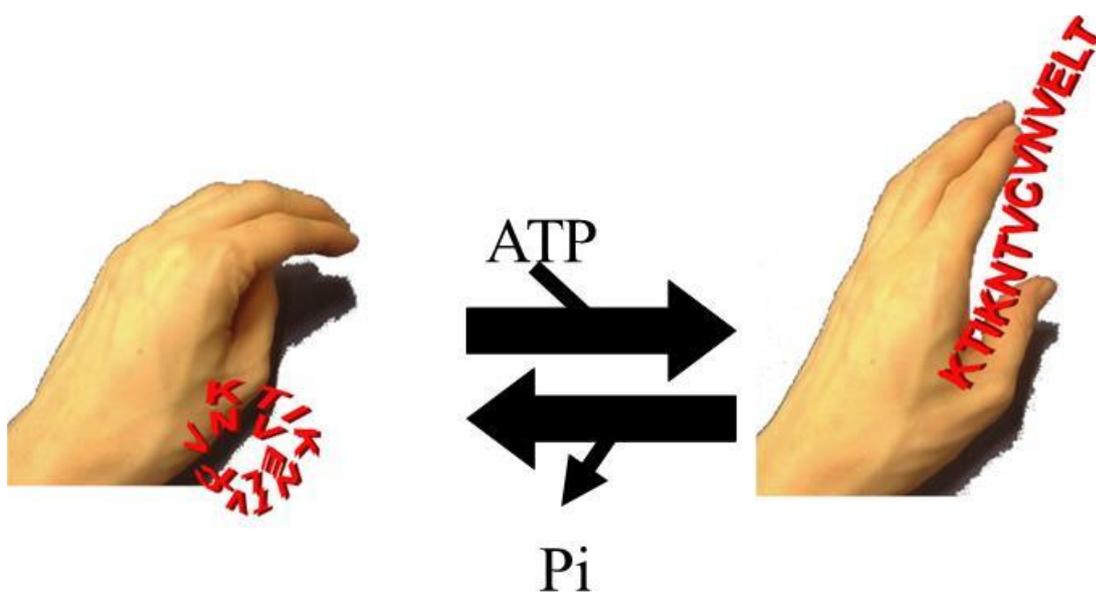


図 4-3 キネシン頭部の状態遷移に伴う構造変化の概略

キネシン頭部は、ヌクレオチド状態によって大きく Closed 型と Open 型の 2 つの構造をとると考えられている。2 つの構造とネックリンカーの位置関係がわかりやすいよう、ここでは手の甲を用いて構造の概略を示した。

第 5 章 謝辞

まず、ご指導いただきました上田卓也先生に感謝いたします。修士学生の頃より実験設備を貸していただき、また 2 章内容の論文投稿に際して多方面でアドバイスやサポートをいただいた原田慶恵先生に感謝いたします。本博士論文の審査をお願いし、有意義なご指摘をいただきました泊幸秀先生、伊藤耕一先生、船津高志先生に感謝いたします。DNA 二重鎖-キネシンの立ち上げに協力いただきました林真人博士に感謝いたします。DNA シートの立ち上げや AFM での観察に協力いただきました杉山弘先生、遠藤政幸先生に感謝いたします。最後に、学部時代より長きに渡り、研究について技術的にも精神的にもご指導していただきました多田隈尚史博士に心より感謝いたします。

2017 年 8 月 宮菌侑也

参考文献

Alonso MC, Drummond DR, Kain S, Hoeng J, Amos L, Cross RA. An ATP gate controls tubulin binding by the detached head of kinesin-1. *Science*. 2007 Apr 6; 316(5821): 120-3.

Block SM. Kinesin motor mechanics: binding, stepping, tracking, gating, and limping. *Biophys J*. 2007 May 1;92(9):2986-95.

Bustamante C, Marko JF, Siggia ED, Smith S. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*. 1994 Sep 9;265(5178):1599-600.

Carter AP, Diamant AG, Urnavicius L. How dynein and dynactin transport cargos: a structural perspective. *Curr Opin Struct Biol*. 2016 Apr;37:62-70.

Carter NJ, Cross RA. Mechanics of the kinesin step. *Nature*. 2005 May; 435(7040): 308-12.

Case RB, Pierce DW, Hom-Booher N, Hart CL, Vale RD. The directional preference of kinesin motors is specified by an element outside of the motor catalytic domain. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):959-66.

