

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 宮菌 侑也

【背景】

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)。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・乖離させながら、8nm 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 μ m)を高速(60 歩/秒=500nm/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。両足状態で 2 つの頭部が結合する部位間の距離は、2 つの頭部をつなぐネックリンカーの長さと同程度であるので、両足状態ではネックリンカーに張力がかかっている、2 つの頭部が協調するためのコミュニケーションをこの張力が担っていると考えられている。頭部間張力が運動に寄与する機構を検証するには、張力を変化させたときの運動への影響を調べる必要があった。しかし、従来の蛋白変異体ベースでの手法では、頭部間張力を変化させるためにはネックリンカーの長さを変える必要があった。ネックリンカーの長さが変わると、浮いた頭部が結合部位へアクセスする際の届きやすさが変わり、やはり運動性能へ影響してしまうことから、従来は張力の影響のみを調べることは難しかった。

また、実際の小胞輸送ではキネシンを含めた複数の蛋白質によって形成された複合体により担われており、輸送の制御のためにはそれらの分子が協調して働く必要がある(分子間協調)。分子

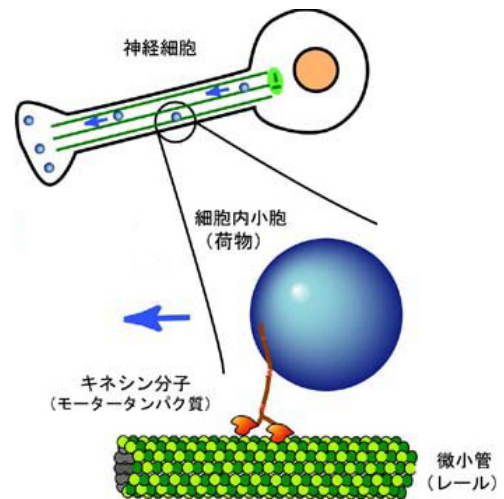


図 1. キネシンモーター蛋白質

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を *in vitro* で再構成し、その構造と運動性能の比較を行なうことが重要である。しかし、従来の蛋白ベースやリボソームを用いた手法では、これらのパラメータを同時に制御することは困難であった。

【研究目的】

本研究では、蛋白質ドメインや蛋白質分子を空間配置するためのツールとして DNA に着目し、DNA ナノ構造体を足場にドメイン・分子の空間配置を制御したコンストラクトを作製することで、キネシン分子内・分子間協調の解明を目指した。

DNA は、ペプチド鎖の 10 倍以上堅い上に、1 塩基(0.34nm)単位で長さを変えられるので、距離を厳密に制御可能であると考えられる。硬い DNA、および、短くやわらかくてばねのように働くリンカーを介してキネシンの頭部をつなげることで、キネシン頭部間の張力と距離を個別に制御できると考えた。それにより、頭部間張力が運動性能へ与える影響の検証を行なった。

さらに、近年の研究により、DNA を用いてさまざまな形状のナノ構造体の作製が可能となってきた。そこで本研究では、DNA ナノ構造体を足場にキネシン分子の空間配置を制御することで、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。

【結果】

1. 分子内協調：キネシンの前足後部に張力がかかることが、長距離歩行に重要である
キネシンが両足⇒片足状態へ移行する際に、ネックリンカーを介した張力が、頭部の結合・乖離を制御する方法として、2つのモデルが提唱されてきた(図 2)。

A. 促進(Mechanical gate)モデル：

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[Yildiz et al *Cell* 2008]

B. 抑制(Chemical gate)モデル：

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 [Hackney et al *Biochemistry* 2003]

2つのモデルは共に、頭部間にネックリンカー以外のポリペプチド配列を追加したネックリンカー伸長変異体を用いた検証から導かれたものである。この変異体ではネックリンカーにかかる張力が緩む一方で頭部間距離も変わってしまうことから、その影響により相反する2つの結果が出てきたと考えた。そこで、本研究では、キネシン頭部を DNA 二重鎖で結んだ DNA 二重鎖-キネシン(図 4)を用いることによって、運動性能に対する頭部間張力だけの影響を調べ、2つのモデルの検証を試みた。

