

# キネシン生体分子モーター無細胞合成に成功

～細胞やバクテリアを使わずに手軽に生体分子モーターを合成することが可能に～

## ポイント

- ① 生体由来の微小なモーターであるキネシンを誰でも簡単に合成可能に
- ② 合成キネシンの方が、従来の遺伝子組み換え大腸菌由来のものより高性能であることを発見
- ③ キネシンの構造・機能も容易に改変可能

## 概要

京都大学大学院理学研究科の角五彰教授、九州大学大学院芸術工学研究院の井上大介助教と北海道大学大学院国際食資源学院博士後期課程2年(当時)の大橋慧介氏、同大学大学院農学研究院の高須賀太一准教授らの研究グループは、生体由来の微小なモーターであるキネシンを試験管内で合成することに成功しました。

キネシン生体分子モーター(※1)は、アデノシン三リン酸(ATP)の化学エネルギーを高効率に運動に変えることができ、数十ナノメートル(髪の毛の3000分の1くらい)という小さなサイズにも関わらず、高い出力(一般的な電磁モーターの20倍程度)を発揮する優れたタンパク質です。キネシンは細胞内に張り巡らされた繊維である微小管細胞骨格(※2)に沿って移動しながら、様々な物質を輸送します。キネシンは細胞内の物流を担うタンパク質であるため、細胞が機能する仕組みを理解する上で重要です。また、ナノテクノロジーの分野でもナノメートルサイズの微小な動力パーツとして古くから注目されています。

これまで、キネシンは遺伝子組み換え大腸菌を用いて作る方法が主流でしたが、バイオセーフティの認証や専用設備・装置、熟練されたタンパク質精製スキルが必要であり、同じ品質・量で安定して得ることが困難でした。そのため、生物学専門の研究機関以外で、キネシンを獲得することが難しく、キネシンを幅広い研究分野で利用することに制限がありました。

今回、我々はコムギの胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質発現系(※3)により、大腸菌のような遺伝子組み換え生物を用いずに、キネシンを試験管内で合成することに成功しました。合成したキネシンが駆動することも確認できただけでなく、従来の遺伝子組み換え大腸菌を用いて作ったものよりも高性能であることを明らかにしました。また我々は、キネシンの遺伝子テンプレートをPCR(※4)により編集し、合成キネシンの構造と機能を簡単に改変することにも成功しました。

キネシンの合成は、必要最低限の機器を用いるだけで誰でも行うことが可能であり、九州大学芸術工学部の授業では、マイクロピペットを握ったことがない学部3年生でも、動くキネシンの合成に成功しています。このことはDIYバイオ(※5)の観点からも重要です。本研究により、キネシン生体分子モーターをより幅広い分野の研究者が利用することが可能になり、今後応用のチャンスが増えると期待されます。

本研究成果は、2023年6月16日(現地時間)にアメリカ化学会発行 ACS Synthetic Biology 誌に掲載されました。

## 【研究の背景】

キネシン生体分子モーターは、微小管細胞骨格という細胞内の微小な繊維と結合し、微小管に沿って動く全長数十ナノメートル程度のタンパク質です(※1,2,図1)。その速度はおよそ1マイクロメートル毎秒程度であり、この速度は非常に遅く感じるかもしれませんが、キネシンを我々人間と同じサイズにすると、新幹線よりも高速です。さらに、キネシンはATPの化学エネルギーを高効率に運動に変換できるだけでなく、その小さなサイズの割に一般的な電磁モーターよりも20倍程度高い出力を発揮できます。

細胞内では、キネシンは微小管に沿って様々な物質を運搬していますが、上記の優れた特性から、工学分野への応用、特にマイクロ・ナノテクノロジー分野での活躍が期待されています。例えば、微小管/キネシンをマイクロ流体デバイスなどの動力として応用した例や、微量物質の回収・濃縮デバイス、材料表面のセンシングなどが報告されています(引用文献1～3)。また、キネシンによって微小管を動かす、多様な構造体へと組織化し、リング型の回転モーターを構築する技術などがこれまでに確立されて

います(引用文献4,5)。

このようにキネシンは、生体由来のナノメートルスケールの動力部品として有用である可能性があります。これまでキネシンは、大腸菌などの遺伝子組み換え生物を用いて製造されてきました。遺伝子組み換え生物を利用するには、国の認可が必要であり、キネシンをこれらの生物から抽出し精製するには、専用の設備と、熟練された精製スキルが必要となります。そのため、キネシンは、専門の研究機関でなくては獲得が困難であり、キネシンを幅広い分野の研究者や技術者が利用することに制限がありました。

#### 【研究の内容と成果】

今回、我々は近年盛んに利用されている無細胞タンパク質合成系を用いて(※3,図2)、運動するキネシンを世界で初めて試験管内で合成することに成功しました。無細胞タンパク質合成系は、タンパク質の遺伝情報をコードする DNA と必要な試薬類を混合することで、簡単にタンパク質を試験管内で合成することができる方法です。遺伝子組み換え技術を規制するカルタヘナ法に抵触せずに、タンパク質を合成できるため、極論を言えば自宅でもキネシンを作ることが可能です。また、キネシンを試験管内で合成する場合、遺伝子組み換え大腸菌で作る場合と異なり、精製の手間がありません(但し、実験目的による)。

