

キネシンによる微小管の構造変化と細胞極性への影響

島 知弘

1. はじめに

微小管は真核細胞の構造を支える細胞骨格として、細胞の組織化に主要な役割を果たしている。しかし、決して静的な構造物ではなく、動的に重合・脱重合を繰り返すことでその長さをダイナミックに伸縮させており、この微小管の重合・脱重合ダイナミクスが適切に調節されることは、細胞分裂・細胞運動・細胞の形態形成・細胞内輸送など多くの生命現象にとって非常に重要である。一例をあげると、微小管脱重合を阻害するパクリタキセルは、細胞分裂を阻害し抗がん剤として機能するだけでなく、特に神経細胞の分化過程に顕著であるが細胞内輸送や細胞形態形成にも異常をもたらし¹⁾、これらの生命現象における微小管ダイナミクスの重要性をよく示している。しかし各生命現象の起こるタイミング・場所において、適切に微小管ダイナミクスが調節される分子機構についてはいまだ多くの謎が残っている。これまで微小管ダイナミクスの調節機構として、各種の翻訳後修飾や構成タンパク質のアイソフォームの偏りなどが研究されてきたが、近年、微小管のとり複数の構造多型が注目を集めている。本稿では、キネシンという微小管上を運動するモータータンパク質が微小管の構造を変えるという我々の最近の知見²⁾を中心に、この構造変化が細胞極性の調節を通じて各種の生命現象にいかに関与するか議論する。

2. 微小管の構造多型とキネシン結合による遷移

1) 微小管の構造多型

微小管は、構成要素である α/β チューブリン二量体が12~15本のプロトフィラメントに沿って重合することで形成される直径約25 nmの中空の管状のポリマーである (図

1A)。微小管ダイナミクスのモデルとして、GTPと結合したチューブリンが微小管先端に重合して、その後GTPがGDPへと加水分解され、微小管先端部のチューブリンがGDP結合型になると脱重合しやすくなるというGTP-capモデルが広く受け入れられている³⁾。近年の構造生物学の進展により、チューブリンがGTPとGDPのどちらと結合しているのかによって微小管の構造が微妙に異なることが明らかになってきた^{4,5)}。微小管内でチューブリン分子は、各プロトフィラメント長軸方向に沿って約4nm周期で並んでいる。加水分解が非常に遅いGTPアナログであるGMPCPPと結合したチューブリンや加水分解阻害チューブリン変異体が重合してできた微小管は、GDP結合型の微小管に比べ約2%周期が長い構造をとる⁶⁻⁸⁾ (図1B)。この周期長が長い微小管は脱重合が抑制されていることから、この微妙な微小管の構造の違いが微小管の安定性の制御スイッチとして働くと考えられる。実際に、脱重合を抑制するパクリタキセルが高濃度で存在すると、GTP型よりもさらに長い周期長をとる構造へと微小管は変化する⁷⁾。

2) キネシンによる微小管周期構造の伸張

我々は後述する生化学的な知見から、細胞内の重要なモータータンパク質であるキネシンスーパーファミリーのうち代表格といえるKinesin-1が、微小管をレールとして物資の輸送を行うだけでなく、その結合によって微小管の構造を変化させているという確信に至り、その構造変化をさまざまな手法で検証した。一例をあげると、微小管溶液を流動させながらX線繊維回折計測を行うことで、チューブリン周期長を非常に精度よく求めることができる⁷⁾。我々は本手法を用いて、GDP型微小管に対して総チューブリン量の10%程度のKinesin-1分子が結合すると、結合領域のみならず微小管全体が、チューブリン周期長の長いGTP結合型に近い構造に変化することを明らかにした²⁾。このKinesin-1による微小管構造変化の反応は、ヒル係数が6と非常に高い正の協同性を示す。これは、ごく少数のKinesin-1分子では結合したチューブリンの構造変化を引き起こすことはできないが、閾値以上のKinesin-1分子が結合すると微小管全体の構造が一気に変化するものと考えられる。

チューブリン周期長自体の変化はオングストロームレベルでしかないが、微小管内の多数のチューブリンが一

東京大学大学院理学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1 理学部1号館)

