1I1345

キネシン微小管系を用いた生体ナノマシンの作製

○樋口 秀男, 木津 静恵 (東北大・院工・金属)

細胞のしなやかで巧妙な運動はモータータンパク質の滑走運動や細胞骨格の重合脱重合により引き起こされると考えられている。この運動を人工的に作ることができれば、細胞運動の基本原則を抽出できるかも知れない。そこで我々は、動く部品として微小管上を滑走運動を行うキネシンを基本にして、これに人工的な物質を組み合わせ、生体内で起こっているような動きを再現できる“ナノマシン”の開発を試みた。実験では、411残基からなる双頭キネシンの末端にビオチン (BCCP) を付けた組み替え分子を発現精製し、これをアビジンをコートした直径 $0.2 \mu\text{m}$ の蛍光ポリスチレンビーズに結合させた。ATP 非存在下で、このキネシンビーズに蛍光標識された微小管をまぜ、ビーズ-キネシン-微小管の複合体を作った。これに caged-ATP を加え落射蛍光顕微鏡下で静止時の形態を観察したところ、複合体は十個程度のキネシンビーズに数本ないし数十本の微小管が結合した固まりを形成し、全体の直径が $10 \mu\text{m}$ 程で微小管は細胞骨格を思わせるような網目状の構造をしていた。これに紫外線を照射して ATP を光遊離させた後の複合体の運動を観察を行った結果、運動の基本は3種類に大別された。それらは、1. 全体が広がる微小管がはずれて行く進展運動、2. 微小管とビーズが同一方向に縮む収縮運動、3. 微小管が曲がり払いのけるような屈曲運動、であった。ここで、進展運動と収縮運動が生じた原因は、様々な方向を向いた微小管間を挟んでいるビーズ上のキネシンが微小管を同一あるいは反対方向に滑らせるために生じたと考えられる。また屈曲運動は微小管の滑り速度の異なる間でずれが起こり、微小管が曲げられたため生じたと考えられる。キネシンの微小管上を並進運動するだけの単純な運動機能で様々な運動を発現できる可能性が示された。

H. Higuchi, S. Kizu : Nano-machine made of molecular motors of kinesin and microtubules

1I1415

キネシン様タンパク質—微小管複合体の構造研究

○広瀬 恵子¹、秋葉 俊彦¹、Endow Sharyn²、Alonso Maria³、Cross Robert³、Amos Linda⁴ (¹工技院・融合研、²Duke Univ.、³Marie Curie Inst.、⁴MRC-LMB)

キネシンファミリーに属するモータータンパク質は、ATP加水分解のエネルギーを利用して微小管上を定められた方向に運動するが、その運動方向、速度、processivity等の性質には様々なものがあることが知られている。キネシン、および逆方向に運動するNcd分子については、その微小管に結合したときの立体構造が、低温電子顕微鏡法およびコンピューター三次元再構成法によってこれまでにかなり詳しく研究されている。この結果、キネシンとNcdの双頭分子では、2つの頭部の位置関係に、運動方向の差に関連すると思われる相違があること、異なるヌクレオチドの存在下での構造変化がキネシンとNcdで異なっていることがわかった。キネシンは微小管上を長距離にわたって processive に運動するのに対し、Ncdはほとんど processive でないと考えられている。上記のような構造の差異が、分子モーターのどのような機能に関連しているのかを調べるためには、性質の異なる様々なキネシン様タンパク質の構造を比較することが重要である。本研究ではまず、キネシンと同様プラス端方向に運動するが processivity はほとんどないキネシン様タンパク質 Eg5 を用い、その微小管との複合体の立体構造を、AMP-PNP 存在下およびヌクレオチド非存在下で研究した。双頭Eg5分子の微小管に結合していない方の頭部は、AMP-PNP 存在下でキネシンと似た位置にあったが、ヌクレオチド非存在下での構造は、キネシンともNcdとも異なっていた。さらに我々は、Ncdと同じくマイナス端方向に運動するキネシン様タンパク質であるKar3についても、微小管との複合体の立体構造を研究した。Kar3についてはモータードメインの結晶構造も発表されており、Kar3-微小管複合体の構造変化を、結晶構造と対応づけて考察したい。

