3P177

チューブリン Helix12 はキネシンの運動にどのように関与しているか？

○内村 誠^{1,2}、香月 美穂¹、川口 友彰^{1,3}、臼井 健郎⁴、長田 裕之⁴、武藤 悦子¹ (¹ 理研・BSI、² 九工大・情報工、³ 長岡技大・生物系、⁴ 理研・抗生物質)

キネシン-微小管複合体の構造解析の結果によると、キネシンは、 α -tubulin の helix(H)11-12 loop、 β -tubulin の H12 から C 末端にまたがった領域で相互作用していることが示唆されている。しかし、これらのそれぞれの部位が、実際にキネシンの運動にどのように関わっているか、C 末端以外の部位についてはこれまでほとんど情報が得られていない。今回、我々は、出芽酵母を用いて、H12 の荷電アミノ酸について変異解析を行ったので、その結果を報告する。

α 、 β それぞれの H12 について、荷電アミノ酸を逆の電荷に置換したところ (D, E $\rightarrow$ K, R $\rightarrow$ E)、 β -tubulin H12 のみならず、 α -tubulin H12 でも致死となるものがあった。これらの変異サイトは、キネシンのインターフェイスと予想される側に集中し (下図黒丸)、H12 内でもキネシンと対面しない位置にある荷電アミノ酸では、変異の影響は見られなかった。そこで現在さらに、インターフェイス側に存在する非荷電アミノ酸を荷電アミノ酸に置換することで電荷を増加させ、これらの変異がキネシンの運動に与える影響を 1 分子 motility assay 系を用いて解析している。

S. Uchimura, M. Katsuki, T. Kawaguchi, T. Usui, H. Osada and E. Muto : How are the helix 12 in α - and β -tubulin subunit involved in kinesin motility?

3P179

キネシンファミリー分子モーター Kar3 と微小管の複合体の立体構造研究

○広瀬 恵子¹、秋丸 恵理佳¹、Endow Sharyn²、Amos Linda³ (¹ 産総研・GFRC、² デューク大、³ MRC・LMB)

Kar3 は、C 末側にモータードメインをもつキネシンファミリー分子モーターであり、微小管のマイナス端に向かう運動能に加え、ATP 存在下で微小管のマイナス端を脱重合することが報告されている (Endow et al., 1994)。我々は、低温電子顕微鏡法とコンピューター三次元再構成法をもちいて、Kar3 の単頭コンストラクトを結合した微小管の立体構造を、異なるヌクレオチド状態 (ADP 存在下、AMPPNP 存在下、およびヌクレオチド非存在下) で比較している。立体構造は 15 本のプロトフィラメントからなる微小管をもちい、らせん対称性を利用して計算した。得られた立体構造に、Kar3、 α チューブリン、 β チューブリンの結晶構造をフィッティングしたところ、Switch I 領域、Switch II 領域、Loop L7 と L8 を含む領域にヌクレオチドに依存した構造変化が見られた。まず、ヘリックス α 4 (Switch II helix) の N 末付近の density は、ADP および AMPNP 状態で低かった。 α 4 は現在までに報告されている様々なキネシンファミリー分子の結晶構造で長さが異なるが、我々の結果は微小管結合によっても α 4 の長さが変わることを示唆する。また、 α 4 の C 末側の density は、ヌクレオチド非存在下で低く、 α 4 に続く L12 と微小管の結合様式が ADP release にともなって大きく変化することが示された。さらに、Loop L7 に対応する部分はヌクレオチド非存在下で微小管に近づいていた。微小管部分の構造は、Kar3 の有無やヌクレオチドに関わらず結晶構造とよく一致したが、Kar3 を結合した微小管では、 α チューブリンに対して β チューブリンが、プロトフィラメントを外側に反らせる方向に傾いていた。この構造変化は、Kar3 の微小管脱重合能と関係するのではないかと考えられる。

K.Hirose, E.Akimaru, S.Endow and L.Amos : Nucleotide-dependent structural changes of microtubules complexed with Kar3

3P178

スピンラベル ESR によるキネシンダイマーの 2 つのネックリンカー変位の検出

菅田 和法¹、楠原 寛子¹、中村 志芳¹、植木 正二¹、Fajer Peter G.²、○荒田 敏昭¹ (¹ 阪大院・理・生物科学、² フロリダ州立大)