Kinesin-triggered microtubule conformational changes as a key for cell polarity

Tomohiro Shima (Graduate School of Science, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Faculty of Science Building 1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930867

© 2021 公益社団法人日本生化学会

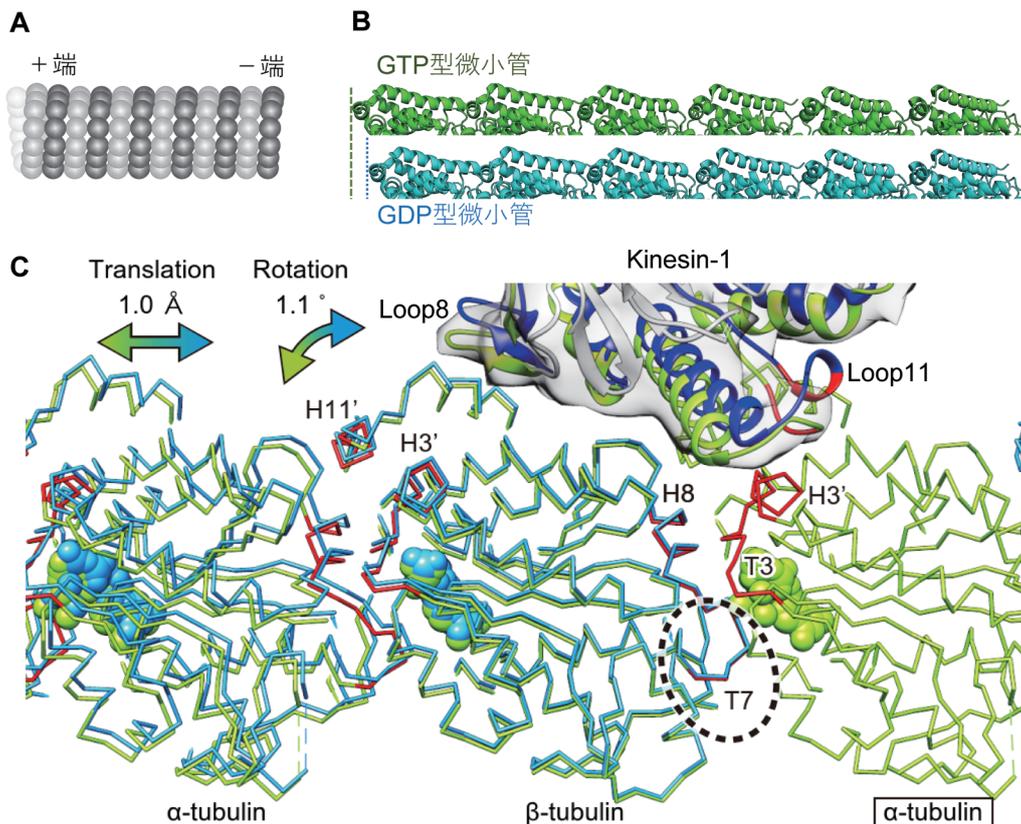


図1 微小管の構造多型

(A) 微小管の模式図。αチューブリン（濃灰色）とβチューブリン（淡灰色）が規則的に重合している。(B) 微小管表面の構造。GTP型微小管(緑)は、GDP型微小管(青)よりも約2%長いチューブリン周期構造をとっている。(C) キネシンによる構造変化。アポ状態のKinesin-1(緑)が結合すると、GDP型微小管の構造が青色で示した状態から緑色の状態へと変化する。図中右端のαチューブリンで重ね合わせると、その左側のβチューブリンが反時計回りに1.1°回転し、左端のαチューブリンを+端方向へ1.0Å移動させる。AMPPNP状態のKinesin-1(青)ではLoop8, Loop11ともに微小管から離れる方向に移動する。文献2)より改変。

齊に変化することで微小管全体の長さの変化としては大きなものとなる。たとえば長さ10μmのGDP型微小管にKinesin-1が十分量結合すると、その長さは約150nm伸びることになり、蛍光顕微鏡で変化を検出することも可能である。Kinesin-1によっていったん周期長の伸びた構造をとった微小管からKinesin-1を解離させると、微小管はサブ秒から数分以内に元の長さに戻り、この構造変化が可逆的であることも示された^{2,9)}。

