

二本足で歩く分子モータータンパク質キネシンの足の動きを精細に可視化

1. 発表者：

磯島 広（東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻 博士課程修了／研究当時：大学院生）

飯野 亮太（自然科学研究機構分子科学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授）

新谷 大和（東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻・量子相エレクトロニクス研究センター 特任助教）

野地 博行（東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 教授）

富重 道雄（東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻 准教授）

2. 発表のポイント：

- ◆分子モーターキネシン（細胞内での輸送に関わるタンパク質）が二足歩行運動する際の片足の動きを、従来よりも 100 倍以上高い時間分解能で一分子観察することに成功した。
- ◆キネシンが片方の足を前に踏みだす動きの詳細を明らかにし、また効率的に歩くには両足をつなぐリンカーの長さが重要であることを示した。
- ◆ナノメートルサイズの生体分子機械が効率的に働くために必要なデザインの一端を明らかにしたことで、極小空間で働く人工的な分子機械の創出に役立ち、今後の医療や工学に応用できることが期待される。

3. 発表概要：

キネシンは二つの足を交互に動かして、まるで歩くようにして運動する分子モーターと呼ばれるタンパク質で、一分子計測法によってキネシンがステップ状に運動することが示されてきました。しかし、従来の手法では時間分解能が低いため、ステップの途中の動きを直接観察することが困難でした。

今回、全反射照明型暗視野顕微鏡法（注1）という新しい手法を用いることによって、これまでにない高い時間分解能でキネシンの片足の動きを詳細に観察することに成功しました。

その結果、キネシンの片足はレール（細胞骨格の一種である微小管）から離れた後、右側で激しくゆらぎ、その後もう片方の足に ATP（注2）が結合すると前に着地する、という様子が明らかになりました。また、両足をつなぐリンカーを伸ばすと、片足を浮かせた状態を保てなくなり、頻繁に浮いた足が後ろに戻るようになることが分かりました。

本研究の成果は、分子機械が働くために必要なデザインや仕組みの一端を明らかにするものであり、人工的な分子機械の設計に役立てられ、今後の医療や工学に応用できることが期待されます。

4. 発表内容：

<研究の背景>

人間の体の中には機械のように動作してさまざまな仕事を行うタンパク質（分子サイズの機械、または「分子機械」）が存在し、それらがエネルギーを消費しながら多様な仕事を果たすことで、生命活動が維持されています。特に分子モーターと呼ばれるタンパク質は、一方向性の運動や回転運動を行うことで、物質輸送やエネルギー産生などの細胞内での重要な活動に従事しています。キネシンは分子モーターの一種であり、細胞の中に張りめぐらされた微小管と

呼ばれるレールに沿って一方向に移動することで、タンパク質の詰まった荷物や細胞内小器官を運んでいます。一分子計測法と呼ばれるタンパク質一分子の動きを可視化する手法を用いて、キネシンは8ナノメートル（注3）のステップで規則正しく運動し、また片方の足はその2倍のステップで運動する、つまり2つの足を交互に前に踏みだしながら、まるでヒトが歩くように運動することが示されていました。しかし、キネシンのようにナノメートル程度の小さな分子がどのようにして歩くのかについてはまだよく分かっていません。キネシンの質量はとても小さく慣性は働かないので、浮かせた足を勢いに任せて前に着地させることはできません。さらにキネシンは水中で歩くので、熱運動する周囲の水分子がものすごいスピードであちこちからぶつかってきます。この水の衝突により浮いた足はふらふらとブラウン運動（注4）すると考えられ、キネシンが歩く仕組みは人間が歩く仕組みとは大きく異なると考えられています。それを明らかにするには、キネシンが歩く様子を詳細に調べる必要があります。しかしこれまでの一分子計測法では、時間分解能がキネシンの一歩を踏み出す速さ（10ミリ秒に一歩）に対して十分でなかったり、時間分解能が高くても光ピンセット法（注5）を使って自由な動きを制限しなければ測れなかったりと、ステップを観察することはできても、その途中の様子、つまりキネシンが足を後ろから前へ踏み出す様子を直接観察することはできませんでした。

