

高等植物におけるキネシン  
関連遺伝子ファミリーの研究

三井 久幸

①

高等植物におけるキネシン関連遺伝子ファミリーの研究  
Studies on the kinesin-related gene family of higher plants

東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻  
平成二年度博士課程進学 三井 久幸

指導教官 高橋 秀夫

## 目次

### 序 章

1. 微小管モーター蛋白質 キネシン	1
2. キネシン・スーパーファミリー	5
3. 高等植物の微小管	7
4. 本研究のねらい	8
第一章 シロイヌナズナにおけるキネシン関連遺伝子ファミリーの同定	11
1. 材料と方法	11
2. 結果	14
3. 考察	18
第二章 シロイヌナズナのキネシン関連遺伝子 cDNA のクローン化	21
1. 材料と方法	21
2. 結果	23
3. 考察	29
第三章 K a t 蛋白質のアミノ酸配列の解析	31
1. 結果	
1) K a t 蛋白質と他の蛋白質とのアミノ酸配列との比較	34
2) K a t 蛋白質の二次構造予測	35
2. 考察	38
第四章 K a t 蛋白質の活性の検出	40
1. 材料と方法	40
2. 結果	43
3. 考察	48
第五章 植物細胞からの K a t 蛋白質の検出	50
1. 材料と方法	50
2. 結果	
1) 抗 k a t 蛋白質抗体の調製	56
2) 植物細胞成分中の K a t 蛋白質の検出	56
3. 考察	58
第六章 細胞周期に伴う K a t B/C 蛋白質質量変化の観察	61
1. 材料と方法	61
2. 結果	62
3. 考察	63
第七章 総合討論	66
謝辞	69
参考文献	70



## 序 章

### 1. 微小管モーター蛋白質 キネシン

微小管は、繊毛・鞭毛の軸糸として、また紡錘体の構成要素として、細胞運動や染色体の分配に関与している。更に、分泌・エンドサイトーシス・軸索輸送といったような膜小胞やオルガネラの輸送系にも関与している。このように多くの細胞（内）運動の基礎をなしており、それを駆動する因子の研究がなされてきた。微小管上で動力を発生する因子は微小管モーター蛋白質 microtubule motor protein と呼ばれるが、そのうち以前から知られていたダイニン dynein は繊毛・鞭毛運動に関与するものである（軸糸ダイニン）<sup>1)</sup>。それに対して、細胞質中の微小管依存型の運動を駆動する因子は不明のままであったが、近年、一連の微小管モーター蛋白質が細胞質中から発見された。それらは、キネシン kinesin、細胞質ダイニン cytoplasmic dynein、ダイナミン dynamin と呼ばれる蛋白質である<sup>2) 3) 4)</sup>。キネシンは 110~140kD の重鎖 2 個と 60~80kD の軽鎖 2 個とから構成され、微小管上をプラス端方向へ運動する。細胞質ダイニンは約 500kD の重鎖 2 個とその他 14~120kD の数種のサブユニットから構成されている複雑な巨大分子であり、軸糸ダイニンと同形の細胞質因子と考えられている。キネシンとは逆に微小管上をマイナス端方向へ運動する。ダイナミンは 100kD の単一のポリペプチドからなる。微小管同士を架橋する性質を持ち、キネシンやダイニンのように明確な動力発生能は確認されていないが、微小管モーター蛋白質に特徴的な性質を有しているので、その一種とされている。

微小管モーター蛋白質の運動能は、顕微鏡で直接観察することが可能である<sup>5)</sup>。蛋白質をビーズの表面に付着させてそのビーズを ATP 存在下微小管上で輸送させたり、あるいは蛋白質をカバーガラスに付着させておき、そこに微小管と ATP とを加えて微小管を輸送させ、観察する。キネシンやダイニンはそのようなアッセイによってモ

