

機関番号：32690

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 the plant specific kinesin encoded on the rice genome

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

研究成果の概要（和文）：イネのゲノム上にコードされるキネシンの中から、植物特異的と予測されるアミノ酸配列をもつ複数のキネシンを遺伝子工学的に大腸菌を利用して発現させることに成功した。発現させたキネシンの酵素化学的特徴付けと結晶構造解析を行い、既に明らかになっている植物と動物由来のキネシンと比較を行った。その結果、物特異的な生理機能に関係していると考えられるユニークな性質と構造を示すキネシンを見いだすことができた。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded to express several plant specific kinesins encoded on the rice genome using E.coli. expression system. Enzymatic characterization and the crystal structure of the expressed kinesins were analyzed. The results revealed that some of the kinesin have unique enzymatic properties and structure that may reflect the plant specific physiological role of the kinesins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：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：イネ、分子モーター、キネシン

1. 研究開始当初の背景

細胞内に存在する繊維状構造体である細胞骨格の役割は、植物と動物の細胞において異なっており、特に細胞分裂や形態形成における役割についてはかなりの差異が見られる。植物細胞の細胞分裂や形態形成には微小管の寄与が大きい、これは動物細胞の場合

にアクチン繊維の寄与が大きいことと対照的である。通常、微小管は微小管付随タンパク質である分子モーター（キネシンやダイニンなど）をともなっており、それらの種類によって微小管には多様な機能が付加される。このことから、ATP駆動型の微小管依存性分子モーターの植物における役割は極め

て重要であると考えられる。キネシンは、ダイニンに続き二番目の微小管依存性の分子モーターとしてイカの神経軸索で見いだされた¹⁾。動物の細胞内において、小胞や細胞小器官の輸送、神経軸索において神経体からシナプス末端への情報伝達物質の輸送、細胞分裂時の中心体の分離と紡錘体の形成など極めて重要な役割を担っていることが示されている。しかしながら、植物細胞におけるキネシンの研究は遅れており、その生理的な役割についてもあまりわかっていなかった。最近になって、全塩基配列が解読されたシロイヌナズナには 61 種類のキネシンが存在しており、その一部のキネシンが形態形成に直接関与している事が示された²⁾。またタバコの細胞において、細胞分裂の最終ステップに必須因子である蛋白質リン酸化酵素を活性化して細胞板形成の場に運ぶ役割を担っていることが報告されている³⁾。このように植物におけるキネシンの重要な働きが次第に明らかになってきた。

平成 16 年には高等植物であるイネの全塩基配列が解読され、シロイヌナズナと同程度の数の多様なキネシンが存在していることが明らかになった。イネは食料として重要な穀物であり、そのイネの形態形成に密接に関係していると考えられるキネシンを研究することは、ゲノム解読直後であり極めてタイムリーであるばかりでなく、高機能をもつイネの品種改良につながり、社会的そして学術的意義も高いと考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究計画では、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。

3. 研究の方法

(1)ゲノム上に存在する植物特異的キネシンの検索

イネゲノム DNA 上に存在する植物またイネ特有のキネシンの検索を行う。イネのゲノム構造は既に公開されているので、一般的な塩基配列解析ソフト (BLAST, GENETYX) を用いて、既に解析されている動物や線虫のキネシンの塩基配列と比較することにより植物そしてイネに特徴的な配列と予測される特徴的な構造をもつものを見いだす。申請者らの予備的な検索結果では、シロイヌナズナと同程度の数のキネシンが存在していることが明らかになった。当該年度では、良く保存された構造をもつモータードメインの中で、動物

のキネシンと異なる領域を含むものに注目する。申請者の所属する生命情報工学科にはバイオインフォマティクスの専門家グループ (木下研究室) がおり、具体的なゲノム解析に関する適切なアドバイスとコンピューターによる高度な検索環境を提供してもらうことができる。既に詳細な解析は進行しており、機能部位において特徴的な構造を持つイネキネシン K16, N14, O12, D04, L05 を見いだしている。さらに他のイネ特異的キネシンの検索を行い、特有の機能に関係すると考えられる特徴的な配列を解析する。