まず、DNA 二重鎖-キネシンの作製方法の確立、および、溶液中で設計どおり機能することの確認を行なった。DNA 二重鎖-キネシンは表面のシステイン(Cys)残基をなくしたキネシン変異体に、新たに Cys 残基を導入し、この Cys 残基に蛍光

A. 促進(Mechanical gate) モデル



B. 抑制(Chemical gate) モデル



図 2. 張力による制御の2つのモデル

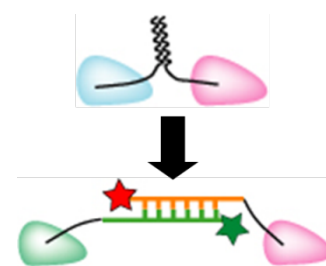


図 3. DNA 二重鎖-キネシン (ネックリンカー伸長型)

標識 DNA と共有結合させたものである。片方の DNA をセンス鎖とし、他方をアンチセンス鎖にした 2 種類のヘテロな DNA をそれぞれ標識したキネシン 2 種類を混合することで、二量体の DNA 二重鎖-キネシンを得ることができる。DNA 鎖と蛋白質の接続方向によって 2 種類のコンストラクトが作製できるが、本研究では、DNA 長によって頭部間距離の制御が可能な、ネックリンカー伸長型の DNA 二重鎖-キネシンを主に用いた。生化学的手法および FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer)法を用いた溶液中での二重鎖 DNA 長測定により、DNA 二重鎖-キネシンが二量体化していることを確認した。

続けて、DNA 二重鎖-キネシンを用いて、頭部間張力による結合・乖離の制御のモデルの検証を行なった。DNA 二重鎖-キネシンは、硬い棒のような構造をもつ DNA の長さだけでなく、DNA

～蛋白質をつなぐ柔らかい構造である炭素鎖リンカーの長さも変更することができることから、頭部間の距離と張り具合(バネの硬さに相当)をそれぞれ変えられるため、頭部間張力の影響のみを検証できると考えた。また、頭部が硬いバネとやわらかいリンカーで結ばれているという物理的モデルを仮定(図 4)することで、頭部間張力を見積もることができた。頭部間張力を弱めると、A.促進モデルでは後ろ足の解離速度が遅くなると考えられるので、速度に影響が出ると期待されるのに対し、B.抑制モデルでは後ろ足だけでなく前足も解離する確率が増えるので、長距離歩行(連続歩行距離)に影響が出ると期待された。実際にリンカー(バネとして働く)の炭素鎖数を 2, 6, 11 個と変えて、物理的モデルを基に見積もった頭部間張力と、速度・歩行距離の相関を調べたところ、歩行距離の方がより影響を受けていることが明らかになった(図 5)。この結果は B. 抑制モデルを支持する。