ーター蛋白質と確認されたものである。更に、微小管モーター蛋白質に共通の性質<sup>6)</sup>として、ATPの非存在下で微小管に安定に結合しそれがATPの添加によって解かれるといったような、ATP感受性の微小管との結合能を有することが挙げられる。また、微小管の添加によってATP加水分解の速度が上昇する。これと同様の現象はアクチンフィラメントとミオシンの系でも知られており、これらの性質はATPの化学エネルギーの運動エネルギーへの変換に寄与していると考えられる。以下にキネシンに関する知見をまとめる。

キネシンは、最初イカの神経組織において微小管依存型の膜小胞輸送系を駆動する因子の探索の結果分離された<sup>2)</sup>。この研究に先立って、イカの神経軸索漿に加水分解されないATPのアナログであるAMP-PNPを添加すると、膜小胞が微小管上に付着した状態で輸送が止まる現象が観察されていた<sup>7)</sup>。ミオシンや軸糸ダイニンがAMP-PNPの存在下でアクチンフィラメントや微小管に安定に結合する性質を有することが知られており、このことから、輸送されている小胞には同様の動力を発生するモーター蛋白質が付着していることが推測された。そこで、AMP-PNPの添加によって微小管との結合が引き起こされるという性質を用いて、そのモーター蛋白質の分離が試みられた。イカの視葉抽出物中で微小管をタキソールを用いて重合させ、ATP存在下で微小管を遠心分離によって除くと、微小管とともに多くのMAPs (microtubule associated proteins) が溶液中から除かれるが、ATPに感受性の微小管結合能を有する蛋白質は溶液中にとどまる。そこにタキソールを用いて重合させた微小管をAMP-PNPとともに添加すると、目的の蛋白質が特異的に微小管に結合し、更にATPの添加によってそこからその蛋白質を遊離させる。この様な手法にゲル濾過及び hydroxylapatite カラムクロマトグラフィーを組み合わせることによって、110kDのポリペプチド (重鎖) とそれに付随した 65kD 及び 70kD のポリペプチド (軽鎖) が精製された。この蛋白質はATPの存在下ラテックス・ビーズを微小管上



で一方に輸送する性質を有することが観察され、その速度は  $0.3 \sim 0.5 \mu\text{m/sec}$  と測定された。そこでこの蛋白質は細胞質由来の微小管モーター蛋白質と判断され、キネシンと命名されるに至った。更に、キネシンを付着させたビーズを単離中心体から重合させた微小管に加える実験では、ビーズが中心体から離れる方向に輸送されるのが観察されたので、キネシンは微小管のプラス方向へ運動し、軸索中では anterograde の輸送（細胞体から軸索の末端方向への輸送）に関与していると判断された<sup>8)</sup>。その後、同様の蛋白質はウシの脳<sup>9)</sup>、ウニ卵<sup>10)</sup>、ショウジョウバエ<sup>11)</sup>、動物の組織・細胞<sup>12) 13) 14)</sup> 等様々な生物・細胞から見つかった。

キネシン精製の最初の報告では、ATPase 活性は検出されなかった。しかし、inorganic triphosphate (AMP PNP と同様にキネシンの微小管への結合を促す) を用いて精製されたウシ脳キネシンからは、微弱な ATPase 活性 ( $0.06 \sim 0.08 \mu\text{mol/min/mg}$ ) が検出され、更にその活性は微小管の存在によって急激に上昇する ( $2.1 \mu\text{mol/min/mg}$  at  $1.1\text{mg/ml tubulin}$ ) ことが観察された<sup>9)</sup>。後に AMP PNP を用いて精製されたウシ脳キネシンからも類似の ATPase 活性の上昇が見られた。ただし、活性上昇の程度は異なっていた ( $0.31 \mu\text{mol/min/mg}$  at  $1\text{mg/ml tubulin}$ )<sup>15)</sup>。その違いの理由は不明である。

キネシンの精製においては、110kD の重鎖とともに 62kD の軽鎖が得られ、その量比は 1 : 1 である。また、その複合体の分子量は 379000 ~ 386000 と報告されているので、キネシンは重鎖 2 個と軽鎖 2 個とからなる四量体であると考えられている<sup>16) 17)</sup>。

