

再構成運動系を用いたモーター蛋白質の研究

Molecular mechanism of motor proteins studied by *in vitro* motility assay

代表研究者 東京大学教養学部基礎科学科第一助教授 豊島陽子
Assoc. Prof., Dept. of Pure and Applied Sci., College of Arts and Sci.,
The Univ. of Tokyo
Yoko TOYOSHIMA

Motor proteins, such as myosin, dynein, and kinesin, support many kinds of motile activities in cell. To study the molecular mechanism of motor proteins, *in vitro* motility assay has become an indispensable means to obtain information about the molecular events. In most motility assay system developed so far, motor proteins are adsorbed onto a substrate in presumably nonspecific manners. Here, we have developed a novel *in vitro* assay system that allow us to hold motor proteins at specific sites. We have engineered the genes of motor proteins to put a reactive cysteine residue. This residue was reacted with biotin-maleimide and then tethered to the glass surface *via* biotin-avidin interaction. The kinesin heads tethered in this configuration supported the sliding movement of microtubules at a similar rate as intact kinesin. This novel motility assay system is useful to restrict the motor domain and to study the conformation change needed for motility. Further, immediate applications will include a new class of myosins and kinesin-like proteins.

研究目的

細胞運動を担うモーター分子（ミオシン・ダイニン・キネシン）の研究は、再構成運動系の開発により飛躍的に進歩し、モーター分子の挙動が分子レベルで捕らえられるようになってきた。再構成運動系では、単離精製したモーター分子をガラスやニトロセルロース膜などに吸着させ、アクチンフィラメントや微小管との相互作用を顕微鏡下で観察する。この時、モーター分子はおそらくは非特異的に吸着され、特定の部位で固定することはできなかったし、基板に対する向きもまちまちな不均一な系であったと思われる。その結果、生化学的測定と生理学的測定との関係はあいまいなものであった。

そこで本研究では、遺伝子工学の手法でモーター分子に変異を導入し、特定の部位を修飾してその部位で基板に結合させ、運動を調べる。これによって運動に必須の領域をアミノ酸レベルで限定することが可能であり、生化学的に均一な系を作り出すことができるであろう。

また、従来の再構成運動系では、無負荷の状態ではフィラメントの滑り運動を観察するものであったが、モーター分子の本質の一つは力を出すことであるから、再構成運動系で同時に力を測ることが必要である。これは、光ピンセットによる捕捉力を利用することで実現できる。このように、本研究の目的は、遺伝子工学と光ピンセットを利用して再構成運動系を本質的に改良し、運動発現機構を明らかにしようとすることである。

研究経過

材料としては、大腸菌で大量発現されているショウジョウバエのキネシン遺伝子を用いた。キネシンは反応性の高いSH基をもたないので、SH基としてシステイン残基を特定の部位に導入しその部位を基板に固定することを試みた。具体的には、他の蛋白質で知られている反応性の高いSH基を含む塩基配列をPCR法でキネシン頭部の遺伝子のC末端側に導入した。作製したクローンは大腸菌での発現率が良く、GSTのフュージョン蛋白質として大腸菌蛋白質の約50%近く

を占めた。GST アフィニティークロマトグラフィー、スロンピン消化による GST 部分の切り離し、微小管アフィニティーなどによる精製の後、単離されたキネシン頭部の蛋白質は、ATPase 活性を持ち、微小管結合能力を持つものであった。導入したシステイン残基はビオチン・マレイミドとの反応性が非常に高く、特異的に修飾された。このようにビオチン化されたキネシン頭部はアビジンに結合し、さらにアビジンを介してガラス上のビオチン化 BSA に結合し、再構成運動系で微小管を動かすことができた。運動の速度は、 $0.8 \mu\text{m}/\text{sec}$ 前後であり、intact な full length のキネシンと同様であった。