3) キネシンによる微小管構造変化

この周期長の変化に際して微小管の構造はどのように変化しているのだろうか。クライオ電子顕微鏡による解析から、Kinesin-1がGDP型微小管に結合すると、結合箇所の直下を中心として、αチューブリンとβチューブリンが相対的に微小管長軸方向に1.1度回転し、隣のチューブリン二量体の位置を1.0Åずらしていることがわかった(図1C)。Kinesin-1が結合した微小管の構造を詳細に解析すると、Kinesin-1のLoop8とβチューブリンのα5ドメイン、お

よびKinesin-1のLoop11-α4接合部とαチューブリンのH3'ドメインという主に2か所の接触面がこの構造変化に重要な役割を果たしていると考えられる。各状態の微小管構造の比較から、Kinesin-1によって変化したGDP型微小管は、周期長だけでなく実際の立体構造のうえでもGTP型微小管に近いものであることが明らかとなった²⁾。

4) キネシンのヌクレオチド依存的な構造変化と微小管構造

キネシンはATPを利用して運動するモータータンパク質であり、ATP加水分解サイクルの進行に伴ってその構造や微小管との親和性を大きく変える。先にあげた微小管の構造変化に重要な二つのドメインについても、Kinesin-1にヌクレオチドが結合していないアポ状態では微小管に非常に近接しているが、ATPのアナログであるAMPPNPが結合した状態では両者とも接触面から離れる方向へ移動し、GDP型微小管の構造変化を引き起こさない(図1C)。実際に、いったんKinesin-1によって周期長が伸びたGDP