(2)イネ特異的キネシンのクローニングと発現系の構築

既に塩基配列の解析から見いだされている、モータードメインにイネ特有の構造をもつ、K16, N14, O12, D04, L05 のクローニングと大量発現を行う。これらのキネシンをコードする cDNA プラスミドは、研究協力者である新潟大学農学部・三ツ井敏明教授の協力により、農業生物資源研究所イネゲノムプロジェクトから提供してもらうことが可能である。既に K16, N14, O12, D04, L05 を含む 9 つのキネシンのプラスミドの提供を受けている。申請者がマウス脳キネシンにおいて確立した方法に従い、これらのイネキネシンのモータードメインをコードする DNA を発現ベクターにサブクローニングして、大腸菌を用いて発現する系を確立する。(研究協力者である大学院生 3 名が主体になって、イネ特有のキネシンの発現系の構築を行う。) 既に K16 のモータードメインに関しては、発現系の構築に成功しており、またその他の一部のキネシンにおいても予備的な実験で発現に成功しており、具体的に大量発現系を確立できる可能性が示されている。

(3)生化学的特徴づけ

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い、イネキネシンの生化学的性質を調べて、その他の種のキネシンと比較する。生化学的な実験および motility assay の観察で使用する装置は、申請者の研究室に設置してある機器で対応することができる。研究業績に示したようにイネキネシン K16 モータードメインの性質に関しては、既に解析が終了して研究論文にまとめている。この様に具体的方法は確立しているので、研究計画における他のキネシンに関しても同様に生化学的な解析を行い特徴づけを行っていく。

(4)溶液中での局所的、全体的構造解析

イネキネシンの微小管の結合と ATP 加水分解に伴う機能部位での局所的な構造変化を

捉えるために、目的の部位を特異的にスピン標識したキネシンを調製して、ESR 装置を用いて解析を行なう。測定は ESR の専門家である大阪大学理学部・荒田敏昭助教授の協力により行う。マウス脳キネシンにおいて ESR を用いた共同研究が既に進行しており、イネキネシンの解析を行なうための方法は確立されている。また東大医科研・片山栄作教授の協力により、急速凍結ディープエッチレプリカ電子顕微鏡法により、生理的条件下における構造と nucleotide によって誘導されるキネシンの全体的な構造変化を解析する。申請者は今までに片山教授との共同研究でこの方法を用いてエネルギー変換中のミオシンの構造解析を行なっており、キネシンにも応用できることを示している。

(5) モータードメインの結晶構造解析

生化学的解析により、動物由来のキネシンと異なる性質を示すもので特にアミノ酸配列から特徴的な構造をもつイネキネシンの結晶化と X 線回折結晶構造解析を行う。結晶化とその構造解析は、結晶構造解析の専門家である研究協力者の農業生物資源研究所・藤本瑞博士の協力で実施する。既に、我々はイネに特有と考えられるキネシン K16 の ADP が結合したモータードメインの結晶構造解析に成功しており、マウス脳従来型キネシンには見られない特徴的な局所構造を持っていることを明らかにした。そこで、当該年度においては次のイネキネシンの構造解析を行う予定である。

1. 既に決定した ADP 結合 K16 モータードメイン結晶構造の詳細な構造解析と他キネシンとの比較
2. ADP 非結合 K16 モータードメインの結晶化と構造解析
3. ADP 存在下、非存在下イネキネシン 012 モータードメインの結晶化と構造解析

4. 研究成果

1. ゲノム上に存在するイネ特有のキネシンの検索

イネゲノム DNA 上に存在する植物またイネ特有のキネシンの検索をおこなった。イネのゲノム構造は既に公開されているので、一般的な塩基配列解析ソフト (BLAST, GENETYX) を用いて、既に解析されている動物や線虫のキネシンの塩基配列と比較することによりイネに特徴的な配列と予測される特徴的な構造をもつものを検索した。そして既に性質と構造解析が進行している特徴的な構造を持つイネキネシン K16, N14, 012, D04, L05 の他に、本年度の研究により新たに 10 種類の特徴的な構造をもつイネキネシン K23, E11,