Case RB, Rice S, Hart CL, Ly B, Vale RD. Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility. *Curr Biol*. 2000 Feb 10;10(3):157-60.

Czovek A, Szollosi GJ, Derenyi I. The relevance of neck linker docking in the motility of kinesin. *Biosystems*. 2008 Jul-Aug; 93(1-2): 29-33.

Dominguez R, Freyzon Y, Trybus KM, Cohen C. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell*. 1998 Sep 4;94(5):559-71.

Dunn AR, Spudich JA. Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Mar;14(3):246-8.

Finer JT1, Simmons RM, Spudich JA. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 1994 Mar 10;368(6467):113-9.

Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, Saito K, Yanagida T. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*. 1995 Apr 6;374(6522):555-9.

Hackney DD. The rate-limiting step in microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains occurs while bound to the microtubule. *J Biol Chem*. 1994 Jun 10;269(23):16508-11.

Hackney DD. Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):6865-9.

Hackney DD. Highly processive microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):448-50.

Hackney DD, Stock MF, Moore J, Patterson RA. Modulation of kinesin half-site ADP release and kinetic processivity by a spacer between the head groups. *Biochemistry*. 2003 Oct 21;42(41):12011-8.

Hackney DD. *Biochemistry*. Processive motor movement. *Science*. 2007 Apr 6;316(5821):58-9.

Hahlen K, Ebbing B, Reinders J, Mergler J, Sickmann A, Woehlke G. Feedback of the kinesin-1 neck-linker position on the catalytic site. *J Biol Chem*. 2006 Jul 7; 281(27): 18868-77

Hancock WO, Howard J. Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol*. 1998 Mar 23;140(6):1395-405.

Hayashi M, Harada Y. Direct observation of the reversible unwinding of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(19):e125.

Hendricks AG, Perlson E, Ross JL, Schroeder HW 3rd, Tokito M, Holzbaur EL. Motor coordination via a tug-of-war mechanism drives bidirectional vesicle transport. *Curr Biol*. 2010 Apr 27;20(8):697-702.

Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):519-26.

Hirono-Hara Y, Ishizuka K, Kinoshita K Jr, Yoshida M, Noji H. Activation of pausing F1 motor by external force. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 22;102(12):4288-93.

Hirose K, Akimaru E, Akiba T, Endow SA, Amos LA. Large conformational changes in a kinesin motor catalyzed by interaction with microtubules. *Mol Cell*. 2006 Sep 15;23(6):913-23.

Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science*. 1969 Jun 20;164(3886):1356-65.

Jamison DK, Driver JW, Rogers AR, Constantinou PE, Diehl MR. Two kinesins transport cargo primarily via the action of one motor: implications for intracellular transport. *Biophys J*. 2010 Nov 3;99(9):2967-77.

Jiang W, Stock MF, Li X, Hackney DD. Influence of the kinesin neck domain on dimerization and ATPase kinetics. *J Biol Chem*. 1997 Mar 21;272(12):7626-32.

Kawaguchi K, Ishiwata S. Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin. *Science*. 2001 Jan 26;291(5504):667-9.

Kawaguchi K, Uemura S, Ishiwata S. Equilibrium and transition between single- and double-headed binding of kinesin as revealed by single-molecule mechanics. *Biophys J*. 2003 Feb; 84(2 Pt 1): 1103-13.

Kikkawa M, Okada Y, Hirokawa N. A resolution model of the monomeric kinesin motor, KIF1A. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):241-52.

Kikkawa M, Sablin EP, Okada Y, Yajima H, Fletterick RJ, Hirokawa N. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature*. 2001 May 24; 411(6836), 439-45.

Kikkawa M, Hirokawa N. High-resolution cryo-EM maps show the nucleotide binding pocket of KIF1A in open and closed conformations. *EMBO J.* 2006 Sep 20;25(18):4187-94.

Klumpp LM, Hoenger A, Gilbert SP. Kinesin's second step. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3444-9.

Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature.* 2010 Nov 4;468(7320):72-6.

Kull FJ, Sablin EP, Lau R, Fletterick RJ, Vale RD. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature.* 1996 Apr 11;380(6574):550-5.

