

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (A)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18687009  
 研究課題名(和文) キネシン一分子の構造変化と力発生の同時計測によるエネルギー変換機構の研究  
 研究課題名(英文) Energy transduction mechanism of kinesin as studied by simultaneous single molecule measurement of conformational change and force production  
 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：運動中のキネシンに負荷をかけ、そのときの構造状態を観察するための実験系を構築した。まずキネシン 2 量体の尾部に微小管に結合した後解離できない変異体頭部をつけることにより、運動を束縛して負荷をかけることに成功した。また一分子 FRET 法を用いることにより、運動中のキネシンの構造変化を検出することに成功した。これらを組み合わせることによって、キネシンの力発生の原因となる構造変化を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	16,500,000	4,950,000	21,450,000

研究分野：生物物理

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

キネシン分子モーターの運動の仕組みについては、ここ数年の一分子計測法や構造解析を用いた研究により、二つの頭部を交互に動かして微小管の上を移動するという二足歩行モデルが確立されつつある。しかし、キネシンがいかにして力学的な仕事を行うのか、キネシンの歩行サイクルのどの段階で力が発生するのか、という力発生の仕組みについては明らかにされていない。これらを解明するためには、力学計測と同時に構造変化を一

分子レベルで調べる必要があるが、このような測定はまだなされていない。我々はすでに一分子レベルでキネシンの構造変化を検出することに成功しており、この方法と光ピンセットなどを組み合わせることによってキネシンの構造変化と力発生を同時に計測することが初めて可能になると期待される。

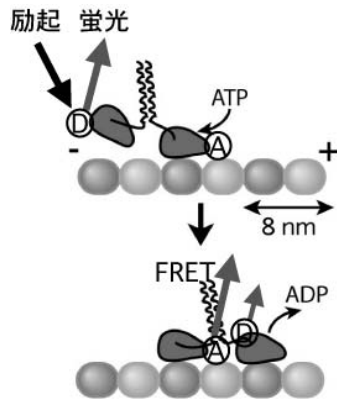
## 2. 研究の目的

キネシン一分子の構造変化と力発生を同時に計測する手法を開発する。我々はすでにキ

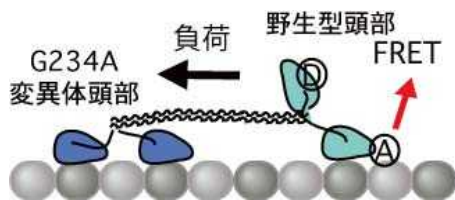
ネシンの運動中の構造変化を、一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法を用いて一分子レベルで観察する方法を確立した。この方法と光ピンセットを組み合わせることによって、構造変化と力発生を同時計測する方法を開発する。そして、この方法を用いて、キネシンの負荷存在下で 8 nm ステップと同時に起こる構造遷移が何であるかを明らかにする。また運動中の各構造状態間の遷移速度が応力の上昇によってどのように変化するかを定量的に調べることにより、外力が構造変化のサイクルに与える影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 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 (FRET) 法を用いる。キネシンに 2 種類の蛍光色素を導入するために、反応性のシステインを遺伝子工学的にキネシンの任意の場所に導入し、これらのシステインを蛍光色素で標識する。蛍光標識したキネシンが微小管上を運動していく様子を全反射顕微鏡を用いて一分子レベルで観察する。

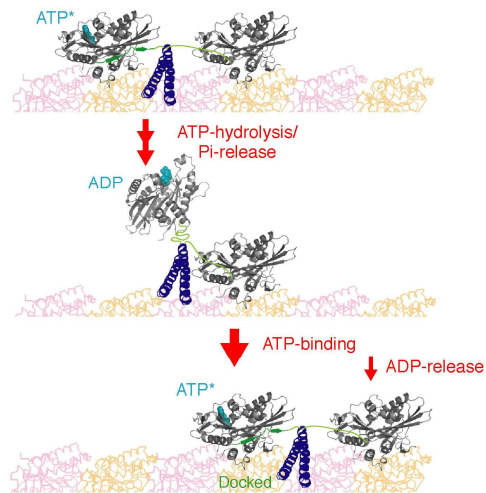


(2) 運動中のキネシンに負荷をかけ、そのときの内部構造状態を観察するためのアッセイ系を構築する。具体的には、キネシン 2 量体の尾部に微小管に結合した後解離することのできない変異体 (G234A) キネシン頭部を融合したコンストラクトを作成した。また、キネシン頭部への ATP の結合解離を検出するために、蛍光性 ATP とキネシン頭部の色素との間の FRET を測定する。これにより外力がキネシンの ATP 加水分解反応サイクルに与える影響を明らかにする。



### 4. 研究成果

(1) キネシンの構造変化を一分子レベルで検出するために、一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法を用いてキネシン 2 量体分子内での距離計測を行った。2 つの頭部に一つずつ結合させた色素間の距離を一分子 FRET 法で測定することによって、キネシンの両足結合状態と片足結合状態を区別して検出することに成功した。この方法を用いて様々な ATP 濃度存在下で運動中のキネシンの構造変化の観察を行い、キネシンは ATP 結合を待っている状態では片足結合状態を主に取ることを示した。また、片方の頭部が微小管に結合することのできない変異体ヘテロダイマーキネシンを用いることによって、微小管に結合している頭部に ATP が結合すると、そのネックリンカーが構造変化して浮いている頭部を前方に移動させ、それによって両足結合状態を取り一歩前にステップするという仕組みを明らかにした。

