

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770160

研究課題名 (和文) ヘテロ双頭キネシンを用いた二頭間協調性の一分子観察

研究課題名 (英文) Single molecule observations of two heads coordination using hetero dimeric kinesin.

研究代表者

有賀 隆行 (ARIGA TAKAYUKI)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：30452262

研究成果の概要 (和文)：染色体分配に関わるキネシン5と、小胞輸送に関わるキネシン1という二種類の分子モーターを組み合わせた様々な変異体を作成し、その運動と構造の1分子観察を行った。その結果、ネックリンカーと頭部の相互作用を制御することによって必要に応じて運動モードを切り替えているという運動制御メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We made various mutants combining kinesin 5 involved in centrosome separation during mitosis and kinesin 1 involved in vesicular transport, and observed their motility and conformations using single molecule techniques. The results elucidate that the motoric mode of kinesin 5 is switched by regulating the interactions between neck linker and motor head.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：1分子計測・操作

## 1. 研究開始当初の背景

分子モーターは、ATP加水分解反応より得られる化学エネルギーを力学的な仕事へと変換するタンパク質分子機械である。とりわけ、微小管上を一方向に連続的に進むことで小胞を輸送する「キネシン1」と呼ばれる分子については、近年急速に理解が進み、二つの微小管結合部位(頭部)を交互に踏み出していること(Yildiz *Science* 2004)、さらには、その構造状態とヌクレオチド状態との対応関係も明らかになった(図1: Mori *Nature* 2007)。しかし、依然として化学反応から一方向性の運動が生まれる仕組みの完全な理解

にまでは至っていない。

一方で、微小管上ではキネシン1と類似する多種類の分子が運動している。そのひとつである Eg5 (キネシン5) は、双頭の二量体が互いに重なって4量体を形成し、二本の微小管を架橋しながらすべり運動を起こすことで紡錘体を形成することが知られている(Kapitein *Nature* 2005)。最近の一分子計測により、キネシン5はキネシン1同様に微小管上を連続的に運動するが、短い走行距離しかもたないこと (Valentine *Nat. Cell Biol.* 2006)、条件によってATPに依存しない拡散的な運動と連続的な一方向性運動を切り替

えること(Kapitein *JCB* 2008)、またその一方で、単頭のみが実質的に運動に関与しており双頭構造を必要としないノンプロセス(非連続的)な運動機能を持っているとの報告もなされている(Kaseda *EMBO* 2008)。

これらの結果は、キネシン5が拡散的な運動、連続的な一方向性運動(プロセス運動)、あるいは、非連続的な(ノンプロセスな)運動といった複数の運動モードを持ち、しかも、それらは実験条件あるいは生理的な制御機構により切り替えることが可能であるという不可思議な特性を持っていることを示唆している。これは、常に一方向性の運動を続けるキネシン1とは対照的な振る舞いである。しかしながら、キネシン1とキネシン5の頭部はとても似た配列・構造を持っていることが知られている。では一体、そのような運動モードの違いはどのようにして発現するのだろうか？

## 2. 研究の目的

キネシン5とキネシン1による双頭ヘテロダイマーを、最新の1分子計測手法を駆使して詳細に調べることにより、キネシン5の様々な運動モードの特性がどこから現れるのかを明らかにし、連続的な一方向性運動はいかにして生み出されるのか？というエネルギー変換機構の根源に迫る。これにより、キネシン5とキネシン1頭部での一方向性運動を取り出す仕組みの違いを理解するとともに、その双頭間での協調した働きがどのような仕組みで行われているかを分子内部での相互作用のレベルで理解することを目的とした

## 3. 研究の方法

まずキネシン5およびキネシン1の配列を様々な組み合わせたヘテロ双頭キネシンを作成した。次に、1分子蛍光顕微鏡観察を用いて、さまざまなキネシン5/キネシン1変異体の運動観察、および1分子FRET計測を用いた分子内部での構造変化の遷移解析を行った。そして、これらの1分子観察により得られるヘテロ双頭キネシンの特性を、野生型のEg5、キネシンとの違い、あるいは変異体を用いたヘテロ双頭キネシンでの解析結果と比較した。

## 4. 研究成果

まず、1分子FRET観察を用いて、単頭Eg5のネックリンカーの構造状態を調べた。その結果、従来型のキネシン1ではヌクレオチドが結合するとネックリンカードッキング状態をとり、ヌクレオチドフリー状態でネックリンカーは非結合状態を取ることが知られていたが、Eg5ではヌクレオチドフリー状態でもネックリンカーが結合した状態が支配

的であり、従来型キネシンとEg5でATP加水分解過程での構造状態が異なることを明らかにした。(図1)

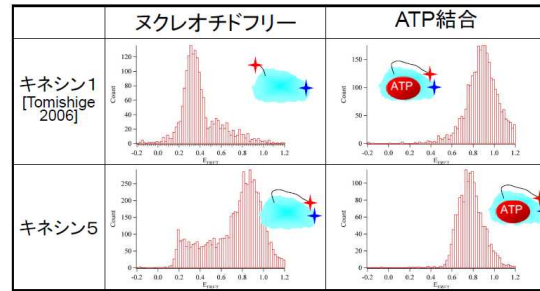


図1:キネシン5のネックリンカー構造の1分子FRET観察。

次に、キネシン5の二量体形成に関わる茎部から二頭間をつなぐネックリンカーまでの残基を様々な長さにわたってキネシン1に置換したキメラタンパク質を作成し、その運動を確かめた。その結果、野生型キネシン5は低塩強度条件下でほとんどが拡散運動を示すのに対して、茎部およびネックリンカーをキネシン1と置換した場合には多くの分子がキネシン1同様の一方向性の運動を示すように運動を変化させた(図2)。この結果はキネシン5の連続的運動能の制御にはネックリンカーと茎部が関わっていることを示唆している。

