3P141

モータータンパク質のstalk領域のcoiled-coil形成能の評価

○森井 尚之¹、伊藤 三恵^{2,3}、清水 隆¹、田之倉 優² (¹産業技術総研・分子細胞、²東大院・農学生命、³(現) 国立国際医療センター研・医療生恵)

kinesin スーパーファミリーのタンパク質である ncd と kinesin について、その立体構造や変異体の運動特性の解析から、両者の微小管上の運動方向の違いが2量体形成した時の全体構造の違いに関係していると考えられている。他にもモータードメインとカーゴドメインをつなぐ stalk 領域は、おそらく全体的な運動特性に関与していると思われるが、その構造的な力学特性についての知見は充分ではない。ここでは主に ncd を対象に、stalk 領域のフラグメントを合成し、熱力学的安定性を調べた。ncd の一連の46残基のフラグメント：(232-277)、(242-287)、(253-298)、(274-319)、(284-329)、(295-340)、(305-350) は1mM 以下の濃度においてはいずれもヘリックス性は低いものであった。そこで、フラグメント末端に coiled-coil 性を向上させる変異を持つ [S331L,R335L]-(278-346) を合成して調べたところ、このフラグメント全域が coiled-coil を形成し、熱変性実験では単一ドメインであることが明らかとなった。一方、[H286L,H293L]-(222-297) では、熱転移は3状態転移で、Asn251 付近で熱力学的に独立なドメインに隔てられていることが推定された。同様に coiled-coil 性を誘起する変異を加えた配列により、各種モータータンパク質の stalk 領域の coiled-coil 性の評価を行い、N 端モーターと C 端モーターを比較した。

H. Morii, M. Ito, T. Shimizu, and M. Tanokura : Evaluation of the propensity for coiled-coil formation of stalk regions in motor proteins

3P143

熱変性過程におけるキネシン単一分子が示す4つの運動特性

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

タンパク質は変性過程で準安定な中間状態(モルテングロビュール状態)をとると考えられている。この中間状態においては多くの二次構造がほどけているので、一般にこの状態ではタンパク質は機能を持たないと考えられている。本研究で用いる双頭構造のキネシンは、ATP 加水分解、微小管結合、力発生などの多機能を有しているが、これら全ての機能は変性過程において一度に失われるのか、それとも、段階的に失われるのであろうか?これを調べるために熱処理されたキネシン単一分子の運動特性の変化を調べた。キネシンを高温37℃に長時間保温(0~200時間)した後、室温に戻してからビーズに結合した。そのビーズをレーザートラップにより微小管に作用させ、キネシン1分子の機能を調べた。キネシンは保温時間とともに4種類の運動特性を示した。(1) 0~20時間の保温では速度~500nm/s、力~6pNという正常な運動を示した。(2) 20~50時間の保温では速度~160nm/s、力~2pNに減少した。(3) 50~100時間の保温ではキネシンは運動しないが微小管に結合・解離をくり返した。(4) Δe100時間の保温ではキネシンは微小管に作用しなかった。これらの運動特性は、双頭キネシン内の単頭が独立に3つの運動機能変化[正常な運動(N)、運動しないが微小管に結合(I)、微小管に結合しない(D)]を起こすことで説明できる。すなわち、上記の運動特性を示す単頭の組み合わせはそれぞれ(1) N-N、(2) N-I、(3) I-IまたはD-I、(4) D-Dとなる。これにより、キネシンが熱変性過程で機能を持った準安定状態をとり、単頭だけでも正常な機能を持てば運動は可能であることが示唆された。

S.Kakuta and H.Higuchi : Nanometry of motility of single kinesin molecules in the process of denaturation

3P142

キネシン・ADP・フッ化金属複合体の形成と性質

○渋谷 英香、楠原 實子、徳武 由里子、近藤 和典、木村 尚博、丸田 晋策(創価大・工・生物学)