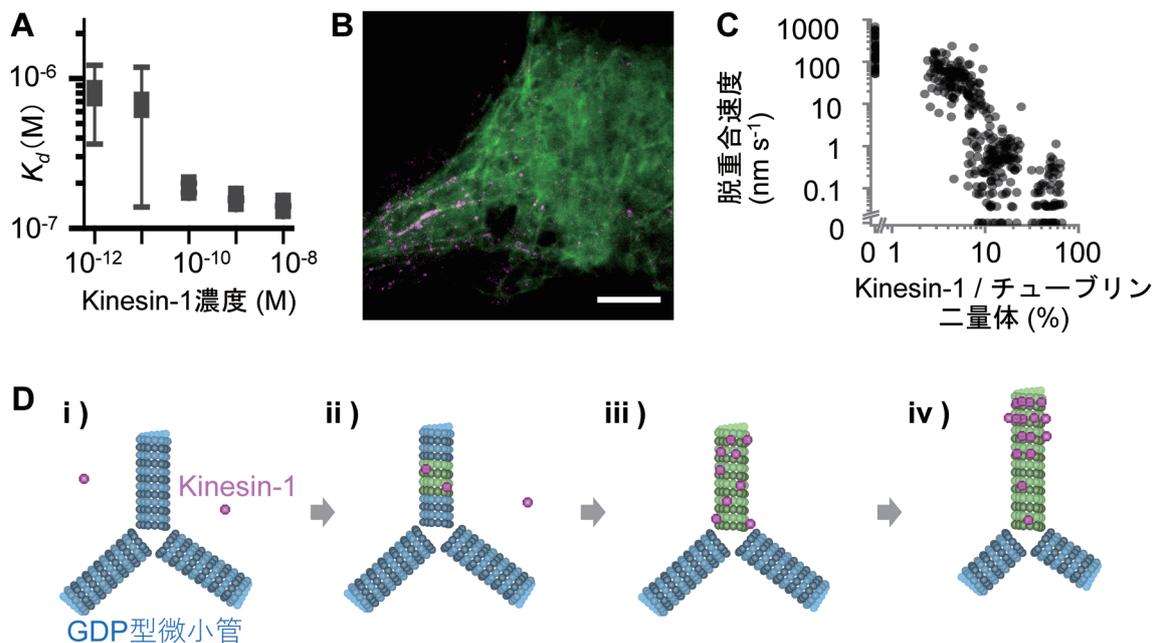


図2 キネシンの結合が微小管の生化学的な性質に及ぼす影響

(A) GDP型微小管に対するKinesin-1の解離定数. Kinesin-1濃度上昇に応じて, 急激に解離定数が低下し, 結合親和性が上昇したことを示す. 文献2) より改変. (B) HeLa細胞で発現させたKinesin-1の分布. 細胞内に存在する多くの微小管(緑)のうち, ごく一部のものにKinesin-1 (マゼンタ)は集積する. バーは10 μ m. (C) GDP型微小管の脱重合速度. Kinesin-1が十分量存在すると, 脱重合が強く抑制される. 文献2) より改変. (D) Kinesin-1による細胞極性制御モデル. 確率的な結合により複数のKinesin-1分子が特定の微小管に結合する(i)と, 当該領域の構造が変化し(ii), ポジティブフィードバックによりさらに多くのKinesin-1と結合する(iii). これによってキネシンの分布に偏りができると同時に, 当該微小管が安定化され重合反応が進む(iv)ため, 微小管の長さにも差が生まれて細胞構造の対称性が破れる. 細胞内の一部の微小管が安定化して伸長することは, 特に細胞運動や細胞突起の伸長に重要と考えられる.

型微小管も, 溶液中にAMPPNPを添加すると30秒以内に元の周期長が短い構造に戻ることがX線繊維回折の結果からわかった. 興味深いことにKinesin-1のLoop11- α 4接合部に変異を導入すると, GDP型微小管の周期長を長くする構造変化を引き起こすことができるものの, AMPPNP存在下でも微小管は周期長の長いGTP型に近い構造を維持する²⁾. したがってKinesin-1の各ドメインは, チューブリン周期長の伸長・短縮反応のそれぞれで異なる役割を果たしているものと考えられる.

3. 微小管構造変化がもたらす影響

ここまで述べてきた微小管の構造変化は, 微小管の生化学的な性質も大きく変化させる. 顕著な変化として, Kinesin-1との親和性の向上および微小管脱重合の抑制の2点があげられる. この二つの変化が細胞極性に及ぼす影響を考察する.

1) アロステリックな結合親和性の上昇

Kinesin-1は低濃度条件下において, GDP型微小管と

比較してGTP型微小管の方に約3倍高い結合親和性を示す^{2, 10)}. しかし, Kinesin-1濃度が高くなるとGDP型微小管への結合親和性が, GTP型微小管と同等にまで上昇する(図2A). この反応は, 微小管周期長の伸長同様に高い正の協同性を示し, アロステリック効果が明らかになった. 先述したLoop11- α 4接合部に変異を入れたKinesin-1変異体は, 周期長の伸びたGTP型微小管に対して高い親和性を示さないことから, この領域が微小管の構造状態を識別する役割を果たしているものと考えられる. また, GDP型微小管の構造変化を引き起こさないAMPPNP結合状態のKinesin-1では, 結合に対する協同性を示さず¹¹⁾, Kinesin-1との親和性と微小管の構造変化が緊密に関連することを示唆している.

Kinesin-1による細胞内輸送において, 輸送物資がそれぞれの目的地に適切に輸送される必要があり, その分子基盤としてこの微小管の構造変化に伴う親和性の変化が利用されている可能性が高い. 適切な輸送のためには, キネシンが目的地につながる微小管にのみ結合する必要がある. 実際, 細胞内に存在する多数の微小管のうちごく一部の微小管にKinesin-1が集積するようすがさまざまな細胞

において観察されている (図2B)。たとえば神経細胞において、アミロイド前駆体タンパク質などはKinesin-1により軸索に輸送されるが、樹状突起には輸送されない¹⁾。この偏った輸送の分子基盤として、軸索の根本領域に存在する微小管が、他の微小管よりもキネシンとの親和性が高いことが知られている¹²⁾。当初、チューブリンの翻訳後修飾が根本的なメカニズムとして提案されていたが、*in vitro*の実験でこれらの翻訳後修飾がKinesin-1の親和性や結合頻度にはほぼ影響しないことが示された¹³⁾。細胞内ではキネシンとの結合親和性の低いGDP型の構造をとる微小管が大多数を占めると考えられている。我々の結果から、いったん複数のKinesin-1分子が一部の微小管に結合し、これらの微小管領域全体が高親和性の状態になると、残りのKinesin-1分子もこれらの微小管に結合しやすくなり、相対的に他の多数の微小管にはKinesin-1が結合しにくい状態になると予想される。細胞内のKinesin-1分子はいったん結合すると微小管上を100ステップ以上進むことが知られており、1分子のKinesin-1が非常に多くのチューブリンに影響するため、少数のKinesin-1分子の滑走がこのキネシンの結合と親和性のポジティブフィードバックを引き起こすのに十分であると考えられる。実際に*in vitro*再構成系でも細胞内と同程度の少数のキネシンの滑走によって、その後キネシンが一部の微小管へ集積するようすを再現できた²⁾。このメカニズムは、多様な細胞種におけるキネシンの非対称な分布をうまく説明でき、適切な目的地への輸送に寄与しているものと考えられる。