Kunwar A, Tripathy SK, Xu J, Mattson MK, Anand P, Sigua R, Vershinin M, McKenney RJ, Yu CC, Mogilner A, Gross SP. Mechanical stochastic tug-of-war models cannot explain bidirectional lipid-droplet transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 22;108(47):18960-5.

Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2005;34:351-78.

Leidel C, Longoria RA, Gutierrez FM, Shubeita GT. Measuring molecular motor forces in vivo: implications for tug-of-war models of bidirectional transport. *Biophys J.* 2012 Aug 8;103(3):492-500.

Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, Wood MG, Learish R, Ohana RF, Urh M, Simpson D, Mendez J, Zimmerman K, Otto P, Vidugiris G, Zhu J, Darzins A, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol.* 2008 Jun 20;3(6):373-82.

Mathew-Fenn RS, Das R, Harbury PA. Remeasuring the double helix. *Science.* 2008

Oct 17;322(5900):446-9.

McKenney RJ, Huynh W, Tanenbaum ME, Bhabha G, Vale RD. Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes. *Science*. 2014 Jul 18;345(6194):337-41.

Mori T, Vale RD, Tomishige M. How kinesin waits between steps. *Nature*. 2007 Nov 29;450(7170):750-4.

Nguyen TM, Nakata E, Saimura M, Dinh H, Morii T. Design of Modular Protein Tags for Orthogonal Covalent Bond Formation at Specific DNA Sequences. *J Am Chem Soc*. 2017 Jun 28;139(25):8487-8496.

Nishiyama M, Muto E, Inoue Y, Yanagida T, Higuchi H. Substeps within the 8-nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr; 3(4): 425-28.

Nitta R, Kikkawa M, Okada Y, Hirokawa N. KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules. *Science*. 2004 Jul 30;305(5684):678-83.

Nitta R, Okada Y, Hirokawa N. Structural model for strain-dependent microtubule activation of Mg-ADP release from kinesin. *Nat Struct Mol Biol* 2008 Oct; 15(10): 1067-1075

Okada Y, Hirokawa N. A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science*. 1999 Feb 19;283(5405):1152-7.

Okada Y, Higuchi H, Hirokawa N. Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. *Nature*. 2003 Jul 31; 424(6948): 574–7.

Purcell TJ, Morris C, Spudich JA, Sweeney HL. Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 29;99(22):14159-64.

Rai AK, Rai A, Ramaiya AJ, Jha R, Mallik R. Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells. *Cell*. 2013 Jan 17;152(1-2):172-82.

Rai A, Pathak D, Thakur S, Singh S, Dubey AK, Mallik R. Dynein Clusters into Lipid Microdomains on Phagosomes to Drive Rapid Transport toward Lysosomes. *Cell*. 2016 Feb 11;164(4):722-34.

Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 1993 Jul 2;261(5117):50-8.

Rice S, Lin AW, Safer D, Hart CL, Naber N, Carragher BO, Cain SM, Pechatnikova E, Wilson-Kubalek EM, Whittaker M, Pate E, Cooke R, Taylor EW, Milligan RA, Vale RD. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*. 1999 Dec 16;402(6763):778-84.

Rosenfeld SS, Fordyce PM, Jefferson GM, King PH, Block SM. Stepping and stretching. How kinesin uses internal strain to walk processively. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18550-6.

Rothmund PW. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006 Mar 16;440(7082):297-302.

Sablin EP, Fletterick RJ. Coordination between motor domains in processive kinesins. *J Biol Chem*. 2004 Apr 16;279(16):15707-10.

Sahoo H, Roccatano D, Zacharias M, Nau WM. Distance distributions of short polypeptides recovered by fluorescence resonance energy transfer in the 10 A domain. *J Am Chem Soc*. 2006 Jun 28;128(25):8118-9.

Schnitzer MJ, Block SM. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):386-90.

Schuler B, Lipman EA, Steinbach PJ, Kumke M, Eaton WA. Polyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single-molecule fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 22;102(8):2754-9.

Seeman NC. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol*. 1982 Nov

21;99(2):237-47.

Shiroguchi K, Kinosita K Jr. Myosin V walks by lever action and Brownian motion. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1208-12.

Shubeita GT, Tran SL, Xu J, Vershinin M, Cermelli S, Cotton SL, Welte MA, Gross SP. Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets. *Cell*. 2008 Dec 12;135(6):1098-107.