精製したキネシン分子の電子顕微鏡観察によると、細長く伸展した構造 (80nm) が中央に存在し、その一端に 2 個の球状の「頭部」構造 ( $9 \times 10\text{nm}$ ) が連結している<sup>18) 19) 20)</sup>。この頭部構造が動力を発生するドメイン (モータードメイン) と考えられている。この頭部ドメインを含む 45kD のペプチドは ATP 感受性の微小管結合能及び微小管によって上昇する ATPase 活性を有することが報告されている<sup>20)</sup>

<sup>21) 22)</sup>。一方、伸展構造の他端には扇形の「尾部」構造が連結している。軽鎖に対する抗体はこの尾部に結合するので、軽鎖は「尾部」に位置していると考えられている<sup>19)</sup>。

キネシン重鎖のアミノ酸配列は、ショウジョウバエのcDNAの塩基配列から明らかとなった<sup>23) 24)</sup>。それに基づいて行った二次構造予測によると、N末端側で50kDの球状ドメインを形成することが示され、その中にはATP結合部位のコンセンサス配列が含まれていた。一方、C末端側では10~15kDの球状ドメインを形成することが示された。更にそれらの中間の領域は、 $\alpha$ ヘリックスをとることが高く予測され、しかも疎水性アミノ酸が7残基ごとに出現するといったような、coiled coil構造をとるのに特徴的な配列であることが示された。キネシン重鎖の一部分のみをin vitroで発現して得られたポリペプチドの実験から、N端領域がATP感受性の微小管結合能を有していることが示された。

キネシンの細胞内での機能に関する研究は、蛋白質の構造や酵素学的な性質に関する研究に比べて遅れていた。キネシンはオルガネラ・膜小胞等の輸送に関与しているという予想からそのような構造体との結合が考えられるが、実際は可溶画分に検出され、構造体の画分では検出されなかった。また、精製したキネシンをオルガネラ・膜小胞等の画分と組み合わせても輸送系を再現することはできなかった<sup>2)</sup>。しかし、KI処理したオルガネラ・膜小胞に全軸索漿可溶画分を添加することによって実現される輸送系から、抗キネシン抗体を用いてキネシンを吸着・除去すると輸送活性が失われることから、キネシンがその輸送系に関与していることが強く示唆された<sup>25)</sup>。ただし、精製したキネシンのみではその失われた活性を回復することができないので、キネシン以外の因子の関与を示している。

一方、免疫細胞化学的手法も行われている。抗キネシン抗体によって培養細胞やイカの軸索漿を染色すると、オルガネラ・膜小胞等を示すようなパターンが得られ、それらの輸送に関与していることがここでも示唆される<sup>26) 27)</sup>。また、小胞体のネッ



トワークが形成されているような細胞では、それに沿ったようなパターンが観察されており、ネットワーク形成にも関与していると思われる<sup>14)</sup>。

## 2. キネシン・スーパーファミリー

細胞中には微小管を基礎とした多種多様な運動が見られる。そこで、それぞれの運動において、微小管モーター蛋白質が適切な時期に目的の構造体を選んで輸送する仕組みが問題となる。その解答として、細胞は複数の種類のモーター蛋白質を持ち、それぞれが別々の現象に関与していると考えられている。そのようなモーター蛋白質は、共通の動力発生ドメインに、それぞれが輸送する構造体と相互作用するための各々に特有のドメインが連結したような構造を有していると予想される。この2、3年の間にキネシンに関してそのような蛋白質の存在が主に分子遺伝学的な解析によって発見され、キネシン・スーパーファミリーの存在が提唱された。すなわち、共通のモータードメインに各々に固有の尾部ドメインが連結したような構造を有する蛋白質（キネシン関連蛋白質 *kinesin-related protein*）から構成されるスーパーファミリーである。以下、既知のキネシン関連遺伝子・蛋白質を挙げる。

