

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19870034
研究課題名（和文） 変異微小管を用いたキネシンの運動解析

研究課題名（英文） A study on the mechanism of kinesin motility using mutant analysis of microtubule

研究代表者
内村 誠一（UCHIMURA SEIICHI）
独立行政法人・理化学研究所・分子動態解析技術開発チーム・研究員
研究者番号：80455328

研究成果の概要：変異微小管を用いてキネシンの1分子運動解析、力学測定、ATPase 酵素活性測定を行うことにより、役割の異なる微小管上の2箇所の相互作用部位を同定した。これら微小管上の相互作用部位とキネシンとの相互作用はそれぞれ、キネシンのATPaseを活性化するためのスイッチ、キネシンを微小管上に留めておくためのフックとしての役割を果たしているようである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学
キーワード：生物物理、細胞骨格、分子モーター

1. 研究開始当初の背景

微小管は細胞骨格タンパク質として細胞の形態を維持するだけではなく、それ自身のダイナミックな動態、もしくは他の関連蛋白質と協調して働くことにより細胞内情報を伝達するという重要な役割を果たしている。分子モータータンパク質の一種であるキネシンは、ATP の加水分解エネルギーを使ってこの微小管上を数百ナノメートルという長距離に渡って一分子で連続的に運動し(プロセシビティ)、細胞内では情報伝達物質や細胞小器官などを輸送している。このキネシンの運動を生み出すキネシン-微小管の相互作用は、リガンド-レセプターのような結合・解離だけの相互作用ではなく、「異方性」、

「逐次性」を併せ持つ特徴的なものであると言える。
キネシンの生化学的な特徴として、微小管との相互作用により ATPase 酵素活性が数百～数千倍にまで増加することが古くから知られている (Microtubule-activated ATPase)。この事は、キネシン-微小管相互作用の情報がキネシンの構造変化を通して ATP 加水分解サイトへと伝達されていることを示しているが、その情報伝達経路は未だ明らかになっていない。この微小管によるキネシン ATPase 活性化のメカニズムを理解するためにはまず、情報伝達経路の出発点であるキネシン、微小管それぞれの相互作用部位を同定する必要がある。キネシン分子内の相互作

用部位はその変異解析が容易であることが背景となって同定されているが、一方、微小管については、微小管構成タンパク質であるチューブリンの複雑なフォールディングシステムや多種類のチューブリンアイソフォームの存在が障害となって、*in vitro*での変異解析はほとんど行われておらず、相互作用部位は同定されていない。我々は、これらの問題を解決するために出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をチューブリン発現の宿主として用いた微小管変異解析の実験系をこれまでに開発しており、これを用いることによって微小管上のキネシンに対する相互作用部位の同定、キネシン ATPase 活性化の構造的基盤を理解することが期待できる。

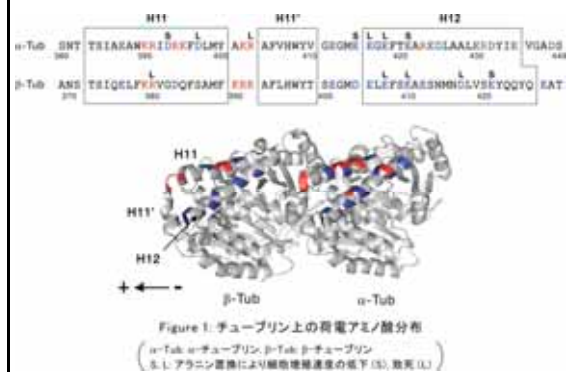
2. 研究の目的

本研究の目的は、微小管によるキネシンの ATPase 活性化のメカニズム、延いては運動メカニズムの構造的基盤を理解することである。キネシンは、運動に必須なモータードメインが他の分子モータータンパク質であるミオシンやダイニンに比べて小さく、発現・精製等が容易であるという利点がある。キネシンをモデルとしてその運動メカニズムを解明することによって、分子モータータンパク質共通の動作原理の理解にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