合成したキネシンの性能を評価するため、我々は、キネシンを固定したガラス基板上で微小管を運動させる滑り運動試験を行いました(図3a)。合成したキネシン上でも、微小管が動く様子が観察され(図3b)、その運動速度は、大腸菌で作ったキネシンと有意な差がありませんでした。しかし、大腸菌製のキネシンと比較すると、キネシン基板への微小管の吸着量は、合成キネシンの方が高く、動かない微小管の割合に着目すると、合成キネシンの方が少なくなることが明らかとなりました(図3c,d)。これは、原始的な大腸菌と、今回利用した真核生物由来の合成システムとの間で、タンパク質合成プロセスの正確さが異なることに起因すると考えられます。

また、無細胞タンパク質合成系を用いて、我々はキネシンの構造と機能を簡単に改変することにも成功しました。通常、タンパク質の構造を改変する場合、元となる遺伝情報を含む DNA の塩基配列を編集し、これをプラスミドと呼ばれる環状の DNA に挿入する作業が必要でした。しかし、この煩雑なプロセスをスキップするため、我々は DNA 増幅の手法である PCR(※4)を利用して、追加の遺伝情報をテンプレートとなるキネシン DNA に組み込みました。この手法で作成した直鎖状の DNA テンプレートはそのままキネシンの合成に利用することが可能です。

我々は、キネシンに特定の抗体と結合する構造を新たに組み込みました。蛍光タンパク質により可視化したキネシンを用いて、抗体を固定したガラス基板に対するキネシンの結合量を評価したところ、抗体存在下において、キネシンの基板結合量が増加したことから、無細胞タンパク質合成系を用いることで、キネシンに追加の構造を容易に導入できることが分かりました。

#### 【今後の展開】

本研究により、微小なモーターであるキネシンを試験管内で合成し、構造を改変することが誰でも簡単にできるようになりました。実際に、九州大学芸術工学部では、学部3年生を対象とした授業で、それまでマイクロピペットも持ったことがない学生でも、キネシンを合成し運動させることに成功しています。本研究は、バイオテクノロジーの民主化に向けた活動である DIY バイオ(※5)の観点からも重要な成果であり、必要最低限の機材と試薬を揃えれば、大学などの研究機関以外でもキネシンの研究ができるようになり、今後、キネシンの応用の幅が広がるかもしれません。

