

平成 2 8 年 6 月 3 日現在

機関番号： 1 2 6 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2014 ~ 2015

課題番号： 2 6 8 4 0 0 3 0

研究課題名（和文）複合体の結晶構造解析による微小管上のキネシン運動原理の解明

研究課題名（英文）Structural basis for the movement of kinesin on microtubule

研究代表者

牧野 司（Tsukasa, Makino）

東京大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：1 0 6 3 2 8 9 6

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：すべての細胞機能の基盤となる細胞内輸送の主役であるキネシンが微小管（チューブリン複合繊維）の上を走るしくみを解明するため、まず構造解析に適した組み換え体チューブリンの大量調製法を開発した。この方法を用いて薬剤耐性を獲得したがん細胞において発現量が増えるヒトチューブリンを調製し、高分解能結晶構造を解明した。さらに微小管上でのキネシンの詳細なモデルを構造生物学的な手法により得て、微小管がどのようにキネシンの運動を促進するか明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Intracellular transport is crucial for cellular function. We studied the structural basis focusing on the kinesin and microtubule (a filament polymerized with tubulins). To this end, we developed a system for preparing recombinant tubulin in large-scale, which is a product from single gene, and contain no affinity-tag. We also determined the crystal structure of human tubulin prepared using our method. This work has clinical significance because this human tubulin expression and drug resistance of tumor cells are linked. Finally we determined the atomic structural model of dimer kinesins on microtubule using cryo-electron microscopy and Xray crystallography. Combining single molecule FRET and other method, we elucidated the mechanism how microtubule promote the kinesin movement.

研究分野： 構造生物学

キーワード： チューブリン組換え体 キネシン 微小管

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は生命を維持するために必須な RNA、蛋白質などの物質を合成し、それらを適切な場所に輸送する物流システムを持つ。この物流システムが滞ると、正常な細胞機能が障害され、脳神経疾患、発生異常、がん発症につながる。物流システムの中核を担うのは道路に相当する「微小管」と呼ばれる「チューブリン」タンパク質が筒状に重合してできた繊維とその上を動く車に相当するモータータンパク質「キネシン」である。

キネシンの微小管結合部位である頭部の立体構造は我々とその他のグループによって様々なヌクレオチド結合状態のものが解明され、また一分子運動解析により2つの頭部を交互に動かしてまるで人の二足歩行のように進むことが分かってきた。しかしどのように2つの頭部が協調して運動するか、微小管がキネシン頭部のATP加水分解サイクルを促進する構造基盤は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は分子モーターであるキネシンの二足歩行運動を、レールである微小管がどのように促進するか、構造生物学的な手法を用いて、原子レベルの精密な立体構造をもとに明らかにすることを課題として定めた。

また、そのための基盤となる組み換えチューブリンの調製技術を確認することも課題とした。

### 3. 研究の方法

(1) 従来チューブリンは動物の脳から調製するが、その方法で得られるチューブリンは数十種類の遺伝子産物の混合物であり、構造もそれぞれ異なる。構造生物学的手法によって得られる構造はそれらの平均であるため、失われる構造情報が生じてしまう。そこで最近報告された昆虫細胞を用いた組み換えチューブリン調製法を改良し、結晶化に必要な大量の単一遺伝子による組み換えチューブリンの調製法を開発した。

(2) 上述の課題を解明するため、単一遺伝子からのチューブリン結晶構造および、キネシンと微小管の複合体の構造をX線結晶解析法、

クライオ電子顕微鏡法により解析した。また得られた立体構造をもとにデザインした変異体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 と略す）法を用いた。変異体キネシンの微小管結合にともなうヌクレオチド（ADP）の放出速度はストップドフローによるキネティクス測定を行った。

### 4. 研究成果

(1) ヒトとショウジョウバエの単一遺伝子由来で、精製用のタグ配列の無い組み換えチューブリンを大量調製する方法を確立した。1回あたり 10 mg 程度の収量があり、結晶構造解析にも使用できるようになった。

(2) 脳で特異的に発現しているヒト $\alpha 1\beta 3$  チューブリンを(1)の方法で調製し、その結晶構造を 2.5 Å 分解能で明らかにした（図1）。本研究で用いたヒトチューブリンは薬剤耐性を獲得したがん細胞において発現量が増える特殊なチューブリンであるが、薬剤の結合部位に従来のブタ脳から精製されたチューブリンと異なる構造的特徴を発見した。今回決定した詳細構造により、抗がん剤の薬剤耐性獲得の仕組みの解明や、また今後の新規薬剤の設計への貢献が期待される。