前述したように、微小管によるキネシン ATPase 活性化のメカニズムを理解するためにはまず、キネシンに対する微小管上の相互作用部位を同定する必要がある。これまでにクライオ電子顕微鏡法を用いたキネシン-微小管複合体の構造解析により、キネシン分子内の α ヘリックス $\alpha 4/5/6$ 、ループL7/8/11/12、チューブリン分子内の α ヘリックス H11/11' /12、C 末端領域がそれぞれの相互作用部位として予測されていたが、アミノ酸残基レベルでの議論を行うには分解能が十分ではなく、運動性に対する直接的な情報は得られ難い。そこで、出芽酵母発現系を用いて微小管の変異解析を行った。変異解析は、相互作用部位を同定すると同時に、相互作用の様相を変化させてキネシンの運動を解析できるという点においても、運動メカニズムを理解する有効な手段であると考えられる。キネシンの運動性は、イオン強度の影響を大きく受けること、また、キネシン分子の変異解析から相互作用部位として荷電アミノ酸が多く同定されていることから、微小管表面(α ヘリックス H11~12)に存在する荷電アミノ酸に着目し、これらの箇所にアラニン変異

を導入した (Figure 1)。



作成したチューブリン変異酵母株から変異微小管を精製し、キネシンの運動に対する影響を解析するため、以下の実験を行った。

(1) 1 分子運動解析

キネシンの運動特性である一分子の挙動を解析するため、全反射蛍光顕微鏡を用いてキネシンの運動を直接的に解析した。

(2) 破断力測定

ATP 加水分解サイクルにおける各ステップのキネシン-微小管間の結合安定性を調べるため、AMP-PNP (加水分解されない ATP 類似体) 存在下、ADP 存在下、ヌクレオチド非存在下での破断力 (結合を破断するために必要とされる力) を測定した。

(3) Microtubule-activated ATPase 測定

微小管によるキネシンの ATPase 活性化をマラカイトグリーン法を用いて解析した。

4. 研究成果

本研究では微小管によるキネシン ATPase 活性化のメカニズムを理解するため、微小管の変異解析を行った。微小管表面 (α ヘリックス H11~H12) に存在する荷電アミノ酸にアラニン変異を導入したところ、8 種類の変異株は致死となり (α -チューブリンの変異体 4 種類、 β -チューブリンの変異体 4 種類)、4 種類の変異株は生育の遅延を示した (α -チューブリンの変異体 3 種類、 β -チューブリンの変異体 1 種類) (Figure 1)。微小管は、細胞分裂に重要な紡錘体を構成するなど必須のタンパク質であり、この結果はこれらのアミノ酸が細胞内微小管機能に重要であることを示している。そこで、これらの変異に着目し、微小管を精製後、上記「研究の方法(1)~(3)」の実験を行った。以下、それぞれの実験結果についてまとめる。

(1) 1分子運動解析 (Figure 2)

α -チューブリン H12 とその N 末領域に存在する 4 つの酸性アミノ酸 (E415, E416, E418, E421)、および β -チューブリンの H12 に存在する 2 つの酸性アミノ酸 (E410, D417) の変異微小管上ではキネシンの運動がほとんど観察されなかった (キネシンの結合頻度が野生型微小管の約 5%)。

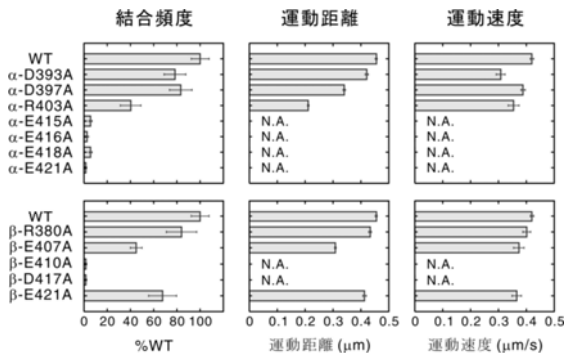


Figure 2: 1分子運動解析の結果

(WT: 野生型, N.A.: データなし)

(2) 破断力測定 (Figure 3)

α -チューブリンの変異体では、AMP-PNP 存在下、ADP 存在下、ヌクレオチド非存在下、全ての条件で野生型に比べて破断力が減少したのに対し、 β -チューブリンの変異体では、ADP 存在下での破断力の減少が見られなかった。

