

学位論文題名

Study on Dynamic self-assembly of
Microtubules by Kinesin

(キネシンによる微小管の動的自己組織化に関する研究)

学位論文内容の要旨

動物をはじめとする生物の運動には、モータータンパク質が化学エネルギーを運動エネルギーに変換するという現象が深く関わっている。分子生物学の発展と1分子計測技術の進歩は、これらの分子の力学的な特性を明らかにしてきたが、その一方で、これらの多分子集合体としての機能については未知の部分が多い。

“アクチン・ミオシン”のモータータンパク質系に関しては、アクチンにカチオン性高分子を混合することで比較的極性の揃った集合体が自己会合によって形成し、さらにそれらがモータータンパク“ミオシン”との相互作用により約 $1\mu\text{m}/\text{sec}$ の速さで運動することが報告されている。しかし、ミオシンモーターの逐次前進性(プロセスシビティ)が低いことや最大発生力が 1pN 程度とそれ程大きくないことから、その応用展開に制限があった。そこで、本研究では最大で $\sim 7\text{pN}$ と高出力で、且つ高いプロセスシビティを有するモータータンパク質系“微小管・キネシン”に着目した。これらを *in vitro* で秩序立てて再構築することで、新たな特性を付した ATP 駆動型アクチュエーターの創成を目標とした。

本学位論文は第1章の序論、第2章から第4章の本論、第5章の結論から構成され、キネシンの駆動力による微小管の自己組織化に新たな知見を与えている。その研究結果は以下のとおりである。

第2章では、ブタ脳由来のチューブリンを *in vitro* で重合して得た微小管を、キネシンを固定したガラス基盤上で ATP の加水分解によって駆動させ、その動態を観察した。少数ではあるが、反時計回りの回転を示す微小管が存在する事を発見した。微小管の調製条件を変化させると、この偏った回転を示す微小管の数が増えることから、微小管の構造に関連していると仮説を立てた。*In vitro* で調製した微小管はこれを構成するプロトフィラメントの本数によって、プロトフィラメントの配置される螺旋の回転方向が変化する事が報告されている。そこで、透過型電子顕微鏡で微小管の断面構造を観察し、その構造と回転方向の傾向に相関があることを明らかにした。

第3章では、キネシン基盤上を微小管が滑り運動をする際に、微小管同士を架橋することで集合体形成する実験を行なった。予めビオチン修飾した微小管をストレプトアビジンで部分的に覆い、滑り運動中に衝突した微小管同士がストレプトアビジン

で架橋されるようにした。ATP の添加によって運動を開始してから数分～数時間に渡って、衝突する微小管が束になる様子が観察された。形成される微小管集合体について、架橋剤となるストレプトアビジン、微小管の初期濃度、キネシンの密度を変化させて長さや運動能を評価した。ストレプトアビジン濃度の影響を調べた所、微小管表面のビオチンに対して、添加したストレプトアビジン濃度がおよそ等モル比のときが、長い微小管集合体を形成するとともに、運動能を維持する限界である事が分かった。次に、このストレプトアビジンの添加量比を固定して、微小管の初期濃度を変化させた所、添加した微小管濃度が高いほど、微小管集合体が形成されやすく、太さ方向の成長も大きいことが示された。キネシンの濃度変化の影響については、低濃度では特に短い微小管集合体の駆動能が低下する結果となった。

これらの実験条件において、直線状の微小管集合体が観察される一方で、リングが形成されるものも見られた。直径は数 μm のものから最大で数十 μm であった。直線状に比べ、リング状の微小管集合体は同位置で運動を続けるため、直線状の微小管集合体よりも長時間の運動性を示した。リングの回転方向については、反時計回りに回転するものが常に多くなるという結果になり、第2章での架橋しない微小管の回転運動の結果と同様の傾向を示した。

第4章では、微小管集合体を形成する微小管の性質を剛直にすることで、形成される微小管集合体の形態・動態に与える影響を調べた。GTPのアナログである GMPCPP を用いて重合することで、微小管は剛直性を増す事が報告されている。これを用いてキネシン基盤上で自己組織化させると、直線状の微小管集合体が選択的に形成され、リングがほとんど形成されない結果となった。

以上の結果より、次のように成果をまとめられる。1) *in vitro* 重合した微小管について、プロトフィラメント数分布に示される構造とキネシン固定基板上での滑り運動では相関が見られた；2) ビオチン・ストレプトアビジンの相互作用によって架橋される微小管集合体形成について、長さや運動能にあたる初期条件の影響について広く知見を得た；3) 微小管集合体のリングについても、一本の微小管の運動方向の傾向を反映できることが示された；4) 剛直な微小管を用いる事で、直線状の微小管集合体を選択的に形成できることがわかった。

本研究で得られた知見は、ナノマシンとして近年注目が集まっているキネシンー微小管の応用を、ナノからマイクロのサイズにスケールアップして利用するのに有益であり、1本の微小管の偏った動きが集合体でも保存されるという知見は、マイクロマシンの構築に新たな展開をもたらすものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	龔	劍	萍
副査	教授	河	野	敬一
副査	教授	出	村	誠
副査	准教授	古	川	英光

学位論文題名

Study on Dynamic self-assembly of Microtubules by Kinesin

(キネシンによる微小管の動的自己組織化に関する研究)

近年、モータータンパク質の力学やメカニズムに関する研究が盛んに行われている。その多くは一分子の挙動について解析がなされてきたが、多分子集合体としての機能については未知の部分が多く、今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、モータータンパク質系“微小管・キネシン”を用いた多分子集合体の構築とその性質について知見を得る事を目的とし、キネシンの発生する力で能動的に微小管の集積体を形成し、これを解析することで微小管の自己組織化に新たな知見を与えている。

*in vitro*重合した微小管について、キネシン固定基板上での滑り運動中、一部の微小管が示す回転運動を観察し、反時計回りの回転運動が優位であるという非対称性を発見した。電子顕微鏡で微小管の構造を解析することとで、微小管のプロトフィラメント数分布に示される螺旋構造と反時計回りの回転運動に相関があることを明らかにした。

ビオチン・ストレプトアビジンの相互作用によって、滑り運動中の微小管を架橋することで集積化し、形成された集合体の長さや運動能にあたる初期条件の影響について広く知見を得た。様々な形態に微小管集合体が形成される中で、リング状集合体について回転運動の方向を解析した結果、一本の微小管の滑り運動系で観察された反時計回り回転運動に優位が見られた。これにより、一本の微小管の示す非対称な回転運動の性質が集合体の性質に反映される事が示された。

微小管の直線的な形態や運動を集合体の性質に反映させる試みでは、剛直な微小管を用いる事で直線状の微小管集合体を選択的に形成することに成功した。また、剛直な微小管集合体は、運動の直進性が高いことも明らかになった。すなわち、直線運動においても、一本の微小管が示す運動の性質を集合体の性質に反映できる事が示された。

これを要するに、著者は、微小管の能動的な自己組織化系について、微小化の構造・性質と形成される集積体の性質との相関について新知見を得たものであり、モータータンパク質系を用いたマイクロマシン開発の基礎となる、集積体形成という課題に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。