H12, E15, D10, J12, B01, A05, C17, N20 を見いだした。

2. イネ特異的キネシンのクローニングと発現系の構築

見いだされたイネ特有の構造をもつ、K16, N14, 012, D04, L05, K23, E11, H12, E15, B01 のクローニングと発現系の構築を試みた。これらのキネシンをコードする cDNA プラスミドを研究協力者である新潟大学農学部・三ツ井敏明教授の協力により、農業生物資源研究所イネゲノムプロジェクトから提供してもらい、申請者がマウス脳キネシンにおいて確立した方法に従って、発現ベクターにサブクローニングした。そして大腸菌による発現を行った。その結果、K16, N14, 012, D04, L05, E15, K23 の発現が確認された。条件検索を行い大腸菌を用いた大量発現系の構築を行う事ができた。

3. 生化学的特徴づけ

発現に成功したイネキネシンの微小管との相互作用と ATPase の速度論的解析を行った。その結果 012 は微小管が存在しないとき他のキネシンと比較して著しく ATP の結合が遅いことが明らかとなった。また微小管との相互作用も他のキネシンとは異なる結果が得られた。

E15 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。また既に発現系の構築に成功しているイネキネシン K23, N14, L05, D04, についても生化学的特徴付けを行う事ができた。

特に植物に特異的に存在するキネシンイネキネシン 012 について生化学的特徴付けと細胞内での局在化観察を詳細に行った。酵素化学的 ATPase 活性および微小管との親和性は、動物種の従来型キネシンより非常に低いことが示された。アクチンとの相互作用の実験から、CH ドメインにアクチンが結合することにより、ATPase 活性が抑制的に制御される興味深い事実が明らかとされた。さらに、蛍光性タンパク質である GFP と CH ドメインとの融合タンパク質を植物細胞において発現させることにより、アクチンに 012 の CH ドメインが直接結合していることが示された。

植物特異的なイネキネシン K23 の生化学的特徴付けを行った。ATPase 活性は、012 と同様に動物種の従来型キネシンより非常に低いことが示された。面白いことに、微小管との親和性は 012 と異なり従来型キネシンと同程度であることが明らかとされた。K23 の内在性の蛍

光性アミノ酸トリプトファンと蛍光標識ATPアナログとの間の蛍光共鳴エネルギー移動FRETを利用した速度論的解析において、K23は従来型キネシンには見られない特徴的な速度論的特性を持つことが示された。

4. ストップト・フロー装置を用いた速度論的解析

新たに発現することに成功したE15とこれまでに発現に成功しているD04, L05, N14, O12の速度論的解析を蛍光標識ATPアナログNBD-ATPとストップト・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。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。

5. 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。

6. ストップト・フロー装置を用いた速度論的解析

イネキネシンK23, N14, L05, D04, E15の速度論的解析を蛍光標識ATPアナログとストップト・フロー装置を用いて解析を行い、今までに報告されているキネシンと比較を行った。K23はATP結合部位近傍に内在性のTrp残基があり、蛍光標識ATPアナログMant-ATPとの間で極めて効率の良い蛍光エネルギー移動が観察され、速度論的解析に利用できることが示された。また他のキネシンにおいても、この位置にTrpを導入した変異体で効率の良い蛍光エネルギー移動を観察することができた。

7. モータードメインの結晶構造解析

生化学的特徴付けの明らかになったイネキネシンの結晶化を試みた。イネキネシンK16とN14の結晶化に成功した。K16においてはXXÅの解像度でモータードメインのX線結晶構造を解くことができた。面白いことに、MgADP結合状態でエネルギー変換と力発生に重要な役割をしていると考えられるネックリンカーが、他のキネシンと大きく異

なる構造を取っていることが明らかになった。

8. キネシン変異体を用いた構造と酵素化学的性質との関係の解析

イネキネシンK16の特徴的な構造の生化学的性質への影響について遺伝子工学的な手法を用いて調べた。結晶構造上で観察されたK16の特徴的な構造が、イネキネシンK16の酵素化学的特性に大きく反映していることが示された。