われわれはスピンラベル ESR を用いてキネシンダイマーのコンフォメーションを調べている。モータードメインに硬く固定したスピンラベル (MSL) の回転相関時間はその分子量の球体から予想される値に比べて、小さく回転が速いことがわかった。この結果は、2 つのモータードメインがかなり独立に動くことを示しており、ミオシン分子と似た性質を持つことがわかった。ダイマーキネシンのネックリンカー部分の Cys332 をスピンラベルし、キネシンを微小管に結合させて、側鎖スピンラベルの運動性を ESR 測定した。ヌクレオチド状態 (no nucleotide, AMPPNP, ADP) によらず、mobile (60%) と immobile (40%) が共存し存在比は一定であった。モノマーにしたキネシンではヌクレオチド依存的に比が大きく変わり、ネックリンカーが zipper-like に動いて、側鎖スピンラベルの立体障害が変化するという模型を支持するのと対称的であった。ダイマーによる結果は、ネックリンカーが微小管やモーターコアに固定されながらキネシンが動くか、2 つのネックリンカーの zipper-like motion が、同時に同じ状態へ動かないで、交互にコアから解離-結合する cooperative な機械的模型が考えられた。次に、ネックリンカーの cys332 間の距離 (歩幅) をスピンスピン相互作用 ESR 法で測定した。微小管非存在下では ESR スペクトルの broadening は起こらず、距離は 2.0nm 以上と推定された。微小管に結合したキネシンでは、スペクトルは broadening を起こし 1.5 - 2.0nm の距離分布で fit でき、ネックリンカー間距離にはいくつかの準安定位置があるらしい。no nucleotide では 1.85nm を主として広い分布を持ち、AMPPNP, ATP γ S では 1.5nm を主とし狭い分布を持った。これらの結果から、キネシンダイマーの 2 つのネックリンカー間距離 (歩幅) が実際にヌクレオチドで変化することが ESR 距離測定で証明され、歩行模型が支持された。

K.Sugata, H.Kusuhara, M.Nakamura, S.Ueki, P.G.Fajer and T.Arata : Distance change between the two neck-linkers of dimeric kinesin as detected by spin-labeling dipolar ESR

3P180

高等植物イネキネシンに存在する特徴的ループの構造変化の解析

○梅本 伸久¹、中山 義久²、大堀 美智子²、山田 正文²、近藤 和典²、三ツ井 敏明¹、丸田 晋策² (¹ 新潟大院・自然科学、² 創価大院・工・生物学)

キネシンは、ATP 加水分解時の化学的エネルギーを利用して微小管上を運動する分子モーターである。キネシンには幾つの特徴的なループが存在していて、ATP 結合部位近傍に存在するループ 5 (L5) もそのうちの一つである。以前我々は、マウスキネシンの L5 に蛍光性アミノ酸 Trp を導入して、その蛍光測定から、L5 が ATP 加水分解中に大きく構造変化をおこすことを示しており、エネルギー変換に重要な部位であることが示唆された。本研究では、高等植物イネキネシンにおいても存在する L5 が、同様にエネルギー変換に重要な役割を担っているかを明らかにするために、蛍光プローブを用いて解析を行った。まず、イネキネシン遺伝子を PCR で増幅し、cDNA を調製し、これを大腸菌の系で発現させる事に成功した。ATPase 活性、微小管との相互作用を調べ、動物由来のキネシンと比較した。そして、イネキネシンの L5 に Cys を導入して、L5 を特異的に標識する蛍光プローブの検索をおこない、その蛍光測定を行った。また蛍光標識した ATP アナログである、Dansyl-ATP (DNS-ATP) 及び Diethylaminocoumarin-ATP (DEAC-ATP) を合成して、ATP アナログとしての基質の性質を野生型イネキネシンで調べた。今後、蛍光標識した L5 と蛍光標識 ATP アナログとの蛍光エネルギー移動をもちいて、ATP 加水分解にともなうイネキネシンの L5 の構造変化を解析する予定である。

N.Umeki, Y.Nakayama, M.Ohori, M.Yamada, K.Kondo, T.Mitsui, S.Maruta : Analysis of Conformational Changes in the Unique loop L5 of Rice Knesin