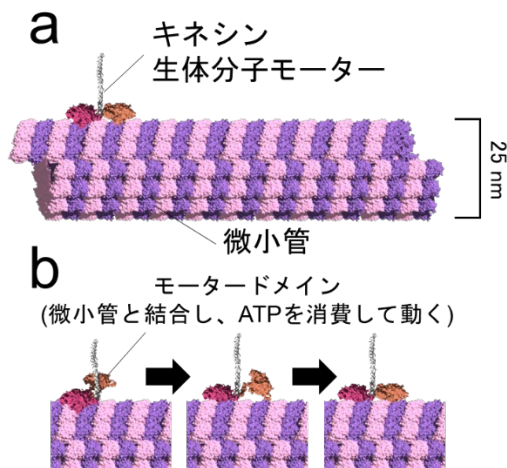


図 1.(a)キネシン生体分子モーターと微小管の模式図、(b)微小管上をキネシンが2足歩行する様子を示した模式図。

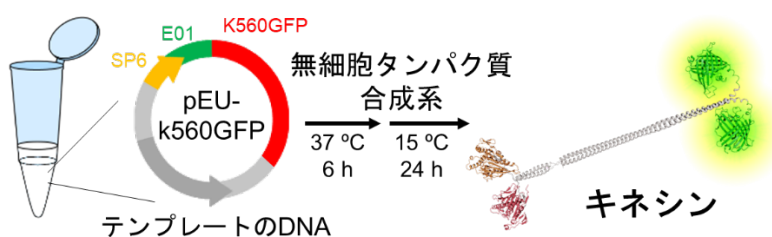


図 2.キネシンの試験管内合成の模式図

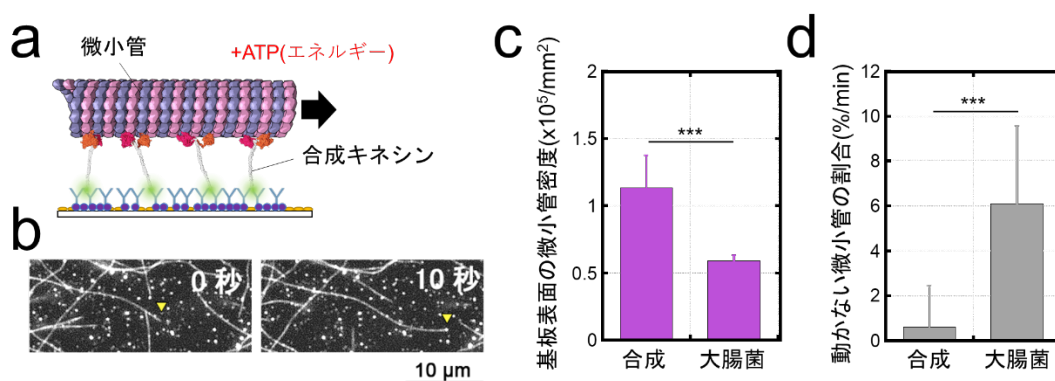


図 3.(a)キネシン固定基板上で微小管を動かす試験の模式図。(b)キネシンによって動く微小管の蛍光顕微鏡画像、黄色三角形は運動している微小管の先端を示す。(c,d) 合成キネシンと従来の遺伝子組み換え大腸菌から得たキネシンとの間で、(c)基板に結合する微小管密度、(d) 動かない微小管の割合を比較した結果(\*\* $p < 0.001$ , スチューデント t 検定)。それぞれ、合成キネシンと大腸菌から精製したキネシンは同じ濃度に調整している。

### 【用語の解説】

※ 1 生体分子モーター： 数十ナノメートル程度のタンパク質で、2つの微小管結合部位を有する。生体のエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸(ATP)を消費して、2つの微小管結合部位を交互に繰り返すことで、微小管上を2足歩行する。微小管結合部位と反対側の部位に、輸送物質を結合させ、微小管を道路として細胞内輸送を担う。

※ 2 微小管： 微小管は構成材料であるチューブリンというタンパク質が連なってできる直径 25 ナノメートル、長さ約数十マイクロメートルの中空上の生体繊維 (ナノは 10 億分の 1 メートル、マイクロは 100 万分の 1 メートル。髪の毛が 60~100 マイクロメートル、微小管は髪の毛の 3000 分

の 1 程度の太さ)。微小管は細胞内の物質輸送のレールとしてだけでなく、細胞の形態維持や染色体分離、繊毛運動など、細胞内で様々な役割を果たしている。

※3 無細胞タンパク質発現系: タンパク質は、大元となる DNA の遺伝情報が mRNA に転写され、mRNA の情報を基にタンパク質が作られる。この流れをセントラルドグマといい、セントラルドグマを試験管内で行うことができるのが無細胞タンパク質発現系である。本研究では、セルフリーサイエンス社のコムギ胚芽抽出液を用いたタンパク質合成キットを使用。試験管内にタンパク質の設計図となる DNA とともに、RNA やタンパク質合成に関わる必要な酵素群を入れ、最適な温度に置くことで、タンパク質の合成が可能である。

※4 PCR: 新型コロナウイルス流行後、頻繁に聞くようになったワードだが、DNA を増幅する方法である。二種類の短い DNA 断片(プライマー)で挟み撃ちした領域の DNA 配列を増幅できる。このプライマーの中に追加の遺伝子情報を導入することで、キネシンの構造に新たな構造を追加できる。

※5 DIY バイオ: DIY バイオ (Do-It-Yourself Biology) は、「自分で行うバイオテクノロジー」という意味であり、一般の人々が自宅やコミュニティの中でバイオテクノロジーの実験や研究を行うことを指すバイオテクノロジーの民主化を目指す試みである。

#### 【引用文献】

- (1) Lin, C. T.; Kao, M. T.; Kurabayashi, K.; Meyhofer, E. *Nano Lett.* **2008**, *8*(4), 1041–1046.
- (2) Bachand, G. D.; Hess, H.; Ratna, B.; Satir, P.; Vogel, V. *Lab Chip* **2009**, *9*, 1661–1666.
- (3) Inoue, D.; Nitta, T.; Kabir, A. M. R.; Sada, K.; Gong, J. P.; Konagaya, A.; Kakugo, A. *Nat Commun.* **2016**, *7*, 12557.
- (4) Keya, J.; Suzuki, R.; Kabir, A. M. R.; Inoue, D.; Asanuma, H.; Sada, K.; Hess, H.\*; Kuzuya, A.\*; Kakugo, A. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 453.
- (5) Akter, M.; Keya, J. J.; Kayano, K.; Kabir, A. M. R.; Inoue, D.; Hess, H.; Sada, K.; Kuzuya, A.; Asanuma, H.; Kakugo, A. *Science Robotics* **2022**, *7*, eabm0677.

#### 【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 (JP20K15141, JP23H04425, JP21H05886)、JSPS 卓越研究員事業 (RAHJ290002)、公益財団法人吉田学術教育振興会「令和 4 年度学術奨励金贈呈事業」の助成を受けたものです。また本研究は、九州大学芸術工学部バイオフィードラボの施設を利用して実施されました。

#### 【論文情報】

掲載誌: ACS Synthetic Biology

タイトル: *In Vitro* Synthesis and Design of Kinesin Biomolecular Motors by Cell-Free Protein Synthesis

著者名: Daisuke Inoue, Keisuke Ohashi, Taichi E. Takasuka, and Akira Kakugo

DOI: 10.1021/acssynbio.3c00235