カビ（*Aspergillus nidulans*）の *bimC4* 変異では有糸分裂に際してスピンドルポールボディー（SPB）の分離が阻害されるために紡錘体が異常となり、核分裂が正常に進行しない。その野生型遺伝子 *bimC* はキネシン重鎖のモータードメインと高い相同性を示す配列を有していた<sup>28)</sup>。分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）の *cut7*<sup>+</sup> 遺伝子もキネシン関連遺伝子であり、その変異は同様の紡錘体形成異常を引き起こす<sup>29)</sup>。また、その遺伝子産物は分裂期のSPBや紡錘体微小管に局在していることが示された<sup>30)</sup>。

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）の *KAR3* 遺伝子は、接合時の核の融合に必須であり、その発現は $\alpha$ ファクターによって強く誘導される。また、その変異株の解析か



ら、細胞分裂にも関与していることが示唆されている<sup>31)</sup>。同じく酵母からクローン化された *CIN8* 及び *KIP1* 遺伝子は両方とも紡錘体の形成に関与している<sup>32) 33)</sup>。それらの遺伝子単独の変異は表現型に現われず、二重変異のみ細胞分裂に影響が現われるので、*CIN8* と *KIP1* とは同一の機能を持ちお互いの変異を相補することができると考えられている。

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のゲノムDNAライブラリー及び cDNA ライブラリーから PCR によってキネシン・モータードメインに相同な DNA 配列を増幅し、それを多糸染色体とハイブリダイズさせたところ、30カ所以上の部位が検出された<sup>34)</sup>。実際、キネシン重鎖以外にもキネシン関連遺伝子が知られている。*claret* 領域の遺伝子<sup>35) 36)</sup> は、胚発生初期の細胞分裂とメスの減数分裂における染色体の分離に必要である。この変異は染色体の不分離とそれに伴う染色体の欠損を引き起こす。*nod* 遺伝子は減数分裂の第一分裂において第四染色体など nonexchange chromosome の分離 (distributive segregation) に必要であり、その変異はそれらの染色体の欠損を引き起こす<sup>37)</sup>。また、*nod* 遺伝子は成虫ではメスでのみ発現が見られるが (distributive segregation 系はメスにのみ存在する)、発生・成長の段階では分裂細胞一般に発現が見られるので、体細胞分裂にも関与していることが示唆されている。一方、キネシン重鎖遺伝子の変異 (*khc*) は幼虫・蛹・成虫の神経系に影響し死に至るが、胚発生の段階には影響せず、細胞分裂には必須でないことが報告されている<sup>38)</sup>。

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の *unc-104* 遺伝子の変異は、シナプス小胞の神経細胞体からの anterograde の軸索輸送を阻害する<sup>39) 40)</sup>。

これらの遺伝子の変異においては、互いに類似の表現型を示すものも含まれるにもかかわらず、モータードメイン以外の領域において相同性を有するものはなく、キネシン・スーパーファミリーを構成する蛋白質の種類はいまだに想像の範囲を越えている。また、これらの中には、キネシン重鎖とは異なり C 末端側にモータードメインと

相同な配列を有するものも含まれる（酵母の *KAR3*、ショウジョウバエの *claret* segregation product）。*claret* segregation product はキネシンと異なり、*in vitro* のアッセイによると微小管のマイナス端方向へ運動することが確認されている<sup>4.1) 4.2)</sup>。この性質がモータードメインの位置に起因するのかどうかは不明である。

### 3. 高等植物の微小管<sup>4.3)</sup>

植物細胞にも微小管は存在し、小胞の輸送や染色体の分配等の細胞内運動に関与していることが知られている。また、それ以外に植物独自の微小管構造も存在する。増殖細胞においては、表層微小管 cortical array、前期前微小管束 preprophase band、紡錘体 mitotic spindle、隔膜形成体 phragmoplast、放射状の微小管束 radial array といったように細胞周期の進行に伴ってダイナミックに微小管の配向が変化する<sup>4.4) 4.5)</sup>。

表層微小管は、細胞質表層の細胞膜に近接した位置に存在し、細胞壁最内層のセルロース微繊維と平行に走っている<sup>4.6)</sup>。また、表層微小管を薬剤によって破壊すると、セルロース微繊維の配向が乱れ、その結果細胞伸長の極性が失われる。これらのことから、表層微小管はセルロース微繊維の配向を決定することにより細胞の伸長方向については細胞の形を決定していると考えられている。細胞周期においては間期の細胞で観察され、前期前微小管束の出現とともに消失する。

