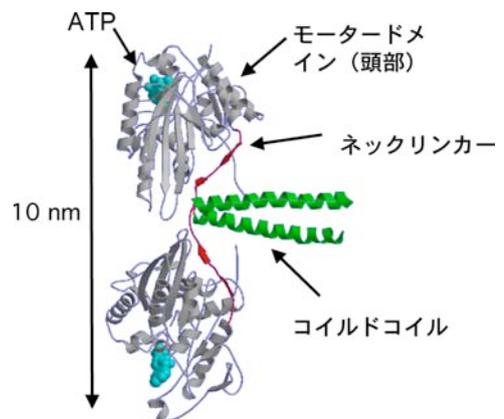


生体分子モーターキネシンの協調的二足歩行運動を可能にする構造基盤

(東京大学大学院工学系研究科) 富重 道雄

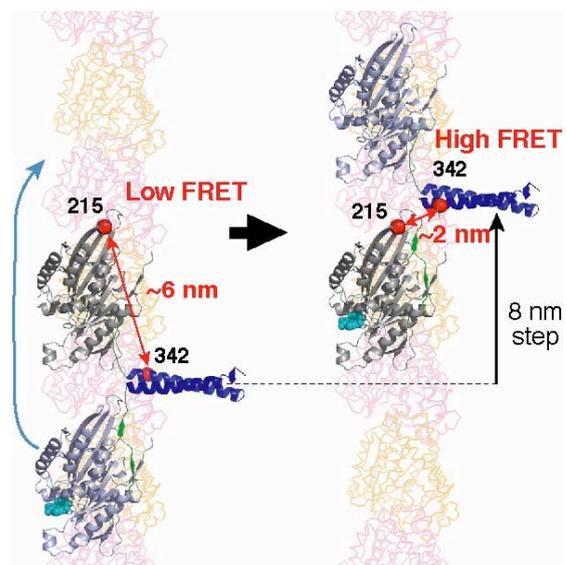
【はじめに】

キネシンは細胞内での微小管に沿った物質輸送に関わるモータータンパク質であり、ATP 加水分解によって得られる化学エネルギーを利用して微小管上を移動する。キネシンは一分子でも微小管から離れることなく 1 μm 以上の距離を連続的に運動するという特徴を持つ。このような連続的運動能を説明するためのモデルとして、二本足（頭部）を交互に動かしながら歩くようにして移動する、という二足歩行モデルが広く受け入れられている。このようなキネシンの連続的な歩行メカニズムを構造レベルから明らかにするために、我々は一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法を用いて運動中のキネシンの構造変化を直接観察するというアプローチで研究を行っている。



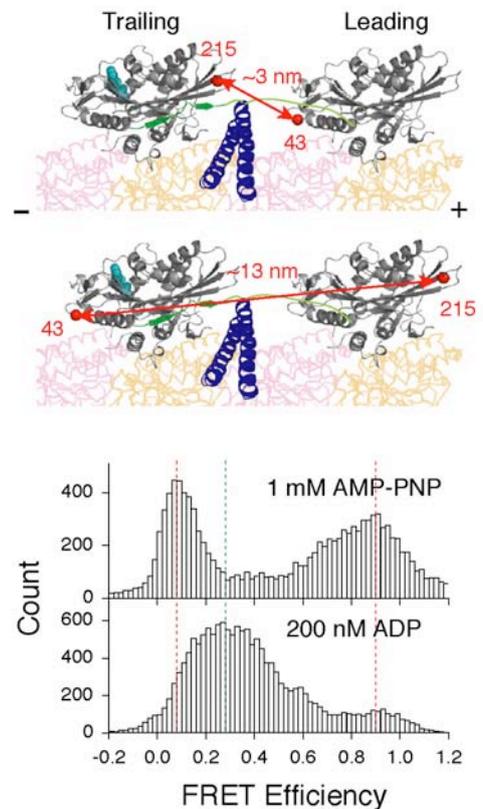
【結果と考察】

キネシンの構造変化を検出するために、蛍光共鳴エネルギー移動 (以下 FRET (fluorescence resonance energy transfer) と略す) 法を用いた。FRET 法とは、タンパク質をドナーとアクセプターの 2 種類の蛍光色素で標識し、色素間のエネルギー移動効率がその距離によって変化する現象を利用して、数ナノメートルの距離変化を測定する方法である。我々はまず、キネシンの 2 つの頭部をつなぐネックリンカー部位に着目した。この部位の構造変化によってキネシンの二足歩行が引き起こされるというモデルが提案されており、それを検証するために一分子 FRET 法を用いてネックリンカー部位の構造変化を検出した。二量体キネシンの片方の頭部のネックリンカーの前後にシステインを導入し、これらのシステイン残基をドナーとアクセプターの蛍光色素で標識した。まず、キネシンを微小管上に静止させた状態にして、FRET 効率を調べたところ、FRET 効率の分布は 30%、80% 付近に二つのピークを持つ分布となった。これらの状態は、それぞれネックリンカーが後ろを向いた状態と頭部に結合して前を向いた状態に対応すると考えられる (右図)。次にキネシンを低 ATP 存在下でゆっくりと微小管上を運動中のネックリンカーの構造変化を観察したところ、上記の 2 つの FRET 効率の状態を交互



に遷移する様子が観察された。また、同時にキネシンの変位を計測したところ、状態間遷移は平均して 8 nm 移動する毎に一回起きていることがわかった。これらの結果は、ネックリンカーの構造変化がキネシンのステップを引き起こす要因であることを示唆するものである。

次に、キネシンの二足歩行運動とエネルギー源である ATP 加水分解がどのように共役しているのかを明らかにするために、キネシンが 2 つの頭部を交互に動かしながら運動している様子を一分子 FRET 法を用いて観察した。キネシンの 2 つの頭部の間の距離を測定するために、片方の頭部のつま先ともう一方の頭部のかかちにシステインを導入し、これらをドナーとアクセプターの色素で標識した。まず、両足結合状態を取ることが知られている AMP-PNP (ATP のアナログ) 存在下でキネシンを微小管上に固定して観察したところ、10%と 90%付近に二つのピークを持つ FRET 効率の分布が得られた(右図)。一方、片足結合状態取ることが知られているヌクレオチドがほとんどない条件下では、それとは異なる 30%の FRET 効率を示した。これらより、この FRET プロブを用いることによって、両足結合と片足結合状態を明確に区別できることが裏付けられた。次にこのプロブを用いて、ATP 存在下で微小管上を運動中のキネシンの構造変化を一分子 FRET 法により観察した。飽和濃度の ATP 存在下では、90%と 10%の中間の FRET 効率を取っていたが、低 ATP 濃度条件下 (ATP 結合のステップが律速となる) では、FRET 効率は 30%の状態を長く取り、短い間 90%もしくは 10%の状態を取っていた。なお 90% FRET の状態への遷移は、平均して 16 nm 移動する毎に起きていた。これらの結果は、ATP の結合を待っている間キネシンは片足結合状態を取り、ATP の結合によって両足結合状態へ移行することにより、ステップをしていることを示唆するものである。



【参考文献】

- (1) M. Tomishige, N. Stuurman, and R. D. Vale. Single-molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13, 887-894 (2006).
- (2) T. Mori, R. D. Vale, and M. Tomishige. How kinesin waits between steps. *Nature* 450, 750-754 (2007).
- (3) A. Yildiz, M. Tomishige, A. Gennerich, and R. D. Vale. Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134, 1030-1041 (2008).