微小管脱重合キネシンMCAKは力を発生する

小口祐伴 理化学研究所・CLST-DGT / 早稲田大学先進理工学部物理学科

1. はじめに

細胞分裂期において、複製された染色体は驚くべき正確さで娘細胞に分配される¹⁾。この現象は、個体が正しく発生・形成し、生命が世代を超えて継承するために不可欠であり、発見から半世紀以上にわたって、多くの研究者の関心を惹き続けてきた。

染色体分配（運搬）の原動力は、微小管（紡錘糸）にあるとされている。中心体から伸びた微小管は動原体と結合し、そこでは微小管の自発的な脱重合（短縮）が起こり染色体を牽引する^{2),3)}。つまり、微小管の先端部は動原体との結合を維持すると同時に、まさにその部分を短縮していることになる。この一見矛盾するような2つの現象はどのように実現しているのだろうか。

一方、本稿で紹介する MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) はキネシン 13 ファミリーに属し、ATP の加水分解を伴い微小管の脱重合（プラス端、マイナス端とも）を促進するという、他のキネシンとは異なる性質を有する⁴⁾。細胞内での機能は、特に細胞分裂期において動原体に局在し、染色体の牽引に関与するとされているが、どのようにこれに寄与するのか。微小管の重合・脱重合ダイナミクスを調節するだけなのか、それとも MCAK 分子自体が染色体を牽引し得る張力を発生するのか。本稿では、光ピンセット力学計測系を用いて行った、MCAK の微小管脱重合活性と力発生に関する研究を紹介する。

2. MCAK・微小管相互作用の力学操作

微小管脱重合活性を持つ MCAK は牽引力を発生するだろうか。この問いに答えるために、直径 $1\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズの表面に MCAK 分子を結合し (MCAK ビーズと呼ぶ)、これを光ピンセットで捕捉・操作することで、微小管と作用させるを試みた⁵⁾。まず、捕捉した MCAK ビーズを操作して、フローセル内に浮遊している 1 本の微小管に近づけたところ、驚くべきことに、MCAK ビーズに吸い寄せられるように微小管（の側面）と結合した。次に、2つの捕捉

中心を持つ光ピンセット系によって、2つの MCAK ビーズを同時に操作し、1本の微小管の両端を狙い、それぞれに1つの MCAK ビーズを結合した (図 1a 上)。この状態から一方のビーズを解放すると、このビーズは微小管を短くしつつ、もう一方のビーズに向かい進んだ (図 1a 下)。この実験で用いた微小管は GMPCPP (加水分解されない GTP 類似体) によって重合し、自発的な脱重合を防いでいる。かつ溶液には $1\ \text{mM}$ ATP が存在しているので、微小管の短縮は MCAK の ATP 依存的な脱重合活性によって生じていると言える。このように、MCAK の脱重合活性により、微小管を短くしつつ物体（ビーズ）の運搬が可能であることを示すことができた。さらに、ビーズに結合する MCAK の分子数を変えたところ、分子数依存的にビーズの移動速度が変化した (図 1b)。

3. MCAK の脱重合活性による力発生の検出

次に、微小管の両端に結合した2つの MCAK ビーズを光ピンセットで捕捉したまま観察し続けた (図 2a)。観察開始直後は、微小管は弛んでいるような挙動を示したが、徐々にピンと張るようになり、最終的には一方のビーズと微小管との結合が解離した。その間、2つのビーズの重心位置を解析すると、両ビーズとも光ピンセットの捕捉中心から離れ、ビーズ間距離が縮まる方向に変位していた。すなわちこれは、微小管の短縮

図 1 MCAK ビーズによる微小管の脱重合（短縮）を観測する実験系。(a) 計測系の概略図。(b) MCAK ビーズの移動速度とビーズに結合した MCAK 分子数の関係。Hill の式で近似することにより得られた最大速度は $12.0 \pm 0.7\ \text{nm/s}$ ($K_m = 5,930$, $n_H = 1.5$)。

The Depolymerizing Kinesin MCAK Generates Force by Disassembling both Microtubule Ends

Yusuke OGUCHI^{1,2}

¹Division of Genomic Technologies, Center for Life Science Technologies (CLST), RIKEN

²Department of Physics, Faculty of Science and Engineering, Waseda University

に伴い力が発生したことを示す。そこで、ビーズと微小管の結合が解離する瞬間に加わっていた張力を発生力と定義し、分子数との関係を調べた。その結果、移動速度と同様、結合する MCAK 分子数の増加に伴い発生力も増加した (図 2b)。