前期前微小管束<sup>4.7)</sup>は、M期直前に、将来細胞板が母細胞の細胞壁と融合する位置に細胞を取り巻く束として出現し、紡錘体の形成とともに消失する。その出現位置から見て、分裂面の位置を決定すると考えられている。

紡錘体の形成に関しては、植物には明確な構造体としての中心体が存在しない点で、動物や下等真核生物と異なる。しかし、その詳細はいまだに不明である<sup>4.8)</sup>。

隔膜形成体は<sup>4.6) 4.9)</sup>、分裂終期に分裂面上に出現する。2層の微小管の束が互いに逆向きに、かつ赤道面上でオーバーラップした状態で赤道面と直角に配されたよう



な構造体である。植物細胞の細胞質分裂の様式としての細胞板の形成に関与しており、その微小管に沿って細胞板の材料を含む小胞が分裂面に向かって輸送されている。微小管の極性は分裂面側がプラス端、娘核側がマイナス端となっており<sup>50)</sup>、プラス端方向へ運動する微小管モーター蛋白質の関与が予想される。隔膜形成体は、最初は細胞の中央に生じ、細胞板を形成しながら徐々に周囲に広がり、最終的に細胞板が細胞質を二分する。最近の研究では<sup>51)</sup>、その過程でチューブリンが赤道面上に位置する微小管のプラス端に重合し、更にその微小管が赤道面から離れる方向に転位されることが示された。そして、この転位運動はGMP PNPやAMPPNPによって阻害されGTPやATPによって促進された。そこで、赤道面領域には微小管モーター蛋白質が存在し、微小管の重合と同時にそのモーター蛋白質が2本の微小管のオーバーラップ領域で互いを逆方向に滑らせるように動かしていると考えられた。運動の促進効果はGTPに比べてATPでは弱かったので、このモーター蛋白質は、ATPを基質として好むキネシンやダイニンではなく、GTPを好むダイナミン様の因子であると予想された。

細胞周期のS期からG2期に位置する細胞には、細胞の中央に存在する核から放射状に周辺部に伸びた微小管<sup>52)</sup>が観察される。これは、前期前微小管束の形成とともに消失する。

一方、分裂を停止して伸長のみ行っている細胞では、以上の微小管構造のうち表層微小管のみが観察される。

#### 4. 本研究のねらい

このように植物細胞においては、微小管が分裂装置の主要な構成要素であるだけでなく、細胞分裂面や伸長方向の決定機構にも含まれている。植物組織においては、個々の細胞が強固な細胞壁に囲まれて固定されているために、細胞分裂によって生じた

細胞間の位置関係がそのまま維持されることから考えると、植物体の形態が最終的に個々の細胞の形とそれらの細胞のつながり方によって決定されることが理解できる。このことより、微小管は細胞分裂や細胞分裂面・伸長方向の決定を通じて植物体全体の形態の決定にかかわっていると考えられる。そこで、植物の形態形成の理解のためには、微小管の研究が重要であると言えよう。

しかし、微小管が細胞の増殖や形態決定に関与していると言うものの、個々の微小管が分子レベルでどのような機能を担っているのかということに関してはまだ情報が少ない。例えば、表層微小管がどのような仕組みで自身の向きと平行にセルロース微繊維を配列させるのかは不明である。また、前期前微小管束は細胞板が形成される時期には消失しているので、それが存在していた位置に細胞板が融合するための情報を残しておく働きを持っていると考えられているが、その仕組みも十分には解明されていない。