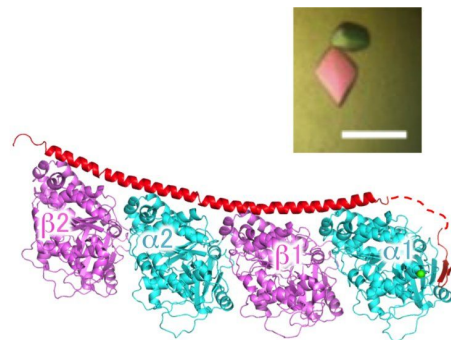


図1: ヒトチューブリン結晶と 2.5 Å 分解能結晶構造

(3) キネシン-微小管複合体のクライオ電子顕微鏡による立体構造解析に成功し、15 Å 程度の分解能の立体構造を得た。この複合体構造と我々の決定したヌクレオチド無し結晶構造およびその他のヌクレオチド状態の頭

部の立体構造を組み合わせ、微小管上の双頭キネシンの原子モデルを作成した(図 2)。様々なヌクレオチド状態の組み合わせ双頭モデルを比較したところ、以下のように微小管がキネシン運動を促進する機構が明らかになった。

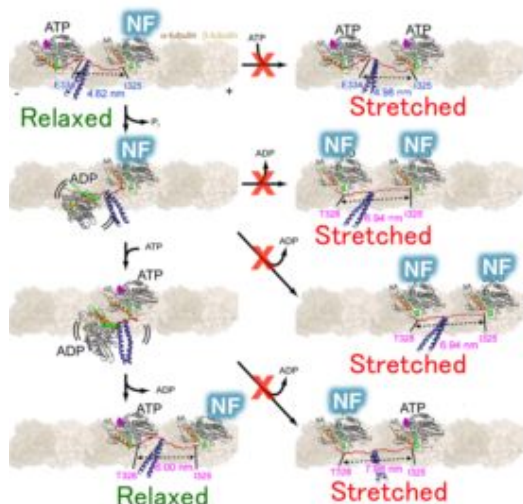


図 2: キネシンの原子構造モデル

双頭結合状態において、後ろ頭部が ATP 状態で前頭部がヌクレオチド無しの状態と比べて、両頭部が ATP 状態または両頭部がヌクレオチド無しの状態の組み合わせでは、頭部を連結するネックリンカーが伸びて、そこにかかる張力が增大することがわかった。この結果はつまり、微小管上のキネシン頭部の結合部位の間隔とキネシンの歩幅が絶妙にマッチしていて、正常な加水分解サイクルで両頭部が協調している場合以外ではネックリンカーの張力上昇によりそれらの構造へ

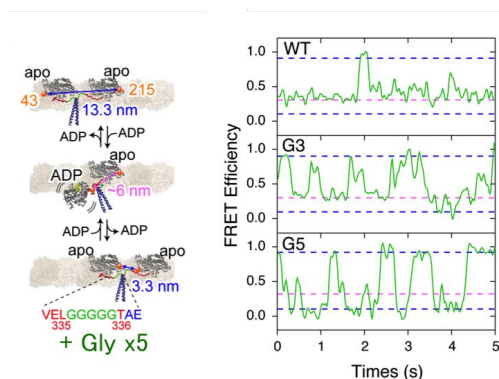


図 3: ネックリンカー伸長変異体の一分子 FRET 解析

の遷移が防がれるという、張力依存的な二足歩行メカニズムを示唆するものであった。

この仮説を検証するためにネックリンカーを伸ばした変異体を作成し張力を緩和したところ、ネックリンカーを伸ばすにつれて運動速度が低下した。さらにネックリンカー伸長変異体では頭部間の協調性が失われ、微小管から外れた後ろ頭部が後ろへ再結合しやすくなることを一分子 FRET 解析により示した(図 3)。

複合体構造をもとに設計した変異体のキネティック測定により ADP 放出のメカニズムを明らかにした。キネシンは 3 つの独立に動くドメインから構成されることを見だし、1 つは微小管に結合し、その上方に 2 つドメインが前方と後方からヌクレオチドを挟んでいる。頭部が微小管に結合するとキネシンの微小管結合ドメインではヌクレオチドポケット側でヘリックスの伸長が起こり、これにより前方ドメインの回転を引き起こす。一方で後方ドメインはチューブリンとの相互作用により前方ドメインと逆回転をするためにヌクレオチドポケットの構造が壊れ、ADP が放出されるという仕組みが明らかになった(図 4)。

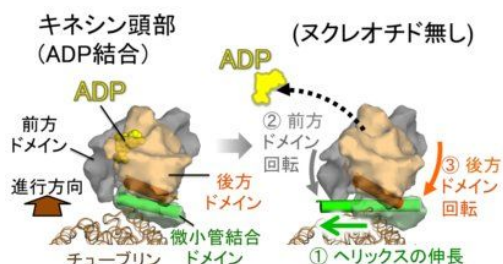


図 4: 微小管結合にともなうキネシン頭部内の構造変化とヌクレオチド放出

## 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 1 件)

牧野司、吉川雅英、細胞骨格(微小管系)、生  
体の科学、査読無、66, 2015, 506-507  
DOI: [http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425  
200330](http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425200330)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

牧野 司 ( TSUKASA MAKINO )

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10632896