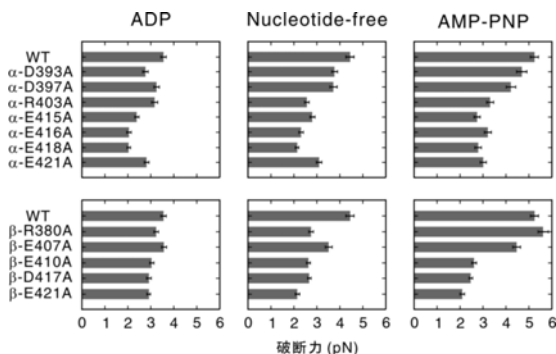


Figure 3: 破断力測定の結果

(3) Microtubule-activated ATPase 測定 (Figure 4, Table 1)

α -チューブリンの変異体では、ATPase 酵素活性の最大反応速度 k_{cat} が野生型に比べて減少しているのに対し (特に顕著な減少が見られた α -E415A 変異微小管では野生型の約 20%)、 β -チューブリンの変異体では k_{cat} の減少は見られず、キネシン-微小管間の親和性を示すミカエリス定数 $K_{\text{m}}(\text{MT})$ の増加 (親和性の減少) が見られた。

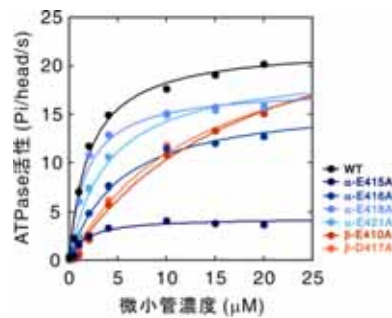


Figure 4: MT-Activated ATPase測定結果

Table 1. Microtubule-Activated ATPase Measurement

Construct	$K_{\text{m}}(\text{MT})$ (μM)	$k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1}\text{head}^{-1})$
WT	2.3 ± 0.7	22.0 ± 0.6
α -E415A	1.8 ± 0.1	4.5 ± 0.4
α -E416A	5.5 ± 0.5	17.6 ± 1.9
α -E418A	2.3 ± 0.8	18.0 ± 0.7
α -E421A	4.2 ± 0.9	20.7 ± 0.7
β -E410A	14.7 ± 3.9	26.7 ± 2.4
β -D417A	13.7 ± 2.0	25.9 ± 1.2

Mean $\pm$ SD

これらの実験結果から、 α -チューブリン H12 とその N 末領域に存在する 4 つの酸性アミノ酸 (E415, E416, E418, E421)、 β -チューブリン H12 の 2 つの酸性アミノ酸 (E410, D417) はキネシンとの相互作用部位であり、これらのアミノ酸残基とキネシンとの相互作用はキネシンの ATPase 活性化、運動メカニズムにおいて明らかに異なった役割を担っていることが示唆された。前者は、微小管によるキネシン ATPase 活性化のためのスイッチのような役割を果たしており、後者はキネシンを微小管上に留めておくためのフックのような役割を果たしているようである。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Seiichi Uchimura, Kinesin interacts with microtubules via 2 independent regions, 6th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, 2009 年 1 月 13 日, 香港
- ② 内村 誠一, 微小管は 2 つの異なる領域を介してキネシンと相互作用する (Microtubule interact with kinesin via two independent regions), 日本生物物理学会第 45 回年会, 2008 年 12 月 5 日, 福岡
- ③ 内村 誠一, 微小管表面に存在する荷電アミノ酸の網羅的変異解析-キネシン相互作用部位の同定-, 2008 年生体運動研究合同班会議, 2008 年 1 月 8 日, 仙台

④ 内村 誠一，微小管におけるキネシンとの相互作用部位のマッピング (Mapping of kinesin-interaction sites on microtubule)，日本生物物理学会第 45 回年会，2007 年 12 月 22 日，横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内村 誠一 (UCHIMURA SEIICHI)

**独立行政法人・理化学研究所・分子動態解析
技術開発チーム・研究員**

研究者番号：80455328