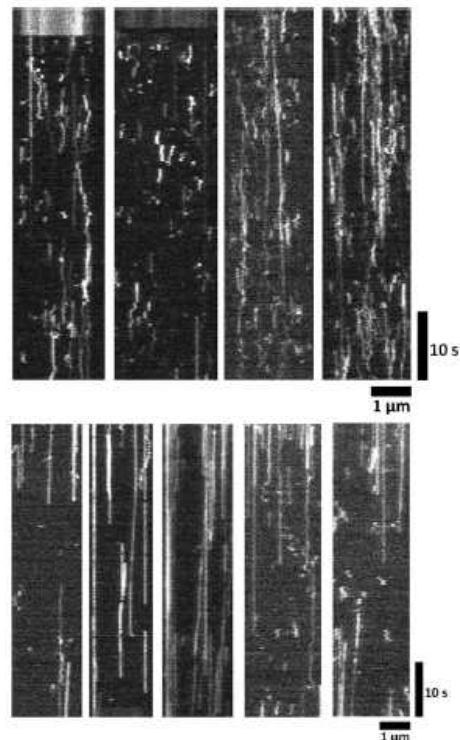


図2:野生型キネシン5の双頭部(上)とネックリンカーをキネシン1と置き換えたキメラキネシン5双頭部(下)の運動

さらに、ネックリンカーをキネシン1のものとして置き換えたもの、および、ネックリンカーの長さや残基に変異を加えたキネシン5のネックリンカーの構造状態を1分子 FRET法により観察したところ、キネシン1同様のネックリンカードッキング構造を示した(図3)。この結果から、キネシン5の連続的運動能は、ネックリンカーと頭部の相互作用により抑制されていると示唆された。

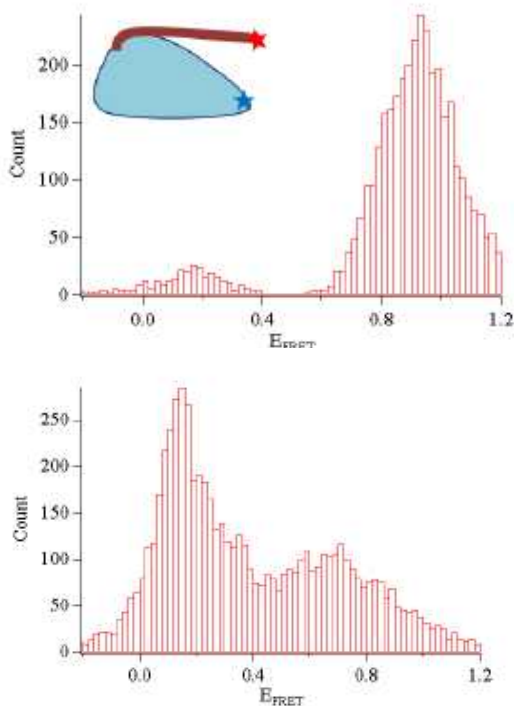


図3: ネックリンカーをキネシン1と置き換えたキメラキネシン5のネックリンカー構造の1分子 FRET 観察。左: 1 mM AMP-PNP 存在下、右: 250 nM ADP 存在下。

これらの結果から、染色体分配に関わるキネシン5が、ネックリンカーと頭部の相互作用を制御することによって必要に応じて運動モードを切り替えているという運動制御メカニズムを明らかにした。

## 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0件)

[学会発表] (計10件)

- ① 有賀隆行、生体分子モーターの分子内協同(協調)作用、細胞システムの動態と論理、2009/4/9、埼玉県・理化学研究所(招待講演)
- ② Takayuki Ariga, Yuuji Fujiyasu, Teppei Mori, Michio Tomishige, Mechanism and force production of a walking molecular motor, Kinesin., International Symposium on Hydration and ATP Energy, 2010/3/8, Akiu, Sendai
- ③ 有賀隆行、藤安雄治、森徹平、富重道雄、ヘテロダイマーキネシンの構造と力発生、細胞システムの動態と論理 II、2010/04/09、和光・理化学研究所
- ④ 水澤仁雅、多田隈尚志、有賀隆行、富重道雄、細胞分裂に関わるキネシン5の構造変化の一分子 FRET 観察、細胞システムの動態と論理 II、2010/04/09、和光・理化学研究所
- ⑤ 有賀隆行、キネシンの内部運動と力発生、第10回蛋白質科学会年会、2010/06/16、札幌コンベンションセンター(招待講演)
- ⑥ 有賀隆行、1分子研究の50年とこれからの50年、生物物理若手の会第50回夏の学校、2010/09/21、愛知県一宮市(招待講演)
- ⑦ Takayuki Ariga, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida, Angle distribution analysis of hybrid F<sub>1</sub>-ATPase indicates another sub-substep rotation between tw0 catalytic dwells., 日本生物物理学会第48回年会、2010/09/20、東北大学・川内北キャンパス
- ⑧ 有賀隆行、分子モーターキネシンの分子内協調作用、理論と実験 研究会、2010/10/08、広島大学大学院理学研究科
- ⑨ 有賀隆行、生体分子モーターキネシンはマックスウェルの悪魔なのか?、基研研究会 2010 非平衡系の物理・非平衡ゆらぎと集団挙動、2010/11/19、京都・湯川記念館パナソニックホール

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有賀隆行 (ARIGA TAKAYUKI)  
東京大学・大学院工学系研究科・助教  
研究者番号：21770160

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：