モーター蛋白質のモータードメインの特定の部位をガラス上に固定することは、ミオシン頭部においても成功した。ミオシン頭部は結晶構造が解かれ、主体部と頸部からなることが明らかになっているが、遺伝子操作で頸部を除いた主体部の C 末端側にシステイン残基を導入した。細胞性粘菌で発現された短いミオシン頭部は、単離精製の後、ビオチン・マレイミド、アビジンと反応させ、ガラス上のビオチン化 BSA に結合し、アクチンフィラメントを動かした。運動の速度は、頸部を含むミオシン頭部全体の場合と同様であった。

一方、再構成運動系でモーター分子が出す力を、レーザー光による光ピンセット法で測定するべく、顕微鏡に光ピンセットを組み込むことを試みた。本研究助成により、半導体励起型の連続発振モードの Nd-Yrf レーザーを購入し、顕微鏡にレーザー光を導入する系の設計・組立を行った。まず、レーザービームをアラインさせるためにテレスコープとステアリングを組み込んだ。シャッターには電磁式のものを採用し、手を使わなくても瞬時に操作できるようにフットペダルを取り付けた。光ピンセットの捕捉力を連続的に可変にするために、レーザーの出力を調節する必要があるが、このためには光路にグランレーザープリズムを入れ、自動ステージで回転させるようにした。これのコントローラーを RS232C を介してコンピューターに接続した。制御のためのプログラムを現在開発中である。グランレーザープリズムを

通った後のレーザーの出力をモニターするために、ビームサンプラーを光路にいれ、約 4% のレーザー光をサンプリングして、シリコンフォトダイオードをセンサーとしたパワーメーターで測定した。パワーメーターの出力を AD 変換ボードによりコンピューターに取り込み、顕微鏡での運動を記録するためのビデオに数値化して表示させた。これにより、光ピンセットを使用中に捕捉力のインデックスを画像とともに記録することができるようになった。

研究成果

細胞運動のメカニズムを分子レベルで研究するために、1980 年代から再構成運動系が開発され、簡便で再現性がよいことから多くの研究室で使われてきた。今回、アビジン・ビオチン相互作用を利用して、モーター分子の特定の部位をガラス上に固定して運動を観察することに成功した。このことにより、今までの再構成運動系は本質的に改良され、新たな実験系が確立された。

キネシン分子の頭部にモータードメインがあることは知られていたが、今回キネシンの運動メカニズムについて得られた新たな知見は、intact な分子と同様に 2 個頭でなくとも、単頭の頭部のみで 2 個頭の場合と同様な速度で微小管を動かすことができるということである。

さらに、ミオシン分子について得られた結果は、1 個の頭部の約 2/3 に相当する部分だけでアクチンフィラメントを運動させることが可能であるということ、これは、運動を惹起するにはミオシン頭部全体にわたる大きなコンフォメーション変化が必要でないことを意味する。

今後の課題と発展

本研究により確立された、モーター分子の特定の部位を固定することは、汎用性の高いものである。この新たな再構成運動系と遺伝子工学の手法を用いて、モータードメインの限定や機能部位の改変などを容易に調べることができる。さらに、運動のために必要なコンフォメーション変化と固定点の関係なども明らかにすることができるであろう。また、遺伝子が固定されているが機能が明らかでない数多くのキネシン様蛋白質や各クラス

のミオシンの運動活性を検定することもできる。特に、微小管に対して運動の向きが異なる2種のキネシン様蛋白質のキメラを作製し、運動の方向を決定するメカニズムを追究することも可能である。

本研究では、光ピンセットを顕微鏡に実装して粒子を捕捉することを可能にしたが、再構成運動系でモーター分子が発生する力を測定するには至らなかった。光ピンセットの捕捉力は、レーザーの出力により調整できるが、実際の捕捉力は理論的に求めがたく、溶液中のビーズを捕捉しつつ顕微鏡ステージを動かすことにより、実験的にキャ

リプレートする必要がある。あるいは、すでに報告されているモーター分子が発生する力の値をインディケーターとして、比較測定することができるであろう。

以上のように本研究で確立した、モーター分子の特定部位の固定と光ピンセットによる捕捉を導入した新しい再構成運動系は、さまざまなモーター分子のメカニズムの研究に応用が可能で、今後、運動発生機構の核心に迫る研究の展開が期待できる。

発表論文

なし(平成5年度中に投稿予定)