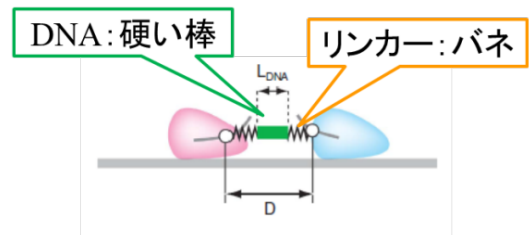


図 4. DNA 二重鎖-キネシンの物理的モデル

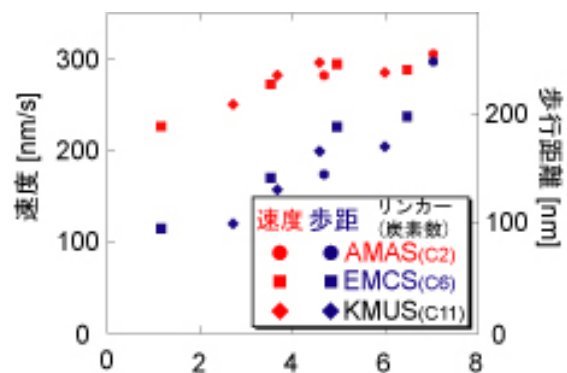


図 5. 頭部間張力は歩行距離に影響する

2. 分子間協調：接続分子数・種類により複合体の運動性能は変化する

DNA ナノ構造(DNA origami)にナノメートル精度で分子配置を行なうことにより、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(60x90 nm)の DNA ナノ構造(DNA シート)を用い、DNA シート上にキネシン分子および運動活性の低い分子をさまざまな空間配置で結合させ(図 6)、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。

まずは、DNA シートとキネシンの接続方法の検証を行なった。DNA-キネシンと同様に、DNA 鎖の

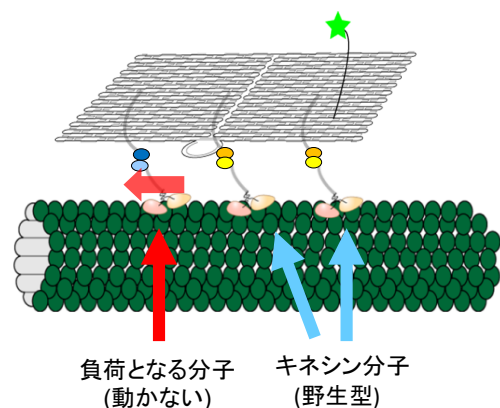


図 6. DNA シート-キネシン

ハイブリダイゼーションでの接続を試みたが、飽和状態でも DNA シートに対するキネシンの結

合効率が悪いことを AFM で確認した。結合効率を上げるため、DNA 鎖と異なり不可逆的な接続方法として、タグ蛋白質(SNAP タグおよび Halo タグ-蛋白質)を導入した。DNA シートの特定部位にタグ蛋白質リガンドを提示する事で、その部分に目的の蛋白質を配置することが可能である。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。

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。キネシン結合サイト(Halo リガンド)の数を 1~9 箇所に変えたところ、DNA シート-キネシンの運動速度はキネシン野生型単体と同程度であったのに対し、歩行距離については結合サイトが増えるほど長くなった(0.5 μ m \rightarrow 4 μ m)。一方、野生型キネシンだけでなく、ATP 加水分解が非常に遅い変異体

(E237A)の結合サイト(SNAP リガンド)を 1 箇所混ぜたところ歩行速度が遅くなり(557 \rightarrow 110nm/s)、変異体の数を 3 箇所に増やすと速度低下がより顕著になった(44nm/s、図 9)。この結果は、複合体の運動速度や方向性の制御のためには、運動性能の異なる蛋白分子が少なくとも 2 種類は必要であることを示唆している。

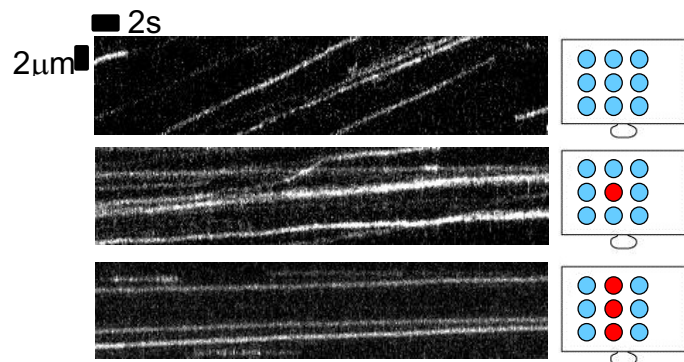


図 7. 変異キネシン(赤丸)は複合体速度に影響する

【結論】

我々は DNA-蛋白質複合体を用いたアプローチにより、ネックリンカーを介した頭部間張力が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、同様の手法が分子間協調の寄与を調べる上でも有用である可能性を示した。本手法は、キネシンに限らず様々な蛋白質に応用が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が期待される。