

## 論文審査の要旨及び担当者

「全反射型蛍光顕微鏡による微小管キネシン系の運動性の一分子イメージング解析」

### 論文審査の要旨

#### 1. 論文の概要

本論文では、真核生物の生体内で重要な役割を担う「微小管-キネシン系」の運動について、2つの異なる光学顕微鏡を用いた一分子イメージング方法で解析している。そして顕微鏡下で得られたダイナミックな構造が、微小管の3次元結晶構造モデルとどのように対応できるかを、ドッキングシミュレーション解析によって比較している。

自然界には、様々な階層における生物の“動き”が観察され、個体の移動から細胞内の小器官の微小な変位まで、多岐にわたっている。そしてこれらのほとんどは化学エネルギーを力学的な仕事に変換する特徴的なタンパク質、もしくはその超分子複合体によって実現されている。それらの効率の高さや正確な動作から、動きの礎となるタンパク質は数十年にわたり多くの研究者を魅了し続け、今や“分子モーター”あるいは“分子機械”とも呼ぶべき重要な研究対象という地位が確立されている。

数ある分子モーターの研究の歴史の中でも、キネシンは、1985年と遅くに発見されたものの、分子レベルでの運動メカニズム解明の先陣を切った。生体内で微小管に結合し、微小管のレールに沿って小胞体を運ぶ役割がある。他の分子モーター同様、アデノシン三リン酸を加水分解し、そのときに得られる化学反応のエネルギーを力学的なエネルギーに変換させて運動する。そして光学顕微鏡を用いた、ナノメートルレベルでの変位をリアルタイムで知ることができる精密測定によって、2つのヘッドと呼ぶ部位を交互に微小管に結合させながら8nmずつ1方向に運動することが明らかになっている。

西坂研究室では2008年に、単量体キネシンが駆動する微小管の運動を3次元で可視化する光学顕微鏡を開発した（3次元位置検出顕微鏡）。また、偏光やエバネッセント場といった

光学を利用する観察方法も開発している。このような技術を利用して、活性がある状態での微小管キネシン系の運動を知ることと、化学状態を測定する系の構築が本論文のテーマである。

第一章では、微小管を駆動するシングルヘッドキネシンの運動について、回転方向への力発生という観点から進めた研究について述べている。単量体キネシンが微小管に及ぼす力は、微小管の長軸方向だけでなく垂直な方向も含む。そのため、単量体キネシンをつかっただけの微小管の滑り運動系では、微小管は一定の速度で左に回転しながら並進する運動（以下コークスクリュー運動と呼ぶ）をする。興味深いことに、コークスクリュー運動は二量体キネシンでは見られず、単量体キネシンにただけでどうしてこのような運動をするかを説明することは重要な課題である。藤村氏はミュータントキネシンを用いたコークスクリュー運動の定量化を試みた。

キネシンの力発生にはN末端のネックリンカーが重要であることがわかっている。しかしネックリンカーを削除すると運動性自体も損なう可能性がある。そのためネックリンカーと相互作用するC末端の特徴的な構造、「カバースtrand」を変異させたミュータント4つについて、その運動を微小管に結合させた量子ドットを通じて3次元位置検出顕微鏡を用いて観察した。すべてのミュータントは微小管を左らせんに回転させ、野生型に比べてすべてのミュータントで30%~80%並進速度が遅くなった。このことからカバースtrandがトルク発生の分子機構の一部であることがわかった。また、回転のピッチについては減少したミュータントと増加したミュータントがあった。そこで回転方向に負荷をかけるためにダブルヘッドキネシンをシングルヘッドキネシンのミュータントに混ぜ、比率を変えて同様の実験を行った。これらの詳細な解析より、速度に比例した分子摩擦のつり合いによってピッチが説明できることを示し、シングルヘッドキネシンがトルクを生み出す機構を説明した。

第二章では、光学顕微鏡を使った蛍光色素の1分子イメージングの測定において2つの問題を提起している。

1つ目は測定技術の問題である。蛍光色素の向きは人工的に固定することができないため、実験的にキャリブレーションが成功している例は報告されていない。今回、理論の上では確立されたと考えられている1分子技術「デフォーカス法」について、実験結果に基づいた確度の評価を行い、補正方法の確立に成功した。

第1章で詳述した、微小管-キネシンの系を用いて色素を回転させる。コークスクリュー運動をする微小管上に、基質であるグアノシン三リン酸（以降 GTP と呼ぶ）のアナログである TAMRA-GTP をまばらに結合し、1分子レベルで観察するのである。コークスクリュー運動の回転に伴い、蛍光色素 TAMRA も一定速度で回転する。その結果、色素1分子のデフォーカス像から角度のレファレンスを作ることができた。また、微小管の長軸に対する蛍光色素 TAMRA の振動双極子モーメントの向きがわかり、その向きにバリエーションがあることもわかった。

2つ目の問題は、化学変化の素過程における酵素の構造変化に関するものである。蛍光アナログを用いることで、1分子レベルでの基質の検出そのものは可能であり、原理的には化学状態の推移を検出できる可能性もある。だが基質に比べて大きな色素分子が、どのような結合様式を取るのかについては圧倒的に情報が不足している。アナログの特異な構造が酵素の活性を阻害する可能性も否定できない。こういった点を明らかにするために、TAMRA-ヌクレオチドと微小管を構成する tubulin たんぱく質のドッキングシミュレーションを行った。

ドッキングシミュレーションは、タンパク質とリガンドの結合をエネルギー計算から予測する方法である。パッケージが提案する構造様式の幾つかにおいては、結合した色素の角度は、1分子実験の結果である微小管の長軸に対する蛍光色素 TAMRA の振動双極子モーメントの向きと一致した。この結果からヌクレオチドから微小管の内側にリンカーが伸び、TAMRA が微小管の内側に存在することが類推された。また計算された結合様式から、1分子実験の結果である振動双極子モーメントの向きのバリエーションには、ヌクレオチド状態の違いが含まれることが示唆された。

## 2. 審査の方法, 内容の評価, および結論

本論文は、平成 28 年 11 月に提出された論文を3名の審査員がそれぞれ査読し、さらに平成 29 年 2 月 27 日に開催した公聴会と質疑応答をもとに審査した。

本論文の注目すべき点は、1分子生物物理学において中心的なツールとなっている光学顕微鏡技術について、本質的な技術の底上げを行ったことである。キネシン-微小管系という確立された実験系を巧みに応用し、そこに蛍光性基質という独自の着眼点を加え、基礎的な部分を

押さえつつもこれからの広範な測定に応用できる新しい方法論を展開した。3名の審査員は、これらの独自性について本論文を通じて高く評価した。

以上に述べたように、本論文は博士の学位論文として十分な内容があり、3名の審査員は一致して、本学位申請者に博士の学位を授与することがふさわしいと結論した。

論文審査主査 西坂 崇之 教授  
渡辺 匡人 教授  
矢島 潤一郎 非常勤講師  
(東京大学 准教授)