独自に開発した新規蛍光性ATPアナログMANTTPを用いてイネキネシンK16の構造的特性を解析した。結晶構造解析から推測された重要と考えられる部位が、イネキネシンK16のユニークな酵素化学的性質を決定していることを示唆された。

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3件)

- 1) “Crystallographic analysis reveals a unique conformation of the ADP-bound novel rice kinesin K16” Tanaka, K., Umeki, N., Mitsui, T., Fujimoto, Z., & Maruta, S. (2010) *Biochem Biophys Res Commun.* 401, 251-256. 査読有
- 2) “Characterization of a novel rice kinesin O12 with a calponin homology domain” Umezu, N., Umeki, N., Mitsui, T., Kondo, K., & Maruta, S. (2011) *Journal of Biochemistry.* 149, 91-101. 査読有
- 3) “Biochemical characterization of the novel rice kinesin K23 and its kinetic study using fluorescence resonance energy transfer between an intrinsic tryptophan residue and a fluorescent ATP analogue” Umezu, N., Hanzawa, N., Yamada, M. D., Kondo, K., & Maruta, S. (2011) *Journal of Biochemistry* 149, 539-550.

[学会発表] (計24件)

- 1) Nozomi Umezu, Nobue Hanzawa, Kazunori Kondo, Toshiaki Mitsui, Shinsaku Maruta “The characterization of the novel rice kinesin K23 at kinesin-7 subfamily” 第83回日本生化学会合同大会、2010年12月8日、神戸
- 2) Nozomi Umezu, Nobue Hanzawa, Kazunori Kondo, Toshiaki Mitsui, Shinsaku Maruta “Kinetic studies on the novel rice kinesin K23 utilizing FRET between the intrinsic tryptophan residue and fluorescent ATP analogue” 第48回日本生物物理学会年会、2010年9月21日、仙台
- 3) Seigo Iwata, Kazunori Kondo, Shinsaku Maruta “Preparation of microtubules derived from plant and its interaction with rice plant kinesin” 第48回日本生物物理学会年会、2010年9月21日、

仙台

4) Umezu, N., Umeki, N., Hanzawa, N., Kondo, K., Mitsui, T., Maruta, S.
“Characterization of the plant-specific rice kinesins” 第55回米国生物物理学会 2011年3月6日 Baltimore, MD USA.

5) Iwata, S., Umezu, N., Kondo, K., Maruta, S.
“Preparation and polymerization of tubulin of ginkgo biloba and its interaction with rice plant kinesin” 第55回米国生物物理学会 2011年3月8日 Baltimore, MD USA.

6) 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

6) 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

8) 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

9) 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.

10) 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.

11) 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、同学会要旨集 p.S101

12) Keiko TANAKA, Toshiaki MITSUI, Zui FUJIMOTO, Shinsaku MARUTA
Analysis of crystal structure of the motor domain of rice kinesin K16 and comparison with the structures of other related kinesin. 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

13) 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

14) 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

15) 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, Abstract : p.67

16) 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, Biophysical Journal Abstracts Issue : p.137a

17) 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, Biophysical Journal Abstracts Issue : p.137a

18) Shinsaku MARUTA, Keiko TANAKA, Yuko 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, Biophysical Journal Abstracts Issue : p.137a

19) 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, Biophysical Journal Abstracts Issue : p.138a

20) 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

21) 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

22) 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

メーシヨソ” 第45回 日本生物物理学学会年
会 平成19年12月22日 横浜

23) 土田雅子、山田正文、吉村栄子、近藤和
典、丸田晋策 “蛍光標識ATPアナログを用い
た新規イネキネシソの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

24) 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
用いたイネキネシソ012の生化学的解析”第
45回 日本生物物理学学会年会 平成19年
12月22日 横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.t.soka.ac.jp/maruta-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸田晋策 (MARUTA SHINSAKU)

研究者番号：40231732

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：