2) 微小管の脱重合抑制

GDP型微小管はGTP型微小管と比較して脱重合しやすい不安定な構造であり、遊離のチューブリン非存在下では脱重合によって微小管の長さは急速に短くなる。Kinesin-1による構造変化が起こると、脱重合速度は元の1/1000以下となり、非常に強く脱重合を抑制する (図2C)。GDP微小管の構造変化を誘起しないAMPPNP存在下のKinesin-1では、脱重合速度は元の1/10程度までしか抑制されないことから、アポ状態もしくはADP状態のKinesin-1による微小管構造の変化が非常に強い脱重合抑制をもたらしていると考えられる²⁾。

微小管は真核細胞にとって構造の支持基盤たる主な細胞骨格であり、細胞の形態形成・維持において微小管ダイナミクスの適切な調節は欠かせない。たとえば細胞運動時には、微小管が細胞の前部では伸長、後部においては短縮することが知られている。この際、キネシンは細胞内前方の微小管に集積することから、これらの微小管を安定化し、重合・伸長反応を促進しているものと考えられる (図2D)。また、神経細胞における軸索決定時には1本の神経突起が非常に長く伸長し、この神経突起内部の微小管も脱

重合が抑制されているものと考えられる。前述したとおり、伸長中の神経突起内の微小管にはKinesin-1が集積するため、Kinesin-1による微小管脱重合抑制が神経突起の伸長にも寄与しているであろう。

同様の協同的な構造変化は、アクチンフィラメントでも報告されている¹⁴⁾。ミオシン-2はピッチを伸ばすことで、コフィリンはピッチを短くすることでそれぞれアクチンフィラメントに対して協同的に結合する。このアクチンの協同的な構造変化によるアロステリックな制御が、運動する細胞の前後方向の極性 (コフィリンが前縁、ミオシン-2が後縁) の確立に寄与していると提唱されている。このように、細胞骨格ポリマーの協同的な構造変化は、細胞が極性を確立・維持するための一般的な戦略であると考えられる。

4. おわりに

微小管はこれまでキネシンに限らずさまざまな結合タンパク質の静的な「足場」とみなされてきた。しかし多くの細胞生物学的研究で、各種の結合タンパク質が細胞内での一部の微小管、または1本の微小管の一部の領域しか使われないことが示されてきており、微小管自体にさまざまな状態が存在することが明らかになってきている。今回紹介した我々の結果や他の微小管結合タンパク質による報告は、微小管の構造が結合タンパク質のアロステリックな結合によりダイナミックに変化すること、そしてその構造が結合タンパク質にとっての動的な「道標」となり、さらに微小管ダイナミクスの調節にも寄与することを示している。

Kinesin-1については、他のメカニズムによっても微小管構造に影響を及ぼすことが報告されている¹⁵⁾。微小管上を運動中のKinesin-1は、微小管内のチューブリンを引き抜き、一部が欠けた微小管を生み出す場合がある。欠けた領域には新たなGTP結合チューブリンがはまることで、全体はGDP型だが一部だけがGTP型という微小管ができる。この一部のGTP型領域はKinesin-1への親和性が高いため、このような微小管構造状態の形成は初期のKinesin-1の分布の偏りを生むのに寄与しているかもしれない。今後は、このような微小管の構造多型を生み出すさまざまな要因間での連携や、異なる微小管結合タンパク質間での相互作用も含めて、包括的な微小管構造研究の進展によって、細胞の構造・極性を制御する仕組みが全面的に解明されることが期待される。

文 献

- 1) Nakata, T. & Hirokawa, N. (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J. Cell Biol.*, **162**, 1045–1055.