<研究の内容>

本研究グループは直径40ナノメートルの金ナノ粒子をプローブ（観察用の目印）としてキネシンの片足に結合させ、その動きを全反射照明型の暗視野顕微鏡を用いて観察することで、従来より100倍以上高い時間分解能（55マイクロ秒）と1ナノメートルの位置決定精度で、片足の動きを可視化することに成功しました（図1）。金ナノ粒子はキネシンの足（5ナノメートル程度）よりも大きいですが、ナノメートルスケールの環境では重力や慣性の影響はほとんど無視でき、実際にキネシンの運動にはまったく影響を与えませんでした。この観察によって、片足がレールである微小管から離れた後、浮いた足はブラウン運動で激しく揺らいでいることが示されました。しかし予想外なことに、揺らぎは前後左右に等方的ではなく進行方向に対し右側に偏っていました（図2）。この右側への偏りは、キネシンの両足を繋ぐ「脚」（リンカー）が足の右側から生えているため、そこから伸びたリンカーは自由に揺らぐのではなく、足にぶつかって右に押し出されるということを示すものです（図2）。また、この片足を浮かせた状態は2つのステップからなり、微小管に結合した足へエネルギー源であるATPが結合するのを待つステップと、ATPが結合した後その足の形が変化して浮いた足が前に着地するステップからなることがわかりました。さらに、両足を繋ぐリンカーを人工的に長くすると、ATPが結合するまで片足を浮かせた状態を維持することができなくなり、後ろ足が浮いた後すぐに後ろや前に着地するようになりました。また後ろに戻るだけでなく左右にも頻繁に移動し、酔っ払いの千鳥足のような無駄な動きをするようになりました（図3）。これらの結果は、リンカーが最適な長さであることが、エネルギーを無駄に消費することなく効率的に二足歩行するために重要であるということを示すものです。

<社会的意義と今後の展望>

生体内で働くナノメートルサイズの分子機械は、身近にあるマクロなサイズの機械と比べるとはるかに小さいため、マクロな機械（たとえばロボットなど）とは全く異なる動作原理で働いていると考えられます。今回の研究成果により、キネシンは二つの足を交互に動かすという点では人間やロボットの二足歩行に近いものの、足を後ろから前に踏み出す詳細な動きや浮い

た足が後ろに戻るのを防ぐ仕組みは大きく異なることが明らかになりました。これらの知見は、生体分子機械が働く基本原理の解明に役立つのみならず、極小空間でさまざまな作業を行う人工的な分子機械（ナノマシン）を設計する上での重要な指針を与え、応用工学や医療に応用できるものと期待されます。また一分子計測法の時間分解能を大幅に改善する今回の手法は、今後さまざまな分子モータータンパク質に応用されることで、多様な生体分子機械の動作機構の解明に役立つであろうと考えられます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature Chemical Biology」（2月29日）

論文タイトル：Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1

著者：Hiroshi Isojima#, Ryota Iino#, Yamato Niitani, Hiroyuki Noji, Michio Tomishige*
（#共同筆頭著者）

DOI 番号：10.1038/nchembio.2028

6. 問い合わせ先：

自然科学研究機構分子科学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター
教授 飯野 亮太（いいの りょうた）

東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻
准教授 富重 道雄（とみしげ みちお）

7. 用語解説：

（注1） 全反射照明型暗視野顕微鏡法

暗視野顕微鏡法とは、試料により散乱された光を検出することで、コントラストを上げて観察する手法である。全反射照明とは、光を全反射させたときにできるしみ出し光を照明光として用いる方法であり、コントラストをさらに向上させることができる。金ナノ粒子は強い散乱光を発するため、暗視野顕微鏡法のプローブ（観察用の目印）としてよく用いられる。

（注2） ATP

アデノシン3リン酸の略で、生体内のさまざまなタンパク質分子機械のエネルギー源として用いられる。加水分解によってADPに変換されることで、分子機械にエネルギーを供給する。