Sindelar CV, Budny MJ, Rice S, Naber N, Fletterick R, Cooke R. Two conformations in the human kinesin power stroke defined by X-ray crystallography and EPR spectroscopy. *Nat Struct Biol*. 2002 Nov;9(11):844-8.

Song H, Endow SA. Decoupling of nucleotide- and microtubule-binding sites in a kinesin mutant. *Nature*. 1998 Dec 10;396(6711):587-90.

Spudich JA. The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 May;2(5):387-92. Review.

Strick TR, Bensimon D, Croquette V. Micro-mechanical measurement of the torsional modulus of DNA. *Genetica*. 1999;106(1-2):57-62.

Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ, Block SM. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*. 1993 Oct 21;365(6448):721-7.

Svoboda K, Block SM. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell*. 1994 Jun 3;77(5):773-84.

Taguchi H, Ueno T, Tadakuma H, Yoshida M, Funatsu T. Single-molecule observation of protein-protein interactions in the chaperonin system. *Nat Biotechnol*. 2001 Sep;19(9):861-5.

Thorn KS, Ubersax JA, Vale RD. Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J Cell Biol*. 2000 Nov 27; 151(5): 1093–100.

Tomishige M1, Vale RD. Controlling kinesin by reversible disulfide cross-linking.

Identifying the motility-producing conformational change. *J Cell Biol.* 2000 Nov 27;151(5):1081-92.

Tomishige M, Klopfenstein DR, Vale RD. Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. *Science.* 2002 Sep 27;297(5590):2263-7.

Tomishige M, Stuurman N, Vale RD. Single-molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Oct;13(10):887-94.

Turner J, Anderson R, Guo J, Beraud C, Fletterick R, Sakowicz R. Crystal structure of the mitotic spindle kinesin Eg5 reveals a novel conformation of the neck-linker. *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):25496-502.

Uemura S, Kawaguchi K, Yajima J, Edamatsu M, Toyoshima YY, Ishiwata S. Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 30;99(9):5977-81.

Uemura S, Ishiwata S. Loading direction regulates the affinity of ADP for kinesin. *Nat Struct Biol.* 2003 Apr;10(4):308-11.

Urnavicius L, Zhang K, Diamant AG, Motz C, Schlager MA, Yu M, Patel NA, Robinson CV, Carter AP The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. *Science.* 2015 Mar 27;347(6229):1441-6.

Uyeda TQ, Abramson PD, Spudich JA. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):4459-64.

Vale RD, Schnapp BJ, Reese TS, Sheetz MP. Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell.* 1985 Mar;40(3):559-69.

Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell.* 1985 Aug;42(1):39-50.

Vale RD, Schnapp BJ, Mitchison T, Steuer E, Reese TS, Sheetz MP. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell*. 1985 Dec;43(3 Pt 2):623-32.

Vale RD, Malik F, Brown D. Directional instability of microtubule transport in the presence of kinesin and dynein, two opposite polarity motor proteins. *J Cell Biol*. 1992 Dec;119(6):1589-96.

Vale RD, Funatsu T, Pierce DW, Romberg L, Harada Y, Yanagida T. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):451-3.

Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):467-80.

Wang MD, Yin H, Landick R, Gelles J, Block SM. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys J*. 1997 Mar;72(3):1335-46.

Visscher K, Schnitzer MJ, Block SM. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*. 1999 Jul 8;400(6740):184-9.

Yildiz A, Tomishige M, Vale RD, Selvin PR. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*. 2004 Jan 30;303(5658):676-8.

Yildiz A, Tomishige M, Gennerich A, Vale RD. Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell*. 2008 Sep 19;134(6):1030-41.

Yoshimura Y, Fujimoto K. Ultrafast reversible photo-cross-linking reaction: toward in situ DNA manipulation. *Org Lett*. 2008 Aug 7;10(15):3227-30.

Yun M, Zhang X, Park CG, Park HW, Endow SA. A structural pathway for activation of the kinesin motor ATPase. *EMBO J*. 2001 Jun 1;20(11):2611-8.

Zhang DY, Winfree E. Control of DNA strand displacement kinetics using toehold exchange. *J Am Chem Soc*. 2009 Dec 2;131(47):17303-14.

野口裕雅, 山田辰也 東京大学工学部物理工学科平成 18 年度卒業論文 2007