- 2) Shima, T., Morikawa, M., Kaneshiro, J., Kambara, T., Kamimura, S., Yagi, T., Iwamoto, H., Uemura, S., Shigematsu, H., Shirouzu, M., et al. (2018) Kinesin-binding-triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport. *J. Cell Biol.*, **217**, 4164–4183.
- 3) Desai, A. & Mitchison, T.J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 83–117.
- 4) Yajima, H., Ogura, T., Nitta, R., Okada, Y., Sato, C., & Hirokawa, N. (2012) Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy. *J. Cell Biol.*, **198**, 315–322.
- 5) Morikawa, M., Yajima, H., Nitta, R., Inoue, S., Ogura, T., Sato, C., & Hirokawa, N. (2015) X-ray and Cryo-EM structures reveal mutual conformational changes of Kinesin and GTP-state microtubules upon binding. *EMBO J.*, **34**, 1270–1286.
- 6) Alushin, G.M., Lander, G.C., Kellogg, E.H., Zhang, R., Baker, D., & Nogales, E. (2014) High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell*, **157**, 1117–1129.
- 7) Kamimura, S., Fujita, Y., Wada, Y., Yagi, T., & Iwamoto, H. (2016) X-ray fiber diffraction analysis shows dynamic changes in axial tubulin repeats in native microtubules depending on paclitaxel content, temperature and GTP-hydrolysis. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **73**, 131–144.
- 8) LaFrance, B.J., Roostalu, J., Henkin, G., Greber, B.J., Zhang, R., Normanno, D., McCollum, C., Surrey, T., & Nogales, E. (2021) Structural transitions in the GTP cap visualized by cryo-EM of catalytically inactive microtubules. *bioRxiv*, 2021.08.13.456308, 1–23.
- 9) Peet, D.R., Burroughs, N.J., & Cross, R.A. (2018) Kinesin expands and stabilizes the GDP-microtubule lattice. *Nat. Nanotechnol.*, **13**, 386–391.
- 10) Morikawa, M., Yajima, H., Nitta, R., Inoue, S., Ogura, T., Sato, C., & Hirokawa, N. (2015) X-ray and Cryo-EM structures reveal mutual conformational changes of Kinesin and GTP-state microtubules upon binding. *EMBO J.*, **34**, 1270–1286.
- 11) Muto, E., Sakai, H., & Kaseda, K. (2005) Long-range cooperative binding of kinesin to a microtubule in the presence of ATP. *J. Cell Biol.*, **168**, 691–696.
- 12) Nakata, T., Niwa, S., Okada, Y., Perez, F., & Hirokawa, N. (2011) Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J. Cell Biol.*, **194**, 245–255.
- 13) Kaul, N., Soppina, V., & Verhey, K.J. (2014) Effects of α -tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys. J.*, **106**, 2636–2643.
- 14) Ngo, K.X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T., & Uyeda, T.Q. (2015) Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *eLife*, **4**, e04806.
- 15) Triclin, S., Inoue, D., Gaillard, J., Htet, Z.M., DeSantis, M.E., Portran, D., Derivery, E., Aumeier, C., Schaedel, L., John, K., et al. (2021) Self-repair protects microtubules from destruction by molecular motors. *Nat. Mater.*, **20**, 883–891.

著者寸描

●鳥 知弘 (しま ともひろ)



東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻助教。博士 (学術)。

■略歴 1981年東京に生る。2004年東京大学教養学部卒業。09年同大学院総合文化研究科修了，学術博士取得。日本学術振興会特別研究員，理化学研究所基礎科学特別研究員を経て，14年11月より現職。

■研究テーマと抱負 細胞内で動きをうみだす仕組みについて，特に微小管とその関連モータータンパク質の分子機構研究を進めている。近年は膜タンパク質など他の細胞内運動についても，動作機構の解明を目指し研究に取り組んでいる。

■ウェブサイト <http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/uemura-lab/>

■趣味 野球，音楽鑑賞。