

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2010

課題番号：19570047

研究課題名（和文） イネのゲノム上にコードされる植物特異的キネシンの性質と構造解析

研究課題名（英文） Characterization and structural analysis of plant specific kinesin encoding on genome of rice

研究代表者

丸田晋策 (MARUTA SHINSAKU)

創価大学・工学部・教授

研究者番号：40231732

研究代表者の専門分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：植物分子、イネ、分子モーター、キネシン

1. 研究計画の概要

本研究計画では、イネゲノム上にコードされるキネシンの中から植物特有のものを見だし、その性質と構造そして生理的な役割を明らかにすることにより、イネの品種改良を目的とした高機能を付加したキネシンを開発することを試みる。具体的には次の(1)～(6)の研究計画を行う。

- (1) イネゲノム上に存在する植物特異的キネシンの検索
- (2) イネ特異的キネシンのクローニングと発現系の構築
- (3) 生化学的特徴づけ
- (4) 溶液中での局所的、全体的構造解析
- (5) モータードメインの結晶構造解析
- (6) イネ細胞での生理的役割の解明
- (7) キネシン変異体の調製

2. 研究の進捗状況

イネ特異的キネシンのクローニングと発現系の構築

塩基配列の解析から新たに見いだされたイネ特有の構造をもつ D04, E15, K16, L05, N14, O12, K23 キネシンを確立した方法に従ってクローニングを行い大量発現を構築することに成功した。

生化学的特徴づけ

発現させたイネキネシンの生化学的特徴付けを行うために 1. ATPase活性 2. 微小管との相互作用 3. In vitro motility assay による微小管の滑走速度などの測

定を行った。そして、いままでに性質を明らかにしているイネキネシンおよびその他の種のキネシンと比較を行った。

ストップ・フロー装置による速度論的解析

生化学的特徴付けを行ったイネキネシンの速度論的解析を蛍光標識ATPアナログ NBD-ATPとストップ・フロー装置を用いて解析を行った。そして今までに報告されているキネシンと比較を行った。特にイネキネシンO12は微小管が無い状態ではATPの結合が極めて遅く、結合が抑制されていることが明らかになった。

溶液中での局所的、全体的構造解析

生化学的解析と結晶構造が明らかになったイネキネシン K16 の ATP 加水分解に伴う全体的な構造変化を捉えるために K16-GFP 融合蛋白を調製して X 線溶液散乱と蛍光エネルギー移動法を用いて解析を行った。X 線溶液散乱の実験から、ADP 結合状態では融合蛋白の慣性半径が No nucleotide 状態の時より小さくなり、コンパクトな構造をとることが示された。これは K16-ADP の結晶構造に見られるネックリンカーが undock 状態にあることを反映していると考えられる。

3. 現在までの達成度

- ④ おおむね順調に進展している。
イネ特有と考えられる複数のキネシンの発現系を構築し、生化学特徴付けから興味深い

性質をもつキネシンの存在を明らかにした。また、その中の一つは結晶構造を決定することができ、また生理的な研究にまで発展させることができている。よって、おおむね順調に進展していると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究により、イネキネシンの中には、動物細胞には見られないたいへんユニークな性質をもつキネシンが存在していることが明らかになった。これらのキネシンは、イネ特有の生理的な機能に密接に関係していると考えられる。そこで推進方策では、これまでの研究によりイネゲノム上にコードされるキネシンの中から、申請者らが見出した極めてユニークな性質を持つキネシンの構造と生理的な役割を明らかにすることを目的としている。そしてイネの品種改良を目的とした高機能を付加したキネシンの開発へ発展させることを試みる。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) "Conformational dynamics of loop L11 and L12 of kinesin as revealed by spin-labeling EPR" Yamada, D. M., Maruta, S., Yasuda, S., Kondo, K., Maeda, H., & Arata, T. (2007)

Biochemical and Biophysical Research Communications. 364, 620-626. 査読有

2) "Kinesin-Carboxymodulin fusion protein as a molecular shuttle" Shishido, H., Nakazato, K., Katayama, E., Chaen, S., & Maruta, S. (2010) **Journal of Biochemistry 147, 213-223. 査読有**

[学会発表] (計 24 件)

1) 丸田晋策, 梅木伸久, 三ツ井敏明, 藤本瑞"イネキネシンK16モータードメインの結晶構造" 第80回 日本生化学会大会 平成19年12月12日 横浜

2) 久保優子, 山田正文, 杉本泰伸, 若林克三, 丸田晋策 "X線小角散乱を用いた新規イネキネシンK16の構造変化の解析" 第45回 日本生物物理学会年会 平成19年12月22日 横浜

3) 丸田晋策, 梅木伸久, 三ツ井敏明, 藤本瑞"結晶構造解析で明らかになったイネキネシンK16のネックリンカーの特徴的コンホメーション" 第45回 日本生物物理学会年会 平成19年12月22日 横浜

4) 土田雅子, 山田正文, 吉村栄子, 近藤和, 丸田晋策 "蛍光標識ATPアナログを用いた新規イネキネシンのK16のATPase kinetic pathway

の観察" 第45回 日本生物物理学会年会 平成19年12月22日 横浜

5) 梅津のぞみ, 梅木伸久, 近藤和典, 三ツ井敏明, 丸田晋策 "蛍光標識ATPアナログを用いたイネキネシンO12の生化学的解析"