K. Hirose, T. Akiba, S. Endow, M. Alonso, R.A. Cross, L.A. Amos : Structural studies of kinesin-related proteins complexed to microtubules

1I1400

変性過程におけるキネシン分子モーターの機能変化

○角田 世治¹、樋口 秀男^{1,2} (¹東北大・院工・金属、²東北大・学際)

タンパク質は加熱などにより変性し機能を失うが、その変性過程や変性の中間状態というものに関しては不明瞭なところが多い。我々はこのような問題を解明するために、キネシンの運動機能が熱変性の過程でどのように失われていくのかを観察した。予備実験として様々な温度でのキネシンの運動速度を調べた。カバーガラス上に牛脳から精製した天然キネシンを固着させ、その上に蛍光ラベルした微小管を流し込み、落射蛍光顕微鏡下でサンプルの温度制御を行いながら、微小管の運動を観察し、キネシンの運動特性を間接的に測定した。この実験から、キネシンの運動速度は -4°C から 45°C の範囲で温度と共に指数関数的に増加し、アレニウスプロットを行うと 6°C を境に二つの直線で近似できた。さらに温度を上げると微小管がキネシンから解離する現象が観察され、これはキネシンの変性によるものと考えられる。この変性過程の詳細を調べるために、一度高温に保温したキネシンの運動機能の変化を室温で調べた。 37°C 、 50°C および 70°C に保温し、そのすべての温度において、保温時間とともに、1. 運動速度が低下する、2. 微小管と結合して動かない、3. 微小管方向に1次元的にブラウン運動をする、4. 微小管と結合しない状態へと変化した。高温ほど、これら状態変化の進行が速かった。これらのことは、キネシンの熱による変性過程は温度によらず似た経路をたどり、その中間にはいくつかの準安定状態が存在することをも示唆している。

S.Kakuta and H.Higuchi : Changes on motility of kinesin in the process of denaturation

1I1430

ネック領域のクロスリンクがキネシン分子の連続的運動性に与える影響

○富重 道雄, Ronald D. Vale (HHMI・UCSF)

キネシンは、微小管上を $1 \mu\text{m}$ 以上もの距離を連続的に移動することができる、processiveなモータータンパク質である。最近我々の研究室では、キネシンのネックリンカー部位(323-336残基)がATP依存的な構造変化を行っていることを明らかにした(Rice et al., 1999)。この部位の構造変化によってダイマーの連続的運動の機構を説明することが可能である(Vale and Milligan, 2000)。一方、ネックコイルドコイル(337-370残基)が部分的にほぐれることが、キネシン双頭が同時にチューブリンに結合するのに必要であるというモデルがMandelkowらにより提案されている。これらのモデルを検証するために、我々は、ネックコイルドコイル/リンカー部位にシステイン残基を導入した3種類のコンストラクトを作成し、特定の領域をジスルフィド結合により安定化(固定)した。そして、クロスリンクが運動性に与える影響を、全反射顕微鏡を用いた一分子運動観察法を用いて調べた。還元状態ではすべてのコンストラクトは野生型と同じ運動速度、移動距離を示した。ネックコイルドコイルを根元(337残基)でクロスリンクすると、移動距離が40%減少したが、運動速度は影響を受けなかった。一方、ネックリンカーを根元(334残基)でクロスリンクするとほとんど動かなくなり、ランダムな一次元拡散運動のみを示した。ネックリンカーを真ん中(330残基)でクロスリンクした場合には、プラス端へバイアスのかかった拡散運動を示した。これらの結果は、方向性を生み出すにはネックリンカーの部分的な構造変化で十分であるが、連続的運動にはネックリンカー全体の構造変化が必要であること、また、連続的な運動にはネックリンカーの構造変化で十分であり、ネックコイルドコイルの構造変化は必要ないこと、を示唆する。

M. Tomishige and R. D. Vale : Crosslinking of the kinesin neck region: effect on processive movement along microtubules