3P173

キネシンヘテロダイマーの運動速度と、キネシン頭部の速い結合解離による「ホッピング」

○今福 泰浩¹、トーマス ニール²、太和田 勝久¹ (¹ 九大院・理・生物、² 英国バーミンガム大・物理)

キネシンのプロセッシブ運動における2つの頭部の寄与を明らかにするために、加世田らは、キネシン頭部のチューブリン結合ループに変異を含んだ変異体ホモダイマーおよびヘテロダイマーを作成し、それらの運動を解析した。そして、ヘテロダイマー単分子の運動速度と最大張力は、いずれも野生型と変異体ホモダイマーの間であることを示した (*PNAS USA* 99, 16058, 2002)。

チューブリン結合ループに変異がある頭部は微小管から解離しやすいと考えられる。私たちはこの点に着目し、ATP 分解を伴わない速い結合解離の繰り返しによってキネシン頭部が微小管上の結合サイトを移動する現象 (これを「ホッピング」と呼ぶ) を理論的に解析した。この解析から、ホッピングは流体摩擦に似た性質を持ち、ホッピングによる運動速度は負荷に比例することがわかった。

私たちは、以前に発表したキネシン単分子運動のモデル (*Proc. Roy. Soc. Lond. B* 269, 2363-2371, 2002.) を、ホッピングを含むように拡張した。この拡張モデルによって、変異体ホモダイマーの速度張力関係を説明できた。さらに、野生型と変異体ホモダイマーの実験結果を解析することによって、ヘテロダイマーの速度張力関係を予想することもできた。この予想は加世田らの実験結果とよく合致した。また、変異体におけるホッピングによって逆方向ステップが高負荷条件において、特に頻繁に起きることもわかった。

Y. Imafuku, N. Thomas and K. Tawada : Force-velocity relationships of heterodimeric kinesins: 'hopping' by rapid detachment and re-attachment of head.

3P175

unc104 キネーシンのコイルドコイル領域の二量化解析

○清水 洋輔^{1,2}、森井 尚之² (¹ 筑波大・数理物質、² 産総研・生物機能)

マウス KIF1A と相同の線虫 Unc104 はキネーシンファミリーに属する分子モーターであり、1584 アミノ酸残基よりなるポリペプチド鎖のN末の約 350 アミノ酸残基がモータードメインを形成する。これに続く領域には、 α -Helical Coiled Coil 形成が予想される60~90残基のアミノ酸配列があるが、Unc104/KIF1A は溶液中では単量体であると報告されている。Okada (1) らは、KIF1A は単量体でプロセッシブに運動すると報告し、その機構について仮説を提唱している。一方、Coiled Coil 領域に変異を入れて二量体形成能を高めた Unc104 では二量体を形成してプロセッシブに運動するとの報告がある (2)。

我々は Unc104/KIF1A の Coiled Coil 形成領域の二量化能を明らかにすることが重要と考え、この領域に対し、森井ら (3) による熱力学パラメータを用いる方法で Coiled Coil 形成能を予測した。これに従い、Q350 から E441 の範囲で18種類のペプチドセグメントを合成・精製し、CD測定をしたところ、N354 - E388 で α -Helix 形成に特徴的なCDスペクトルが得られた。その濃度依存性から、二量体の解離定数は1 μ M 程度と推定されたが、これはキネーシンにおける対応セグメントの値 (60 nM) にくらべてかなり大きく、二量化能が弱いことを示唆する。この結果は、溶液中の Unc104/KIF1A は通常の濃度では単量体であるが、局所的に高濃度になれば二量化することを示唆する。プロセッシブな運動はやはり二量化によるものかもしれない。なお、超遠心法による二量化の確認、熱や尿素による二量体解離の検討などは現在進行中である。

(1) Y. Okada et al. (2003) *Nature* 424, 574; (2) M. Tomishige et al. (2002) *Science* 297, 2263; (3) H. Morii et al. (1997) *Biochemistry* 36, 1933