第45回 日本生物物理学会年会 平成19年12月22日 横浜

6) Tsuchida, M., Yamada, M., Yoshimura, E., Kondo, K., and Maruta, S. "Characterization of the ATPase kinetic pathway of the novel rice kinesin K16"

第47回 米国細胞生物学会年会 2007年12月2日 Washington, DC USA

7) Maruta, S., Umeki, N., Mitsui, T., and Fujimoto, Z. "Crystallographic Study on the Motor Domain of Rice Kinesin K16 Reveals a Novel Conformation of Neck-linker" 第47回 米国細胞生物学会年会 2007年12月2日 Washington, DC USA

8) Kubo, Y., Yamada, M. D., Sugimoto, Y., Wakabayashi, K., and Maruta, S. "Analysis of conformational change of novel rice kinesin K16 using small angle X-ray solution scattering"

9) Nozomi UMEZU, Yuko KUBO, Toshiaki MITSUI, Shinsaku MARUTA

Kinetic characterization of the novel rice kinesin L05 and L04 using fluorescent ATP analogue. 第46回日本生物物理学会、2008年12月、福岡、

10) Masako TSUCHIDA, Masafumi D. YAMADA, Kazunori KONDO, Shinsaku MARUTA Preparation and characterization of novel rice kinesin E15. 第46回日本生物物理学会、2008年12月、福岡、同学会要旨集 p.S102

11) Yuko KUBO, Masafumi D. YAMADA, Hideki SHISHIDO, Yasunobu SUGIMOTO, Katsuzo WAKABAYASHI, Shinsaku MARUTA

Analysis of conformational change of novel rice kinesin K16 using small angle X-ray scattering and FRET. 第46回日本生物物理学会、2008年12月、福岡、同学会要旨集 p.S103

12) Yuko KUBO, Masafumi D. YAMADA, Yasunobu SUGIMOTO, Katsuzo WAKABAYASHI, Shinsaku MARUTA Analysis of conformational change of novel rice kinesin K16 using small angle X-ray solution scattering. 2nd International symposium on Bio-nanosystems, 2008.11, Tokyo

13) Masako TSUCHIDA, Masafumi D. YAMADA, Kazunori KONDO, Shinsaku MARUTA Expression and characterization of novel rice kinesin E15. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009. Feb., Boston USA,

14) Nozomi UMEZU, Yuko KUBO, Kazunori KONDO, Toshiaki MITSUI, Shinsaku MARUTA Kinetic characterization of the rice kinesins using fluorescent-ATP analogue. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009. Feb., Boston USA,

15) Shinsaku MARUTA, Keiko TANAKA, Yoko KUBO, Toshiaki MITSUI, Zui FUJIMOTO

Analysis of crystal structure and solution structure of the motor domain of rice kinesin K16. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009. Feb., Boston USA

16) Yuko KUBO, Satoshi YASUDA, Yasunobu SUGIMOTO, Masafumi YAMADA, Toshiaki ARATA, Katsuzo WAKABAYASHI, Shinsaku MARUTA

Analysis of conformational change of novel rice kinesin K16 using small angle X-ray solution scattering and EPR. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009. Feb., Boston USA

17) Nozomi UmezU, Kazunori Kondo, Toshiaki Mitsui, Shinsaku Maruta

"Characterization of the plant rice kinesin O12 that

has a calponin homology domain” 第 82 回日本生化学会合同大会、2009 年 10 月 22 日、神戸

18) Nozomi Umezu, Kazunori Kondo, Toshiaki Mitsui, Shinsaku Maruta

“Interaction of the novel rice kinesin O12 that has the calponin homology domain with actin Kinesin Calmodulin Fusion Protein as a Molecular Shuttle” 第 47 回日本生物物理学会年会、2009 年 10 月 31 日、徳島

19) Nobue Hanzawa, Nozomi Umezu, Kazunori Kondo, Toshiaki Mitsui, Shinsaku Maruta

“Characterization of the novel rice kinesin K23” 第 47 回日本生物物理学会年会、2009 年 10 月 31 日、徳島

20) Kumiko Ishikawa, Keiko Tanaka, Shinsaku Maruta
“The functional role of the unique loop L5 of kinesin” 第 47 回日本生物物理学会年会、2009 年 10 月 31 日、徳島

21) Keiko Tanaka, Yasunobu Sugimoto, Masafumi D. Yamada, Katsuzo Wakabayashi, Shinsaku Maruta

“Analysis of conformational change of kinesin neck-linker using small angle X-ray solution scattering” 第 47 回日本生物物理学会年会、2009 年 10 月 31 日、徳島

22) Umezu, N., Kondo, K., Mitsui, T., Maruta, S.

“Characterization of the Novel Rice Kinesin O12 which Has CH Domain” 第 49 回米国細胞生物学会年会 2009 年 12 月 8 日 San Diego, CA USA.

23) Ishikawa, K., Tanaka, K., Maruta, S.

“ANALYSIS OF THE ROLE OF UNIQUE LOOP L5 IN RICE KINESIN K16 MOTOR DOMAIN” 第 54 回米国生物物理学会 2010 年 2 月 21 日 San Francisco, CA USA.

24) Tanaka, K., Sugimoto, Y., Wakabayashi, K., Maruta, S.

“ANALYSIS OF CONFORMATIONAL CHANGE OF CONVENTIONAL KINESIN CHIMERIC PROTEIN FUSED WITH GFP USING SMALL ANGLE X-RAY SOLUTION SCATTERING” 第 54 回米国生物物理学会 2010 年 2 月 21 日 San Francisco, CA USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]