

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370066

研究課題名（和文） 一分子 FRET 法による分子モーターキネシンの二足歩行メカニズムの研究

研究課題名（英文） Single molecule FRET study for the walking mechanism of molecular motor kinesin

研究代表者

富重 道雄（TOMISHIGE MICHIO）

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：50361530

研究成果の概要（和文）：

分子モーターキネシンは2つの頭部を交互に動かしてまるで歩くように運動する。我々はキネシンの原子構造モデルを元に、2つの頭部をつなぐネックリンカーが協調性に重要であるという仮説を立てた。ネックリンカーにかかる張力を緩和させた変異体や片方だけ張力を受けないようにした変異体キネシンの運動や構造変化を一分子レベルで観察することによって、このモデルを裏付け、二足歩行運動の構造基盤を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Molecular motor kinesin walks along microtubules by alternately moving two motor heads. We hypothesized based on atomic structural models that the neck linkers connecting two heads are essential for the coordination between heads. We tested this hypothesis by observing at the single molecule level the movements and structural changes of the mutant kinesins whose tension posed to the neck linker were reduced or abolished and provided the structural basis to explain the walking mechanism of kinesin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：一分子計測、蛍光共鳴エネルギー移動、分子機械、分子モーター、構造変化

1. 研究開始当初の背景

歩行中のキネシンが2つの頭部を協調させるためには、2つの頭部をつなぐネックリンカーにかかる張力が重要であると考えられていたが、その詳しい仕組み、特に張力がどのようにして前後の頭部に異なる作用を与えているのか、についてはいまだ明らかにされていない。その大きな原因は、さまざまな状態の結晶構造が解かれている中でヌクレオチドなし状態のキネシンの結晶構造だけ

がまだ解かれておらず、協調的な二足歩行運動を構造レベルから説明することができなかったためである。しかし最近我々はヌクレオチドなし状態の結晶構造を解くことに成功し、初めて原子構造モデルを作ることが可能になった。また最近我々が開発した一分子 FRET 法を用いたキネシンの構造変化の検出法によって、このような構造モデルを実験的に検証することが可能になると期待される。

2. 研究の目的

キネシンが2つの頭部を交互に動かして二足歩行する仕組みを、構造レベルから明らかにすることを目標とする。そのためにまず、最近我々が解いたヌクレオチドなしのキネシン頭部の結晶構造とその他のヌクレオチド状態の結晶構造を元にキネシン二量体の原子構造モデルを作成し、これを元にネックリンカーの張力依存的な頭部間協調性の構造モデルを構築する。このモデルを実験的に検証するために、ネックリンカーの張力を緩和させた変異体や、頭部をタンデムにつないで片方のネックリンカーは頭部に接続されておらず張力を伝えることのできない変異体、またジスルフィド結合によりネックリンカーを頭部に固定して動かないようにした単頭キネシンを用いる。これらの変異体の運動や構造状態を一分子蛍光観察や一分子FRET法を用いて観察することによって、ネックリンカーにかかる張力を通じて2つの頭部が協調する仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

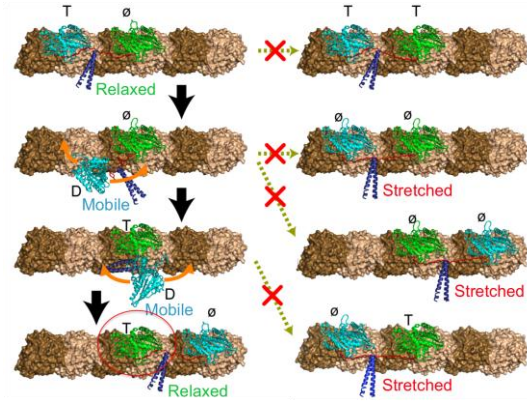
(1) ネックリンカーにかかる張力の役割を調べるために、張力を緩和または完全になくした変異体を作製した。ネックリンカーの末端にポリグリシン残基を挿入してネックリンカーを伸ばした変異体と、2つの頭部を遺伝子上で直列につなぎ、N末側の頭部（N末頭部）のネックリンカーはもう片方の頭部（C末頭部）につながっているものの、C末頭部のネックリンカーはN末頭部につながっていないタンデムキネシンを作製した。さらにキネシン頭部とネックリンカーの2カ所にシステイン残基を導入し、酸化条件下でジスルフィド結合を形成させることにより、ネックリンカーを前向きまたは後ろ向きに固定した単頭キネシンを作製した。