ATP 駆動型分子モーターの機能ドメインで起こるエネルギー変換に伴う構造変化を連続的に捉えることは、ATPase サイクルの中間体の寿命が短いことから極めて困難である。しかし、我々は新しいタイプのリン酸アナログであるフッ化金属(AlF₄⁻, BeFn, ScFn, GaFn)が Mg-ADP 存在下で安定なミオシン・Mg-ADP・フッ化金属複合体を形成し、ATPase サイクルにおいて異なるステップを示していることを示した。本研究では、キネシン・ADP・フッ化金属複合体を形成させ、微小管との相互作用から、ミオシンと同様に、これらの複合体がキネシン ATPase サイクルにおいて、異なるステップを示すか検討した。マウス脳キネシンのモータードメイン(1-340)をコードする cDNA を調製し pET15b ベクターに導入して、それらを E.coli (DE3) にトランスフォームを行い、IPTG で誘導発現させた。そして N 末に His-tag をもつキネシンを Ni キレートカラムを用いて精製した。蛍光標識した ADP 誘導体、NBD-ADP を用いてキネシン・NBD-ADP・フッ化金属複合体の形成をモニターした。そして過剰の ATP を加えて追い出される NBD-ADP の速度を蛍光の減少からモニターした。また、微小管存在下でも同様の実験を行った。さらに複合体と微小管との結合を超遠心による共沈殿により調べた。これらの結果から各複合体は、キネシン ATPase サイクルにおいて異なるステップを示す可能性が示唆された。さらにこれらの複合体の構造の違いを示すために、キネシン ATP 結合部位近傍に特異的に存在する Loop L5 内にある Leu100 または Leu105 を Trp に置換したキネシンを調製して、各複合体における Trp と Mant-ADP との間のエネルギー移動を測定した。

H. Shibuya, H. Kusuhaara, Y. Tokutake, K. Kondo, N. Kimura, S. Maruta : Formation of kinesin-ADP-Fluorometal complexes and their characterization

3P144

キネシン歩行運動特性の温度依存性

○奈良 郁子²、上村 想太郎²、藤原 郁子¹、石渡 信一^{1,2} (¹早大・理工・物理、²生命理工)

キネシンは、ATP の加水分解によって生じる化学エネルギーを力学的エネルギーに変換し、微小管上を一端から+端方向へ向かって processive な運動をするモータータンパク質である。キネシンの ATP 分解酵素活性・移動速度は、一般に温度の上昇に伴って高くなることが知られているが、本研究ではキネシンの運動機能とそのメカニズムを知るためのアプローチとして、特にキネシンの processivity (1分子のキネシンでも微小管上を解離することなく平均1μm 程度連続して運動する性質) に与える温度の影響に注目し、1分子のキネシンが微小管に結合してから解離するまでの時間(duration)と、その間に微小管上を移動した距離(run length)、移動速度を測定する実験をセルの温度を変化させて行った。 蛍光ポリスチレンビーズに牛脳から抽出・精製したキネシンを吸着させ、1mM ATP を含む溶液中においてビーズに結合したキネシンがブラウン運動によって微小管と結合し、微小管上を運動する様子をエヴァネッセント蛍光顕微鏡を用いて観察した。微小管と相互作用するキネシンが1分子であることは、確率的手法を用いて推定した。 26℃と32℃で検討した結果、run length、duration ともにほぼ指数分布をしていたが、平均の run length は温度の上昇に伴って長くなった。これは、キネシンの各ステップでの微小管からの解離が起こる確率が、高温ほど小さいことを示しており、微小管との結合状態を安定化するために疎水相互作用が重要であることを示唆している。一方、平均の duration は温度の上昇に伴って短くなる傾向にあった。現在これらの性質を広い温度領域で検討中である。これらの温度依存性は、細胞内輸送を行うというキネシンの生理的機能の上でも重要な意味を持っていると考えられる。

I.Nara, S.Uemura, I.Fujiwara and S.Ishiwata : Temperature dependence of kinesin processivity