真核生物一般について知見から、微小管の主たる役割として細胞内の様々な構造体の極性輸送及び転位運動の基礎をなしていることが挙げられる。この機能はモーター蛋白質の機能を通じて発揮されると考えることができるので、微小管の役割を考える場合にそれに付随したモーター蛋白質に注目する方法論も有用であると考えられる。しかし、植物細胞にはモーター蛋白質の関与が容易に予想される機能が存在するにもかかわらず、その存在を明確に示した研究例は本研究の開始前には無かった。そこで、高等植物において微小管モーター蛋白質の存在を示すことは、植物に特徴的な微小管構造の機能を解明するてがかりとなると思われる。すなわち、機能の不明な微小管束に、それに付随したモーター蛋白質の存在を示すことによって、その微小管の役割が明確になってくることが期待される。本研究はその第一歩として、高等植物のゲノム上、さらには細胞中に、キネシン様の微小管モーター蛋白質（遺伝子）の存在を証明することを目標とした。その方法として、キネシン様微小管モーター蛋白質は組織・細胞中の存在量が少なく生化学的なアプローチは難しいと予想されたので、まず分子



生物学的な手法によって遺伝子を探索するといったアプローチを試みた。

## 第一章 シロイヌナズナにおけるキネシン関連遺伝子ファミリーの同定

高等植物細胞には、微小管をベースとした構造が存在し微小管モーター蛋白質の存在が予想されていたが、それに関する報告はなかった。近年キネシンの塩基配列が決定され、更にその後キネシン重鎖のモータードメインに類似の配列を有する蛋白質の遺伝子が相次いでクローン化され、それらの間で高く保存されている配列の存在がわかった。そこでまず、それらの配列を用いて高等植物ゲノム中にキネシン関連遺伝子が存在するかどうかを調べることにした。高等植物ではゲノムの倍化が一般に見られ、材料の選び方が問題となるが、本研究ではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)を用いた。シロイヌナズナはアブラナ科の野草であるが、世代時間が短いこと、小型で栽培が容易であることなどから植物分子遺伝学研究の際のモデル植物として広く用いられているものである<sup>5,3)</sup>。特に、ゲノムサイズはハプロイド当たり $7 \times 10^7$  bpで一般の高等植物に比べると数十分の一から数百分の一であり、最小単位のゲノム構成を有し、多くの遺伝子が1コピーのみ存在していると考えられているので、重複なく効率良く遺伝子の検出を行うことができる。

### 1. 材料と方法

シロイヌナズナ (コロンビア株) (*Arabidopsis thaliana* Columbia)

シロイヌナズナの種子は、理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター植物分子生物学研究室篠崎一雄博士から分与された。それを、バーミキュライトとパーライト1:1の混合物に肥料として1/1000希釈ハイポネックスを加えたものを用いて22℃で連続して蛍光灯を当てて栽培し、約6週間で種子が取得された。

オリゴヌクレオチドの合成



P C Rプライマー用のオリゴヌクレオチドの合成は、DNA synthesizer model 392 (Applied Biosystems) を用いて行った。

## P C R

シロイヌナズナのゲノムDNAを1  $\mu$ g、2種のプライマーをそれぞれ1  $\mu$ M、4種のd N T Pをそれぞれ0.2 mM、Taq polymerase (宝酒造) を2.5 unitを反応液 (10 mM T r i s · H C l (p H 8.3)、50 mM K C l、1.5 mM M g C l<sub>2</sub>、0.001% gelatin) に加え、95°C 1分、40°C 1.5分、72°C 3.5分のサイクルを30回行った。なお、P C Rの鋳型に用いたDNAは東京大学遺伝子実験施設の米田好文博士より分与されたシロイヌナズナのランズバーグ株 (Landsberg erecta) のゲノムDNAである。

## P C R産物のクローン化

P C R反応液を0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動に供し、目的の大きさのDNA断片を含むゲル片を切り取り、ジーンクリーンキット (B I O 101) を用いてDNA断片を溶出・回収した。それをKlenow fragment処理してDNA末端を平滑化してプラスミドベクターp T Z 18 RのH i n c I I消化物と連結し、それを大腸菌XL1-Blue株 (endA1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1,  $\lambda$ <sup>-</sup>, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$  (lac), [F<sup>+</sup>, proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10(tet<sup>R</sup>)] に導入して目的のDNA断片が挿入されたプラスミドを保持する菌株を得た。以下、本論文では別に断っているもの以外はXL1-Blue株を組換えDNA操作の際の宿主菌に用いた。

