

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

高速一分子観察を用いた分子モーターキネシンの協調的運動の研究

氏 名 松崎 興平

キネシン-1(以下キネシンと呼ぶ)はATP加水分解エネルギーを利用して細胞内で微小管上を連続的に運動し、物質輸送を行うモータータンパク質である。キネシンは二量体で機能し、2つのモータードメインが交互に微小管に結合・解離し、互いを飛び越えながら歩くように運動することが知られている。最近の研究により、運動中のキネシンでは後ろの頭部が先に解離し、また解離した頭部は高い確率で前方に結合することで効率的な二足歩行を行っていることが明らかになった[Isojima, *Nat.chem.biol.*, 2016]が、その仕組みはまだわかっていない。本研究では様々な変異体キネシンの運動を高速一分子観察することでキネシンが効率的に二足歩行を行う仕組みを明らかにすることを目指した。

#### 1)前足の解離を抑制するメカニズム

キネシンが両足結合状態にあるとき、後ろの頭部が10 ms程度で解離し、それまで前の頭部の解離は抑制されている。キネシンの2つの頭部は全く同一の構造を持つため、キネシンの頭部には自らの位置を認識し、前頭部の状態にあるときは解離しにくく、後ろ頭部の状態にあるときは解離しやすくする何らかの仕組みが存在すると考えられる。前頭部と後ろ頭部における状態の違いをもたらすものとして頭部同士をつなぐネックリンカーの重要性が示唆されており、ネックリンカーを切除した単頭キネシンやネックリンカーを後ろ向きに固定した単頭キネシンではATP加水分解と微小管からの解離が顕著に遅くなることが明らかになっている [Ling, 博士論文,

2012],[Niitani, 博士論文, 2015]。これらの結果から、ATP加水分解にはネックリンカーと頭部の相互作用が不可欠であり前頭部ではネックリンカーが後ろを向いているために加水分解が抑制され微小管からの解離が抑制されていることが示唆されるが、前頭部の解離速度がどの程度遅くなっているのかは明らかになっていない。

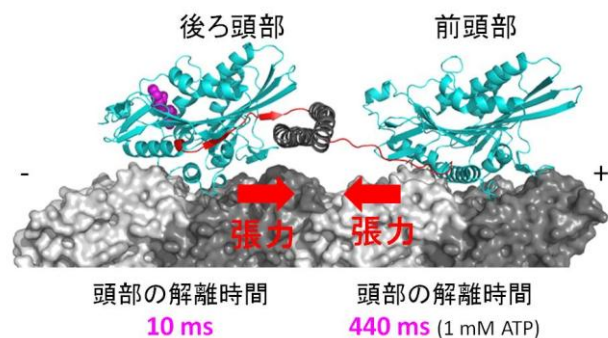


図 1 前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られており、解離速度が遅い。

そこで私は微小管からの解離速度が非常に遅いE236A変異体頭部を一方の頭部に導入したヘテロダイマーキネシンを用いて、前頭部の解離速度の計測を行った。過去の研究からE236AヘテロダイマーではE236A頭部が後ろで野生型頭部が前である両足結合状態が支配的であることが明らかになっているため[Niitani, 博士論文, 2015]、E236Aヘテロダイマーを用いることで後ろ頭部の解離を抑え前頭部の解離を待つことができる。E236Aヘテロダイマーの野生型頭部の運動を全反射型暗視野顕微鏡を用いて55 μsの時間分解能で観察した結果、前頭部の解離には440 msの時間がかかり、後ろ頭部よりも数10倍遅くなっていることが明らかになった。また、E236Aヘテロダイマーのネックリンカーを伸長し頭部間の張力を緩和したところ前頭部の解離にかかる時間は160 msと伸長前の1/3程度になった。この結果はキネシンの前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られることで頭部との相互作用が阻害され解離が抑制されているとする説を裏付けるものである。

