B449

線虫 *C.elegans* の生化学的解析とマウスキネシンの比較

○中山 義久、近藤 和典、丸田 晋策（創価大院・工学研究科）

キネシンは分子モーターの一つで、ATPの化学的エネルギーを力学的エネルギーに変換することにより、微小管に沿って運動し、細胞内での物質輸送や、細胞分裂時の紡錘体の形成・維持、神経系での軸索流など様々な働きをする。線虫のキネシン遺伝子は、ホモロジーサーチにより、約20個見いだされていて、そのうちいくつかの遺伝子については対応するmutantが分離されており、その生物学的機能が推測できる。本研究では主として生化学的性質を調べることを目的とし、他種のキネシンとの性質の違いや共通性を明らかにしていく。現在までに、線虫キネシンをコードする3種のcDNAをPCR法により調製した:klp-3 (full-length), unc-116 (motor domain:MD), k11d9.1 (full-length) (それぞれC-terminal motor, Kinesin Heavy Chain, MCAK/KIF2サブファミリーに属する)。そのうちunc-116MDキネシンは発現させ、精製し、生化学的実験としてATPase活性測定、共沈実験、NBD-ATPを用いた実験を行った。以前のマウスキネシンによる実験結果と比較すると、*C.elegans* キネシン unc-116MDは、ATPaseサイクルにおける中間体の構造が異なること、ATP結合部位の構造が異なること、ATP結合のアフィニティーが高いことが示唆された。現在、全長unc-116をsmall scaleでタンパクを発現させ、解析中である。今後 *in vitro* motility assay 等の実験を行っていく予定である。

Y.Nakayama, K.Kondo, S.Maruta : Biochemical analysis of *C.elegans* kinesin and comparative study with mouse kinesin

B451

分子モーターキネシンの特徴的ループ L5 の役割

○多田 博子、伊達 俊子、近藤 和典、丸田 晋策（創価大・工・生物学）

ATP駆動型分子モーターであるキネシンのモータードメインには幾つかの特徴的なループが存在している。活性部位の近傍に存在するループL5もその一つで、変異を導入するとATPase活性が変化することが分かっている。また一般的に微小管上を＋端に走るキネシンのL5は一端に走るタイプのものより長いことが知られており、このループは方向性の決定に関係していることが考えられる。本研究ではマウス脳キネシン（＋端方向性）のL5を長くしたものと短く切り詰めた2種類の変異体を調整して、その酵素的性質と微小管上の走行方向性を調べることを試みた。本来のL5（GKLHDPQLM）を切り詰めたGPQL(P-kinesin)と一残基のばしたGTKLHDPQLM(T-kinesin)をコードするキネシンモータードメインcDNAを調整しpET15bベクターに導入した。これらをE.coli BL21(DE3)にトランスフォームしてIPTGで誘導発現させたあと、Niキレートカラムを用いてこれらを精製した。得られた変異体を用いてATPase活性を測定したところ、T-kinesinは、WTと同じような値を示したが、P-kinesinでは活性が極端に低くなった。また、*in vitro* motility assay法により微小管上の走行速度を測定すると、WTと比較してT-kinesinは3倍速度が速くなったが、P-kinesinは運動性を失っていた。現在、極性をつけた微小管を調整中で、今後それを用いて*in vitro* motility assayを行い、方向性を決定していく。

H.Tada, T.Date, K.Kondo, S.Maruta : Role of the unique loop L5 in the motor domain of kinesin

B450

モーター機能のスイッチをもつキネシンをデザインする。

○小西 薫¹、上田 太郎²、久保 泰¹（¹産総研・脳神経情報、²産総研・ジーンファンクション）

細胞内には、「動く」蛋白質が存在する。ミオシンやキネシン、ATP合成酵素などが代表的な例で、これらは分子モーターと呼ばれる世界最小の駆動素子である。この駆動素子に何らかの機能部品を連結すれば、ナノサイズの機能モーターシステムを作ることが可能である。しかし、これらの生体分子を野生型のままシステムへ組み込むだけでは意図したように機能させることは難しい。システム内の他の部品と協調して働くように、制御装置等を付加する必要がある。我々はナノアクチュエータとしてキネシン分子モーターに注目しているが、この分子のモーター機能を制御する扱いやすい化学的スイッチは知られていない。そこで、ヒト従来型キネシン分子モーターにCa²⁺感受性のスイッチを付加することを試みた。M13ペプチドはウサギ骨格筋ミオシン軽鎖キナーゼ由来のカルモジュリン(CaM)結合ペプチドで、Ca²⁺存在下でのみCaMと結合する。そこで、M13ペプチドのアミノ酸配列をキネシンの微小管結合部位の一つであるLoop12へ遺伝子工学的手法を用いて挿入し、Ca²⁺ + CaM存在下では微小管との相互作用が阻害されることが期待される変異キネシンを作製した。野生型キネシンは、EGTA → Ca²⁺ + CaM → EGTA → Ca²⁺ + CaM → EGTAと溶液条件を変えても*in vitro*で微小管を動かす速度（約0.6 μm/sec）に変化は見られなかった。これに対して、スイッチをもつ変異キネシンの場合は、EGTA存在下では約0.1 μm/secで動いていた微小管がCa²⁺ + CaMを加えると完全に停止した。さらにEGTAを添加しCa²⁺をキレートすると素早く動きが回復した。このサイクルはもう一度繰り返すことができた。このように、創製したキネシンのモーター機能はCa²⁺によって可逆的にスイッチされることが確認された。

K.Konishi, T.Q.P.Uyeda, T.Kubo : Design a switch for kinesin to control motor activity.

B452

キネシンの結合頻度はチューブリンC末端の負電荷で増加する

○香月 美穂¹、内村 誠一^{1,2}、箕浦 逸史¹、仁川 純一²、武藤 悦子¹（¹理研・BSI、²九州工大・生化学システム）

我々はこれまでに、ATP存在下キネシンが微小管上を運動する際、その結合が協同的に起きていることを明らかにした（本会第34回年会）。この結果からキネシンの結合に伴ってその近傍数μmの範囲で、微小管のキネシンに対する親和性が増加するような状態変化が起きていることが示唆された。我々は、この状態変化において表面電荷のふるまいが重要なのではないかと考え、電荷分布を変えた酵母変異微小管を用いて運動の解析を行っている。

チューブリン分子のC末端は、酸性アミノ酸を多く含むため、微小管表面の電荷分布に大きく影響していると考えられる。そこで今回我々は、αチューブリンのC末端部に存在する4つのグルタミン酸残基の数を増/減した変異微小管を作製した。これらの微小管を用いてキネシンの1分子motility assayを行ったところ、グルタミン酸残基の増加に伴って、キネシンの微小管への結合頻度は著しく上昇し、一方、速度や歩行距離への影響は小さかった。

この結果は、負電荷の増加によりキネシン-微小管間の静電的相互作用が増強された結果と考えることもできるが、あるいはもう1つの可能性として、負電荷の増加によって、微小管の周りに発生するある種の「場」が強められた結果とも考えられる。我々は、キネシンの微小管への協同的結合で見られた親和性の変化と、今回見られた結合頻度の増加は同一の現象を反映しているのではないかと考え、「場」の発生の可能性を考えている。現在その真偽を検討するため、より詳細な解析を進行中である。

M. Katsuki, S. Uchimura, I. Minoura, J. Nikawa and E. Muto : The negatively charged C-terminal of tubulin affects the binding rate of kinesin.