この MCAK による力発生は、従来より提唱されている微小管の自発的脱重合によるものとはどう違うのだろうか。自発的脱重合による力発生は、微小管を構成するプロトフィラメントの屈曲 (GTP の加水分解による) に起因する。それに対し、本実験系で用いた微小管は GMPCPP 存在下で重合し、E-site に結合している GTP を GMPCPP に置換することで、プロトフィラメントの屈曲を防いでいる。しかし GTP と GMPCPP の置換が不十分であった可能性も考えられる。そこで、実際に力発生の検出に用いた微小管の GMPCPP の含有量 (GTP との置換度) を HPLC により定量したところ、約 75% であった。この含有量であればプロトフィラメントの屈曲は生じない⁶⁾。すなわち、ここで検出された力発生は、従来の説とは異なる MCAK の ATP 依存的な微小管脱重合活性によるものと結論できる。

4. 微小管部位特異的な MCAK との相互作用

1 分子の MCAK は ATP 存在下で微小管の側面を拡散運動し、微小管の端に辿り着く⁷⁾。この MCAK と微小管の相互作用を詳細に調べるために図 3 の実験系を用いた (1 mM ATP 存在下)。直径 2 μm のポリス

図 2 MCAK の微小管脱重合活性により生じる力を測定する実験系。(a) 計測系の概略図。(b) 発生力とビーズに結合する MCAK 分子数の関係。Hill の式で近似することにより得られた最大発生力は 2.6 ± 0.2 pN ($K_m = 4,930$, $n_H = 1.0$)。

図 3 微小管部位特異的な相互作用を検討する実験系。(a) 計測系の概略図。(b) 微小管に結合した MCAK ビーズに外力を加えたときのデータ例。側面とは弱く、端とは強く結合する。

チレンビーズ (ガラス表面に固定) の上に、1 本の微小管を固定する。その微小管の側面に光ピンセットによって MCAK ビーズを近づけると容易に結合する。さらにビーズに外力を加えると (ステージを動かすことで)、微小管との結合を保ったまま滑るように動いた。このとき外力に拮抗し摩擦力 (~ 0.5 pN 程度) が生じていた (図 3b)。さらに MCAK ビーズが微小管の端に到達すると、そこでは非常に強く結合した。外力を加え続けると (負荷を大きくしていくと)、最終的に結合が破断した (図 3b)。このように MCAK と微小管との相互作用力が、微小管の部位依存的に異なることを明らかにした。

5. おわりに

本研究は MCAK の様々な力学的性質を明らかにしたが、これが実際に染色体分配に参与しているか? という根本的な疑問に答えるものではない。しかし少なくとも、MCAK の脱重合活性に伴って発生する力の大きさは、染色体を分裂し牽引するのに十分なものである。

謝 辞

本稿で紹介した研究は早稲田大学石渡信一研究室で、石渡信一教授、内村誠一博士 (理研)、大木高志博士 (早大)、ミハイレンコ セルゲイ博士 (早大) と共同で行ったものです。共同研究者の皆様にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Mitchison, T. J., Salmon, E. D. (2001) Nat. Cell Biol. **3**, E17-E21. DOI: 10.1038/35050656.
- 2) Inoue, S., Salmon, E. D. (1995) Mol. Biol. Cell **6**, 1619-1640. DOI: 10.1091/mbc.6.12.1619.
- 3) Grishchuk, E. L. *et al.* (2005) Nature **438**, 384-388. DOI: 10.1038/nature04132.
- 4) Desai, A. *et al.* (1999) Cell **96**, 69-78. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80960-5.
- 5) Oguchi, Y. *et al.* (2011) Nat. Cell Biol. **13**, 846-852. DOI: 10.1038/ncb2256.
- 6) Müller, T. *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 3661-3666. DOI: 10.1073/pnas.95.7.3661.
- 7) Helenius, J. *et al.* (2006) Nature **441**, 115-119. DOI: 10.1038/nature04736.

小口祐伴

小口祐伴 (おぐち ゆうすけ)
理化学研究所基礎科学特別研究員
早稲田大学大学院博士課程修了, 日本学術振興会特別研究員, 理化学研究所特別研究員を経て, 現職。
研究内容: 1 細胞シーケンス技術の開発
連絡先: 〒 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
E-mail: oguchi@gsc.riken.jp
URL: <http://www.riken.jp/research/labs/clst/>