## 2) 浮いた頭部の前方への選択的結合メカニズム

これまでの研究から、キネシンの後ろ頭部が解離したあと、片足が浮いた状態のままもう一方の頭部へのATP結合を待ち、ATP結合後2 ms程度で前方の結合部位へ結合することが明らかになっている[Mori, *Nature*, 2007], [Isojima, *Nat.chem.biol.*, 2016]が、浮いた頭部が前方に選択的に結合する仕組みはまだわかっていない。キネシンのネックリンカーはATP結合前はランダムな構造を取っているが、頭部にATPが結合すると頭部と相互作用したドッキング状態を取ることが知られているが、片足が浮いた状態で微小管に結合した頭部へのネックリンカードッキングが推進力となり、浮いた頭部の拡散運動が前方へシフトすることで浮いた頭部の前方への結合が促進されるという考え方がこれまで広く受け入れられてきた(Biased diffusionモデル)。

一方、我々の研究室で明らかになったヌクレオチドフリー状態での頭部の結晶構造から新たなモデルが提唱された。ヌクレオチドフリー状態ではネックリンカーの付け根の前に立体障害が生じるため、浮いた頭部が後ろの結合部位にアクセスしADPを解離するためには、ネックリンカーが立体障害を迂回しながら前を向き引き伸ばされた状態になる必要があるためにADP解離が阻害されると考えられる。一方、前方の結合部位でADPを解離する場合にはネックリンカーの張力は比較的小さいためADP解離は阻害されない。このモデルをBiased bindingモデルと呼ぶ。

本研究ではこれら2つのメカニズムのどちらがキネシンの選択的前方ステップに重要であるか明らかにすることを目指した。しかし、野生型のキネシンでは2つの頭部が対称な構造をしているため、どちらが選択的結合に重要であるか明らかにすることが困難である。そこで私はタンデムキネシンと名付けられた変異体のキネシンの高速一分子観察を行うことにした。タンデムキネシンは2つの頭部がDNA配列上でタンデムにつながった構造をしており、Biased diffusionメカニズムのみによってステップすると考えられる頭部(C末端側頭部:C-head)とBiased bindingメカニズムのみによってステップすると考えられる頭部(N末端側頭部:N-head)が交互にステップを繰り返しながら連続的に歩行すると考えられる

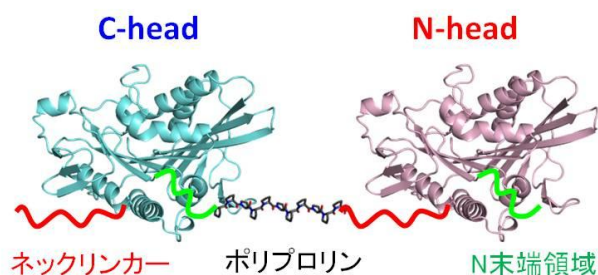


図 2.タンデムキネシンの構造

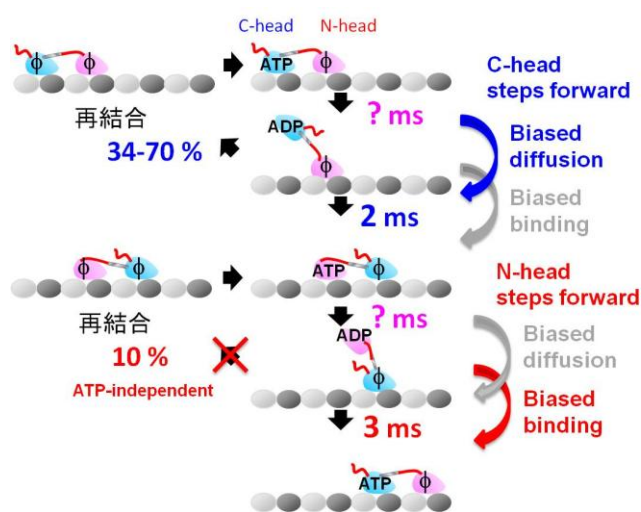


図 3.タンデムキネシンの運動サイクル

[Isojima, 博士論文, 2013]。それぞれの頭部を金コロイド粒子で標識し、全反

射暗視野顕微鏡で観察した結果、C-headでは浮いた頭部が元いた位置へ再結合の様子が頻繁に見られ、その確率は5  $\mu\text{M}$  ATPで70%、1 mM ATPで34%であった。一方N-headでは再結合の確率はATP濃度によらず10%程度に抑えられていたが、浮いた頭部が前方ステップするまでの時間はATP濃度によらず3 ms程度と野生型のキネシンのATP結合後のステップと同じ程度であった。これらの結果からBiased diffusionモデルでは浮いた頭部の選択的結合を説明できず、Biased bindingメカニズムのみで選択的結合を説明できることが示唆された。

