1O1115

蛍光プローブ IAANS によるキネシンモータードメインの標識

○山田 正文、瀧内 望、多田 博子、丸田 晋策（創価大・工・生物学）

エネルギー変換過程を反映すると考えられるキネシンモータードメインでの構造変化を捉えるために、モータードメインに存在するシステイン残基を特異的に蛍光プローブで標識することを試みた。キネシンモータードメイン (1-340aa) と SH 基特異的蛍光標識試薬 2-(4-(Iodoacetamido)Anilino) Naphtalene-6-Sufonic acid (IAANS) を反応させ、IAANS のキネシンへの結合を濃度依存性とタイムコースで調べた。キネシンに対して数倍過剰の IAANS で標識は飽和に達し、モータードメイン あたり約 2-3 の IAANS が結合した。IAANS 標識キネシンの蛍光スペクトルは nucleotide の結合により大きく変化した。ADP 存在下で標識を行うと IAANS の結合が半分に減少することがわかった。これらのことから、nucleotide の結合により環境が変化する部位のシステイン残基が標識されていると考えられる。IAANS で標識したキネシンをババインで限定消化すると、7つのシステイン残基をもつ 40kDa のモータードメインは 38kDa と 8kDa の 2つの断片に切断された。IAANS の蛍光は N 末を含む 38kDa に存在していることから、この断片に存在する 4つのシステイン (Cys 8, 14, 66, 169) のいずれかに IAANS が結合していると思われる。現在、IAANS 標識キネシンをリジルエンドペプチダーゼで消化して得られた蛍光標識断片を HPLC で精製を行い、構造解析を行い標識部位の同定を行っている。予備的な実験では Cys 66 を含む蛍光標識断片を確認した。また ADP 存在下でも同様の解析を行っている。

M.Yamada, N.Takiuchi, H.Tada and S.Maruta : Labeling of kinesin motor domain by fluorescent probe IAANS

1O1145

ルースカップリングを実現する力学的メカニズム

○中川 尚子¹、金子 邦彦² (¹ 茨大理、² 東大院総合)

モータータンパク質の1分子計測から、ATPの加水分解反応とタンパク質によるエネルギー変換が必ずしも1対1ではないことが示され、ルースカップリング的な変換メカニズムの具体化が必要になってきている。ルースカップリング型の変換メカニズムとしては熱ラチェットモデルが知られているが、このモデルは定常的にエネルギーが流入している際の統計的問題(効率など)を議論するためのものである。一方で、1分子の1回の変換反応の観測結果からは、ATP反応後にエネルギーが十分長い時間タンパク質に蓄積され得ることが示されている。その後にかかるエネルギー変換は、タンパク質の自律的ダイナミクスによって起こっているはずである。そこで我々は、1回のエネルギー変換に際する変化に着目してダイナミクスの立場にたったモデルを作成し、そこでのエネルギー変換(インプットエネルギーから方向性運動への変換)のあり方を詳しく調べた。モデルではダイナミクスによってルースなエネルギー変換が実現され、その際にはエネルギー流がうまく調節されていることがわかった。変換が起こるには要素間に相関を持った運動が実現される必要があるが、それまでの間エネルギーが散逸されずに局所に留まること、変換に際してエネルギーが散逸されることなどがルースで状況変化に強い(ロバストな)エネルギー変換を実現していることを報告する。

N.Nakagawa and K.Kaneko : Dynamical Mechanism for Loose Coupling

1O1130

ESRによるキネシン機能ドメインの運動性解析

○菅田 和法、楠原 寛子、中村 志芳、荒田 敏昭（阪大院・理・生物科学）

ESR（電子スピン共鳴）はマイクロ波領域における分光学的手法のひとつであり、スピンラベルの運動・配向を極めて容易かつ高精度で検出することができる。我々は、大腸菌系で発現・精製した単頭および双頭キネシンのさまざまな機能領域にマレイミド系スピンラベルを導入し、スクレオチドの効果や微小管相互作用にともなう影響を、溶液中におけるスピン運動性の計測から解析した。単頭キネシンの微小管結合ループのひとつL12にスピンラベルを導入したところ、AMPPNPやADPなどのスクレオチドに依存せず、微小管との相互作用にともない側鎖スピンラベル運動性の制限された成分（回転相関時間ナノ秒オーダーからミリ秒オーダーまたは運動角で約120度から約30度）が見られた。この制限成分は、微小管に対するキネシン分子の結合密度が高いほど増大した。この結果からキネシンとチューブリンの相互作用の情報は、微小管上を伝播する可能性が示唆され、もしその伝播に方向性が存在するならば、分子モーターの運動方向の決定機構を担うものと考えられる。また、双頭キネシンのstalk部のCoiled-coil領域にスピンラベルを導入した結果、比較的自由なスピン運動性（回転相関時間約0.8 ns）を示し、その運動性は微小管やスクレオチドに依らず一定であった。この結果は、ATPの化学的エネルギーを用いた力発生はstalk部では起こらず、Coiled-coilの解裂なども起こさないことが示唆される。Valeらは単頭キネシンのネックリンカーは、微小管結合時においてスクレオチド依存的にorder-to-disorderの遷移を起こし、キネシンの力発生を担っていると報告している(Nature 402,778-84(1999))。現在、我々は双頭キネシンのネックリンカーへのスピン導入を進めており、その結果がネックリンカーの役割についてさらなる知見を与えると期待している。

K.Sugata, H.Kusuhara, M.Nakamura and T.Arata : ESR Studies on the Mobility of the Functional Domain of Kinesin

1O1330

高速 AFM による微小管上のキネシン 1 分子の観察

○古田 健也¹、内藤 康行²、古寺 哲幸²、豊島 陽子¹、安藤 敏夫² (¹ 東大院・総合文化・生命、² 金沢大院・理・物理)

我々はタンパク質の構造変化を捉えるために、高速 AFM（原子間力顕微鏡）の開発を行ってきた。前年度、最高 80 msec/frame を実現したことを報告した。本研究では、高速 AFM を微小管・キネシンの系に應用して、微小管上を運動するキネシン分子の観察を目指している。

我々は、（1）微小管のみの観察、（2）AMP-PNP 存在下で微小管に結合したキネシンの観察、（3）ATP 存在下でのキネシンの高速連続スキャン、を計画した。AFM はナノメーターオーダーの凹凸情報を感知するため、微小管・キネシンを観察するに当たり、微小管として構成されていないチューブリンや大きなゴミなどを基板にできるだけ吸着しない、かつ、頻度良く微小管を観察できる条件を見出す必要があった。我々は最適な基板・最適な溶液濃度条件を摸索しながら、計画（1）微小管の観察、（2）微小管上のキネシンの観察に成功した。しかし、（3）の連続スキャンを行うと微小管が壊れてしまうということが起こってしまった。これは、タッピングモードによる走査でタンパク質に大きな力がかかってしまうことが原因で、チューブリン分子同士の結合が破断してしまったのではないかと考えた。そこでタッピングによる力を軽減させる装置の開発を行った。

現在、AFM に含まれる諸々のデバイスを改良しながら、高速スキャンによってキネシン分子の運動を捉えることを試みている。本年会では、実際に高速 AFM を用いたタンパク質のスキャン画像を紹介する予定である。

K.Furuta, Y.Naito, N.Kodera, Y.Y.Toyoshima, T.Ando : Imaging single kinesin molecules on microtubules using a high-speed atomic force microscope(AFM)