（注3） ナノメートル

ナノは、十億分の1を意味する接頭辞であり、1ナノメートルは十億分の1メートル、つまり、百万分の1ミリメートルに対応する。

（注4） ブラウン運動

熱運動する周囲の分子の衝突によって引き起こされる不規則な運動。ロバート・ブラウンが発見したためこの名がついた。

(注5) 光ピンセット

集光させた光で分子を結合させたプラスチックビーズ等を補足して操作する方法。分子に力を加えることもできる。

8. 添付資料：

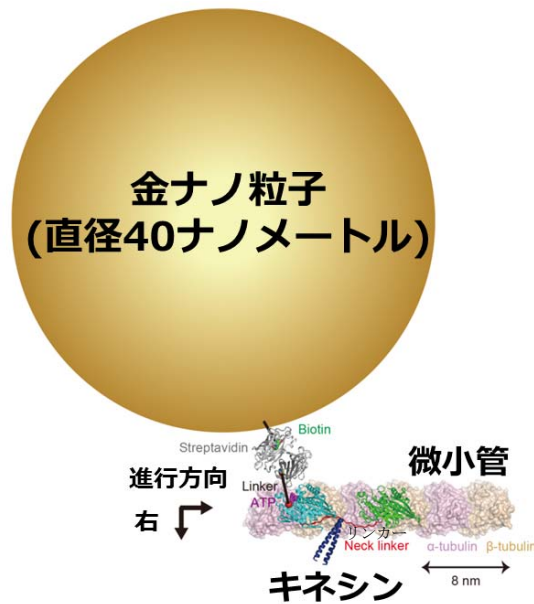


図1：微小管上を運動するキネシンとその片足につけたプローブ

キネシンは2つの足がリンカー（細いひも状の構造体）でつながれた構造をしている。キネシンの片足に金ナノ粒子を結合させてその動きを観察することで、片足の動きを可視化した。

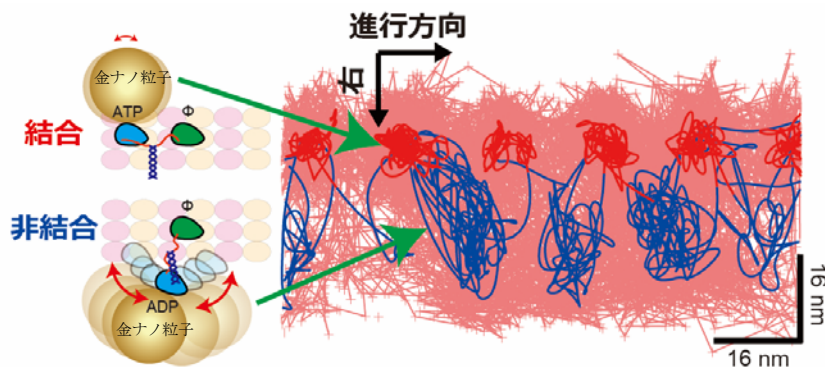


図2：高速暗視野顕微鏡を用いたキネシンの片方の足の運動の一分子観察

(左) 金ナノ粒子をつけた方の足がレールである微小管から離れる（非結合）と、金ナノ粒子のゆらぎが大きくなる。

(右) 暗視野顕微鏡を用いて 55 マイクロ秒の時間分解能で観察した金ナノ粒子の動き。微小管への結合と解離（非結合）を繰り返しながらまっすぐ一方向（図の右方向）に運動している。解離した後は進行方向に対して右側へ移動して激しくゆらぐ様子が観察された。

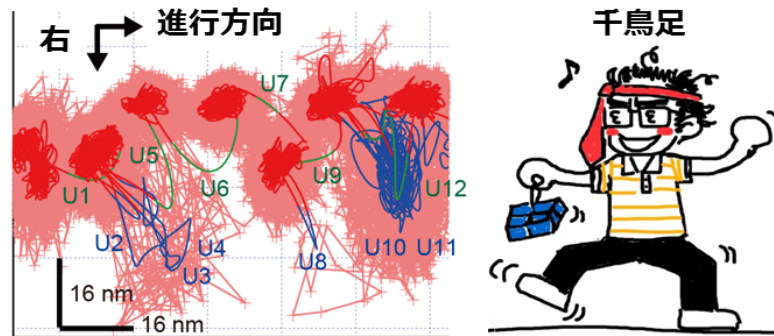


図3. 両足をつなぐリンカーを人工的に伸ばしたキネシンの足の動き
浮いた足が後ろに戻ったり、また隣のレールに移ったりするようすが頻繁に見られた（微小管は13～15本のレールが円柱状に束になった構造をしている）。