### 3)浮いた頭部の微小管への結合を制御する仕組み

ATP結合後の野生型キネシンやタンデムキネシンにおいて浮いた頭部がATPステップするまでにかかる時間は2,3 ms程度であった。これは、頭部が拡散運動によって前方の結合部位へアクセスするためにかかる時間(数10  $\mu\text{s}$ 程度)よりも長いため、頭部が解離後微小管に再結合するためには何らかのアロステリックな構造変化が起きる必要があることが示唆される。しかし二量体の運動観察ではもう一方の頭部の構造変化による影響があるため、浮いた頭部の構造変化の影響を調べるのが困難である。

そこで私はキネシンの頭部およびネックリンカーをコイルドコイルを介してE236A変異体頭部に接続した変異体、アンカーモノマーを用いた。E236A変異体頭部は微小管から解離しにく

いためアンカーモノマーを用いると野生型の単頭キネシンを微小管上に係留することができ、同一の頭部が解離してから再び微小管に結合するまでにかかる時間を繰り返し測定することができる。ATP存在下における野生型頭部の結合解離を高速一分子観察した結果、浮いた状態の持続時間は3 ms程度であり、野生型のキネシン二量体やタンデムキネシンの場合と一致した。この結果から、頭部は解離してからすぐに微小管に結合することはできず何らかのアロステリックな構造変化を要するとする説が支持された。

続いて低濃度のADP存在下で頭部の浮いた状態の持続時間を測定したところ1 ms程度とATP条件下よりも短い時間で再び結合することが明らかになった。これは、ATP加水分解後リン酸を解離し微小管から解離した頭部とADP条件下でADPが結合し微小管から解離した頭部では構造状態が異なることを示唆するものである。一方、ネックリンカーのドッキング状態を安定化させることが知られている硫酸イオンをADP条件下に添加したところ、浮いた状態の持続時間が2 ms程度に伸びた。これらの結果から、ATP加水分解後微小管から解離した頭部ではネックリンカーがドッキングしており、そこからドッキングの解除を伴う頭部の構造変化がなされることで微小管に結合できるようになるというモデルを提唱する。

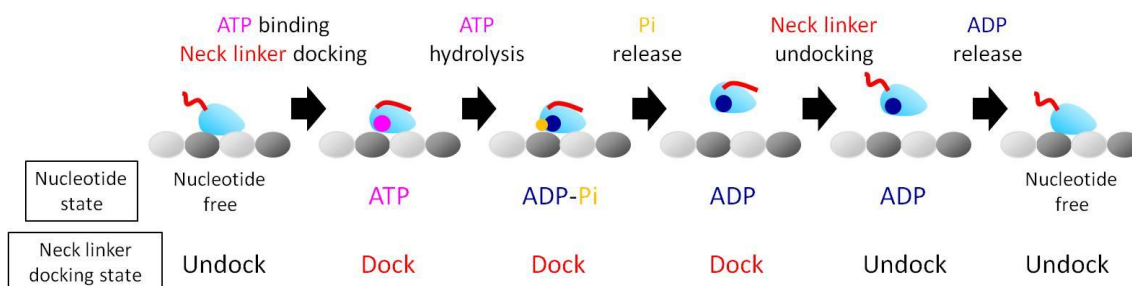


図 4.キネシンモノマーの加水分解サイクル

本研究の成果を以下にまとめる

- 1)キネシンの前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られることで解離が遅くなることを明らかにした。
- 2)タンデムキネシンを用いて、浮いた頭部の前方ステップを説明する2つのモデルを検証し、キネシンの選択的前方ステップにはBiased diffusionメカニズムは必須ではなくBiased bindingメカニズムだけで十分であることを示した。
- 3)係留したキネシン頭部の微小管への結合解離を観察することで、リン酸を解離し微小管から解離した頭部ではネックリンカーがドッキングしており、そこからドッキングの解除を伴う構造変化をすることで微小管と結合できるようになるという説を提唱した。