(2) キネシンの微小管上での運動は全反射蛍光顕微鏡を用いて一分子レベルで観察した。キネシンの構造変化を検出するためには一分子蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法を用いた。ヘテロダイマーキネシン発現系を用いて、2つの頭部にそれぞれ一カ所ずつシステイン残基を導入し、それらをドナーとアクセプターの蛍光色素で標識する。微小管上を蛍光標識したキネシンが運動する様子を全反射蛍光顕微鏡で観察し、二波長同時観察装置を用いてFRET効率を計測した。

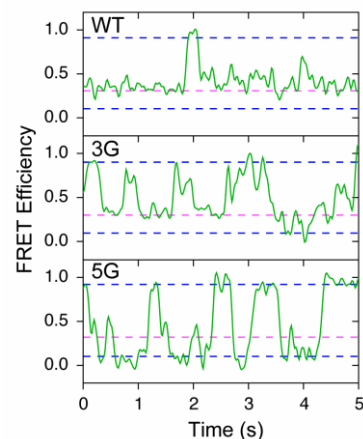
4. 研究成果

(1) 最近我々が解いたキネシン頭部の結晶構造と既に解かれている結晶構造を組み合わせ、微小管上のキネシン二量体の原子構造モデルを作成した。様々なヌクレオチド状態の組み合わせで二量体モデルを作成し比較した

ところ、後ろ頭部がATP状態で前頭部がヌクレオチドなしの状態と比べて、両頭部がATP状態または両頭部がヌクレオチドなし状態ではネックリンカーが伸びて張力が増すことが明らかになった。これらの結果は、ネックリンカーの張力上昇によって可能な構造遷移のうち特定の経路のみが選択されて頭部間の協調性が生まれるという、張力依存的な二足歩行モデルを示唆するものである。

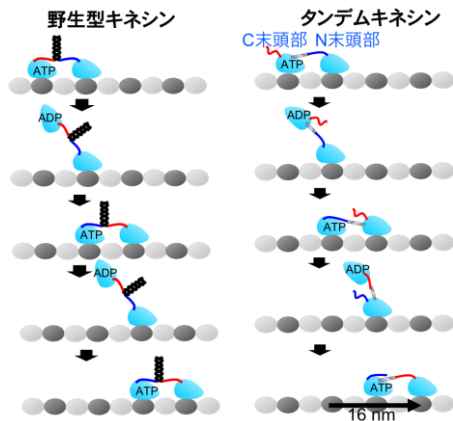


(2) 前述のモデルを実験的に検証するために、ネックリンカーを人工的に伸ばして張力を緩和させた変異体を作成した。この変異体の運動を一分子レベルで観察したところ、ネックリンカーを伸ばすにつれて運動速度が低下した。さらに一分子FRET法を用いて運動中の頭部間の相対距離を計測することによって、ATP濃度が低い条件下でも両足結合状態を主にとることが示された。これらの結果は、ネックリンカーの張力を低下させることによって野生型では抑制されている構造状態に遷移できるようになったということを示すものであり、上記のモデルが実験的に裏付けられた。