Y. Shimizu & H. Morii : Dimerization of putative coiled-coil stalk region of unc104 kinesin

3P174

Kinesin thick filament を横切る微小管の滑り運動；速度の角度非依存性

○田場 登志希¹、枝松 正樹²、豊島 陽子²、鳥羽 葉²、山田 章³、今福 泰浩¹、太和田 勝久¹ (¹ 九大院・理・生物、² 東大院・総合文化・生命、³ 情報通信研・関西・生体物性)

分子モーターの *in vitro* motility assay では、繊維を形成しない分子モーターはランダムにガラスの上に結合している。複数個の分子モーター間の協同性を検証する揺らぎ解析をする際に、分子モーターの向きがランダムだと、解析結果の解釈が困難になる場合がある (Y. Imafuku et al. *Biophysical Journal*, 70, (1996), 878-886)。そこで複数個の分子モーター間の協同性を解析することを目的に、kinesin の向きがそろった直線状の運動系、kinesin thick filament を作成した。二枚貝の筋肉繊維には catchin と呼ばれる、myosin 遺伝子から選択的スプライシングにより翻訳される myosin rod 様のタンパク質がある。catchin は互いに重なり長さ30~50 μ m の bipolar な filament を形成する。この catchin filament に大腸菌内で発現・精製してきた kinesin head-myosin rod キメラタンパク質を共重合させることによって kinesin thick filament を作成した。昨年の年会で微小管は kinesin thick filament 上を滑り運動することができ、filament の端から中心に向かう運動、それとは180度逆の中心から端に向かう運動どちらも同じ速度であることを報告した。本年度では filament を横切る運動を解析したのでそれを報告する。kinesin thick filament 上を横切る微小管の滑り運動速度は、微小管と filament とのなす角度に依存せず一定の速度であった。このことは kinesin の neck が柔らかいことを示している。

T. Taba, M. Edamatsu, Y. Y. Toyoshima, S. Toba, A. Yamada, Y. Imafuku and K. Tawada : The speed of microtubules moving along and across kinesin filaments is independent of angles between microtubules and kinesin filaments

3P176

歩行中のキネシン分子内部での構造変化の一分子観察

○富重 道雄¹、Nico Stuurman²、Ronald D. Vale² (¹ 東大院・工学系・物理工学、² UCSF・HHMI)

キネシンは一分子で微小管上を連続的に運動することのできる processive なモータータンパク質である。キネシンは二つの頭部を交互に動かすことによって微小管の上を歩くようにして運動すると考えられている。しかしその運動の仕組みの詳細、つまりどのような構造変化によって歩行運動が引き起こされるのか、についてはまだ明らかにされていない。Rice ら (*Nature* 1999) はキネシンの頭部とコイルドコイルをつなぐネックリンカーと呼ばれる15アミノ酸残基からなる部位がATP依存的に構造変化 (dock 状態と undock 状態) を行うことを示した。そしてその結果をもとに、ネックリンカーの構造変化が繰り返されることによってキネシンが微小管のプラス方向に歩行するというモデルを提案した。我々はこのモデルを直接検証するために、運動中のキネシンのネックリンカーの構造変化を一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法を用いて検出した。キネシンのネックリンカーの前後に2つの反応性のシステインを導入し、このシステイン残基をドナーとアクセプターの蛍光色素 (Cy3 と Cy5) で標識した。このキネシンをAMPPNP存在下で微小管に固定し、ネックリンカーの静止構造を観察したところ、dock 状態と undock 状態に相当する2つのFRET効率成分が観察された。さらに1 μ M 程度のATP濃度下でキネシンをゆっくり運動させると、FRET 効率は dock 状態と undock 状態を交互に繰り返し、およそ一回のFRET 効率変化に対して8 nm ずつ運動する様子が観察された。これらの結果は、ネックリンカーの構造変化がキネシンの連続的歩行を引き起こす要因であるというモデルを裏付けるものである。

M. Tomishige, N. Stuurman and R. D. Vale : Observation of conformational changes of kinesin walking along microtubules using single molecule FRET technique