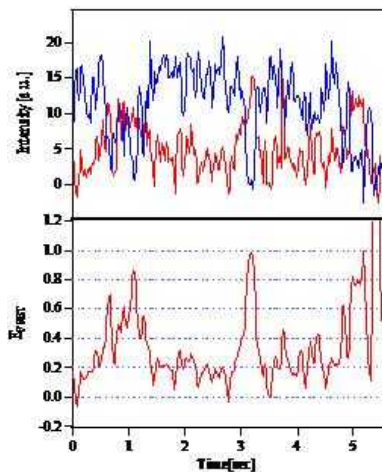


(2) 運動中のキネシンに負荷をかけるためのアプローチとして、2 分子のキネシンを架橋し、片方のキネシンをアンカーとしてもう一方のキネシンに負荷をかける実験系の開発を行った。ラバマイシンによって誘導される FKBP の架橋反応を利用することによって、2 つのキネシン分子を特異的にクロスリンクすることに成功した。架橋された 2 分子キネシンの運動を一分子のキネシンと比較したところ、架橋されたキネシンの運動速度は一分子のものと同様であったが、移動距離は 1.5 倍上昇した。この結果は、架橋された 2 分子は互いの運動を抑制することなく何らかの仕組みで協調していることを示唆するものである。

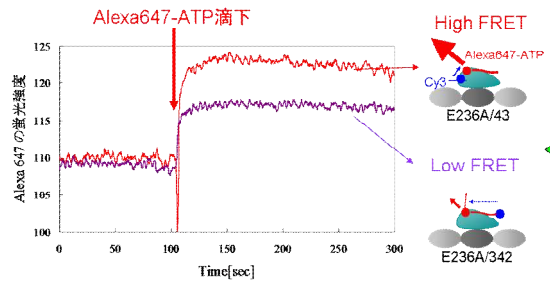
(3) 光ピンセットを使わずに運動中のキネシンに負荷をかけ、そのときの内部構造状態を観察するための実験系を構築するために、キネシン 2 量体の尾部に微小管に結合した

後解離することのできない変異体キネシン頭部を融合したコンストラクトを作成した。このキネシンの運動を一分子イメージング法を用いて観察したところ、一部のキネシンは野生型と同じ速度で運動したものの、大部分のキネシンは見かけ上停止して、微小管上で固定されることを明らかにした。また実際に負荷がかかっているかどうかを確認するために、尾部と変異体キネシンとの間にランダムコイルペプチドを挿入し、その長さを一分子 FRET 法を用いて計測した。ATP 非存在下と比べて ATP 存在下では FRET 効率の低下が見られた。これはキネシンに十分な負荷がかかってランダムコイルが伸びていることを示すものである。

(4) (3)で確立した光ピンセットを使わずにキネシンに負荷をかける実験系において、野生型キネシンの2つの頭部にそれぞれドナーとアクセプターの蛍光色素を導入し、FRET 効率を一分子レベルで観察することにより、キネシンが両足結合状態と片足結合状態を交互に遷移しながら運動する様子を観察した。その結果、飽和 ATP 存在下で負荷を受けて運動しているときには無負荷の場合と比較して、片足結合状態を取る時間が大幅に長くなることが分かった。この結果は、片足結合状態から両足結合状態への遷移が最も負荷の影響を受けること、また浮いた頭部の拡散による前方への移動が負荷により抑えられることがその構造基盤であることを示すものである。



(5) キネシン頭部への ATP の結合解離を一分子レベルで検出するために、片方の頭部にドナーの色素を導入し、そこへ蛍光性 ATP (アクセプター)を加えて FRET の変化を観察した。蛍光分光光度計を用いたバルクの条件で、蛍光性 ATP のキネシン頭部への結合解離を FRET 変化として検出することに成功した。



## 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6件)

A. Yildiz, M. Tomishige, A. Gennerich, and R. D. Vale. Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell* 134, 1030-1041 (2008). 査読有

M. Tomishige. Activation of mitotic kinesin by microtubule bundling. *J. Cell Biol.* 182, 417-419 (2008). 査読無

富重道雄、細胞内輸送を担う分子モーターの運動機構、*生体の科学*, 59, 362-363 (2008). 査読無

T. Mori, R. D. Vale and M. Tomishige, How kinesin waits between steps. *Nature* 450, 750-754 (2007). 査読有

M. Tomishige, N. Stuurman and R. D. Vale, Single molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 887-894 (2006). 査読有

富重道雄、一分子計測法によって明らかになったモータータンパク質キネシンの二足歩行の仕組み、*物性研究*, 85, 624-629 (2006). 査読無

[学会発表](計10件)

凌霄、森徹平、牧野司、富重道雄、キネシンのATP加水分解反応に対するネックリンカーの役割、生体運動研究合同班会議、2009年1月9日、東京大学駒場キャンパス

小橋川翔太、中島理子、富重道雄、負荷存在下でのキネシンの構造状態の一分子FRET観察、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月4日、福岡国際会議場

凌霄、森徹平、中島理子、富重道雄、キネシン2量体の前後の頭部へのATP結合の可視化、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月4日、福岡国際会議場

富重道雄、微小管上を歩く分子モーターキネシンの運動の仕組み、第30回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会、2008年10月15日、北海道大学学術交流会館

富重道雄、二足歩行する分子モーターキネシンから見えてきたエネルギー変換機構、日本生物物理学会第45回年会シンポジウム「生体モーターの多様性と同一性」, 2007年12月23日、パシフィコ横浜

小橋川翔太、森徹平、富重道雄、2分子を連結させたキネシン複合体の協調的運動の観察、日本生物物理学会第45回年会、2007年12月22日、パシフィコ横浜

M. Tomishige, Single molecule observations of structural changes in a "walking" motor protein. Ninth Annual Japanese American Kavli Frontiers of Science Symposium, December 9, 2006, Beckman Center, Irvine, CA, USA

## 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