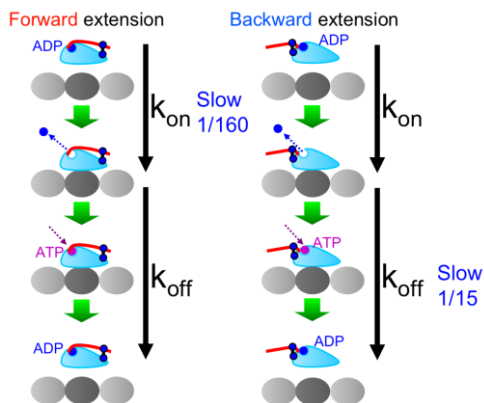


(3) ネックリンカーの頭部への結合がキネシンの前方へのステップを引き起こすというモデルが広く受け入れられているが、このネックリンカードッキングが本当にステップに必須であるかどうかを検証するために、ドッキング依存的なステップと非依存的なステップを交互にとって運動するようなタ

ンデム変異体を作製した。この変異体は微小管上を連続的に運動したものの、運動速度は野生型の 1/4 に減少した。一分子 FRET 法を用いて 2 つの頭部間の相対位置関係を調べたところ、N 末側頭部が前であるような両足結合状態をとる時間が長く律速となっていた。これらの結果は、ネックリンカードッキングはステップに必須ではなく、上記の構造モデルから導き出される非依存的な仕組み（バイアス結合モデル）の方がより効率的であることを示唆するものである。



(4) ネックリンカーにかかる張力の向きは前と後ろの頭部で反対であり、どちらの向きに引っ張られるかによって頭部の ATP 加水分解が異なる制御を受けていると考えられる。この考えを検証するために、単頭キネシンのネックリンカーをジスルフィド結合により前または後ろ向きに伸ばした状態で固定した。ATP 存在下での微小管の結合解離を一分子レベルで観察したところ、ネックリンカーを後ろ向きに固定した場合は固定する前に比べて微小管上での滞在時間が 15 倍上昇した。またストップドフローを用いた測定により、ネックリンカーを前向きに固定した場合は ADP の解離速度が 100 倍以上減少した。これらの結果はネックリンカーを引っ張る向きによって ATP 加水分解サイクルの異なるステップが抑制されることを示すものであり、二量体における 2 つの頭部間の協調性の仕組みを説明するものである。



5. 主な発表論文等

(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 0 件)

[学会発表] (計 26 件)

- ① Michio Tomishige, Structural basis for the coordinated processive movement of kinesin motor protein, The 17th International Biophysics Congress, Symposium "Cytoskeleton and motor dynamics", 2011 年 11 月 01 日, Beijing, China
- ② Michio Tomishige, Structural basis for the coordinated walking mechanism of kinesin motor protein, IMS Symposium on "Recent Development of Spectroscopy and Spatial and Temporal Hierarchical Structures in Molecular Science", Institute for Molecular Science, 2011 年 10 月 18 日, Institute for Molecular Science, Okazaki
- ③ 富重道雄, キネシンの協調的な二足歩行運動の仕組みとその制御、第 63 回日本細胞生物学会シンポジウム「細胞内で協調して活躍するモーター分子」、2011 年 06 月 27 日、北海道大学
- ④ Michio Tomishige, Structural basis for the coordinated movement of kinesin motor protein, 1st HSFP Alumni Meeting - Japan, 2010 年 10 月 9 日, Yayoi Auditorium-Annex, Univ. of Tokyo
- ⑤ Michio Tomishige, Structural basis for the coordinated processive movement of kinesin, EMBO Conference Series "Microtubules: Structure, Regulation and Functions", 2010 年 6 月 5 日, EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany
- ⑥ Michio Tomishige, Single molecule observation of structural changes of kinesin motor protein, International Symposium on Watching Biomolecules in Action, 2009 年 12 月 15 日, ライフサイエンスセンター、大阪
- ⑦ Michio Tomishige, Structural basis for the coordinated processive movement of microtubule-based motor kinesin, International Symposium "Innovative Nanoscience of

Supermolecular Motor Proteins Working
in Biomembranes”, 2009年9月9日，京
都大学 芝蘭会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富重 道雄 (TOMISHIGE MICHIO)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：50361530