

研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 微小管を介した情報伝達の一分子イメージング

2. 研究者名： 武藤 悦子

3. 研究の狙い：

私は ATP 存在下で、モーター蛋白キネシンが、微小管上数 μm という広い範囲にわたって協同的に結合することを見出した。このことはキネシンが運動中に、相互作用している微小管の側に、キネシンに対する親和性を増加するような状態変化がおきていることを意味している。本研究の第 1 の狙いは、微小管に蛍光色素を標識し、その状態変化を蛍光スペクトルの変化として検出することのできる実験系を作ること、そしてこのことを利用して最終的には、微小管の状態変化を 1 分子顕微鏡下で視覚化できるようにすることである。つまり一言でいえば、微小管の状態変化を「見る」ことのできる実験系をつくることにある。そして第 2 の狙いは、状態変化を起している時の微小管に一体何が起きているのか、その実体に迫りたい。そのための 1 つのアプローチは外界からの電場、磁場などによって Perturbation を与え、微小管の状態変化に変調を与える試み（結果の(3)）であり、もう 1 つのアプローチは協同的結合の詳細な解析による、正確な現象の記述（結果の(4)）である。

4. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) チューブリンのリジン残基に蛍光修飾をした場合、クアマリンやフルオレセインなどの色素では、微小管の状態変化に伴って蛍光強度の減少が観察され、一方、NBD やダンシル、ピンポなどの色素では蛍光強度の増加が観察された。しかしいずれの場合も蛍光強度の変化はわずかであり、イメージングに利用できるような顕著なスペクトル変化は認められなかった。これらの複数の蛍光色素から得られたデータを総合的に考察した結果、キネシンの運動に伴って、蛍光色素の導入されたリジン残基の周囲の環境は疎水的に変化しているらしいことが明らかになった。

(2) リジン残基に導入した蛍光色素では、顕著なスペクトル変化を得ることができなかつたので、チューブリン分子の β 鎖 C 末近傍にあるグルタミン酸残基に、特異的に蛍光色素を導入する方法を新たに開発した。このサイトに蛍光色素ダンシルを導入した場合、キネシン分子の rigor 結合に伴って蛍光スペクトル強度が増加するのが観察された。しかし ATP 存在下でキネシンとの相互作用に伴って起こる微小管の状態変化については、残念ながらこれまでいかなる色素においてもスペクトル変化は認められていない。

(3) 「外部から Perturbation を与えることによって、キネシンによって誘導される微小管の状態変化に、何らかの変調を起すことができなだろうか？」という意図から、微小管に様々な周波数と電圧の電場を与え、キネシンの運動に与える影響を調べたが、少なくともこれまで試した範囲では電場の影響は全く現れなかった。

(4) キネシンコートしたビーズが微小管と相互作用する様子について、さらに詳細な統計的解析を行った結果、以下のことが明らかになった。

(4-a) ATP 存在下では、微小管上を動いているキネシンビーズの近傍数 μm の範囲で、新たなキネシンの結合が起こりやすくなっている。

(4-b) ATP がない時あるいは AMPPNP 存在下では、キネシンビーズの微小管への結合はランダムに起きている。

(4-c) ATP 存在下、協同的結合は微小管上に既に結合しているキネシンの + 側で起こり易い

(4-d) 一方キネシンが微小管上を動いている時には、協同的結合はその + 側と - 側で大体 2 : 1 の確率で起きている（- 側の結合は履歴による）。

自己評価

当初の目的であったイメージングに関しては、期待するほどの顕著なスペクトル変化を示す色素を見つけることができずに終わってしまった(結果の(1),(2)参照)。しかしリジン残基に蛍光色素を修飾した場合、複数の蛍光色素で、微小管の状態変化に伴って色素周辺の疎水性傾向が強くなるという結果が得られているので、やはり微小管には何らかの変化が起きているのだと考えられる。さきがけの期間の中では分子生物学的手法による分子改変にまで手を出す余裕がないと考えたので、手近なリジン残基あるいはグルタミン残基をそのまま利用して、ともかく手に入る色素は全て試してみたわけだが、結局それほど簡単にはいかなかった。今後はもっとじっくりチューブリンの発現系を作るところから取り組んで、分子改変によりチューブリン上の色々な場所で蛍光修飾を試み、時間はかかってもスペクトル変化をクリアーに検出できる実験系を作っていきたい。

一方キネシンの協同的結合の詳細な解析からは、これまで不可思議に思われた事実や、わからなかった点が解決され、微小管のダイナミズムを統一的に理解することができたと思う(結果(4)参照)。「数 μ mに及ぶ状態変化」や「数秒に及ぶ履歴」は、一見これまでの常識からはかけ離れているように思えるが、この2つの特徴にこそ現象のメカニズムを解く鍵があるように思えてならない。1つの可能性としては、大沢らが昔 Polyelectrolyte の理論的研究で示唆したように、そして Cantiello らが直接アクチンで検出したように、高分子ポリマーの表面にあるカウンターイオンの動きが何らかのメカニズムで整流されて、その結果ポリマー表面に非線形の電流が流れているのではないだろうか? 電場による Perturbation の実験は大した成果が得られなかったわけだが(結果(3)参照)、実験のやり方がまずかった可能性も十分に考えられるので、今後はこの分野の研究者と緊密に連絡を取り合っ、なお慎重に可能性を調べていきたい。最後に(4-c)、(4-d)の結果は、微小管とキネシンの相互作用ポテンシャルに異方性があることを示しており、近年提唱されているキネシンのブラウン運動モデルとも関連して、この異方性ポテンシャルがキネシンの運動を一方向に導いている可能性も考えられ、今後の展開が大変興味深い。

5. 領域総括の見解

蛍光ラベル法によってモーター蛋白質キネシン分子の微小管上の運動を追跡して、ATP 存在下でキネシンが動いている近傍で他のキネシンが微小管に結合しやすくなることを実証した。これはキネシンと微小管チューブリンの相互作用によると考えられ、蛋白質のダイナミックな構造変化からみて大変興味深い発見である。ただし、その分子構造変化の解明は容易ではない。

6. 主な論文等

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