## 塩基配列の決定

プラスミドベクターp T Z 18 R上にクローン化したDNA断片をSequenaseを用いてdideoxy chain termination法により塩基配列を決定した。プライマーは、M13

Primer RV (宝酒造) 及びM13 Primer P1 (東洋紡) を用いた。電気泳動は厚さ0.35 mm、長さ65 cmの6%アクリルアミド/8 M ureaの変成ゲルを用いた。

#### シロイヌナズナのゲノムDNAの調製

シロイヌナズナの葉100 gを2 literの粉碎バッファー (0.35 M sucrose, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM  $MgCl_2$ 、50 mM KCl) 中でブレンダーを用いて破碎し、それをボアサイズ1000  $\mu$ m及び80  $\mu$ mのナイロンメッシュで濾過してから3000 rpm、10分間遠心分離した。得られたペレットを10 mlのTE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に懸濁し、その等容の2×Lysis buffer (1 M NaCl、0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA、2% Sarkosyl) を加えて室温に15分おいた。次に、全体で25 mlのサンプルにCsClを25 gと10 mg/ml EtBrを200  $\mu$ l加えて4800 rpm、16時間 (VAC50ローター) 遠心し、遠心チューブ中でバンドとなったDNAを回収した。sec-ブチルアルコールでEtBrを抽出して除き、エタノール沈殿、70%エタノールリンスを行い、TEに溶かした。

#### サザンハイブリダイゼーション

PCR産物をクローン化したプラスミドDNAから制限酵素処理及びアガロースゲル電気泳動によってシロイヌナズナ・ゲノム由来のDNA断片を分離・精製し、それをランダムプライマーラベリングキット (宝酒造) と [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTPとを用いて標識し、プローブに用いた。制限酵素消化したシロイヌナズナのゲノムDNAを5  $\mu$ gづつ0.7%アガロースゲルを用いて電気泳動し、ニトロセルロースメンブランにブロッティングした。そしてハイブリダイゼーション溶液 (3×SSC、1×Denhardt's solution、100  $\mu$ g/ml Salmon DNA、0.5% SDS) 中でプロー



ブと60℃一晩ハイブリダイズさせた。そして60℃の0.1×SSC、0.1% SDSで洗い、オートラジオグラフィーに供した。

## 2. 結果

シロイヌナズナのゲノムDNA上のキネシン遺伝子及びキネシン様蛋白質遺伝子の存在を確認するために、PCR法を用いた。まず、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のKAR3産物 (KAR)、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のキネシン重鎖 (kin) 及びclaret segregation product (Ca)、カビ (*Aspergillus nidulans*) のbimC産物 (bim) 間で高く保存されている配列 (Fig. 1-1) に基づいてオリゴヌクレオチドのプライマー1、2、3を合成した (Fig. 1-2)。プライマー1はATP結合部位とされている部分<sup>2,4)</sup>の一部 (IFAYGQT) より設計されたものであり、この配列は4種の蛋白質間で完全に保存されている。プライマー2および3は、微小管結合部位<sup>2,4)</sup>に含まれる保存性の非常に高く機能的に必須と考えられる配列よりそれぞれ設計されたものである。それぞれのプライマーのコードンの3番目に相当する部分については、混合ヌクレオチドあるいはI (デオキシイノシン) を配した。

プライマー1と2、または1と3との組み合わせでシロイヌナズナのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、各々の反応で数種の異なる大きさの産物が得られた。そのうちプライマー1と2では1~1.1 kb、プライマー1と3では0.8 kb前後のものをアガロースゲル電気泳動により分離しDNAを回収した。これらは、上記の4種の既知のキネシン関連遺伝子産物から予想される大きさ (1と2で0.6 kb、1と3で0.5 kb) より大きいが、本実験ではゲノムDNAを鋳型としているのでイントロンが存在することを予想したためである。それらのPCR産物を大腸菌のプラスミドベクターpTZ18Rに連結してクローン化を試みたところ、異なる

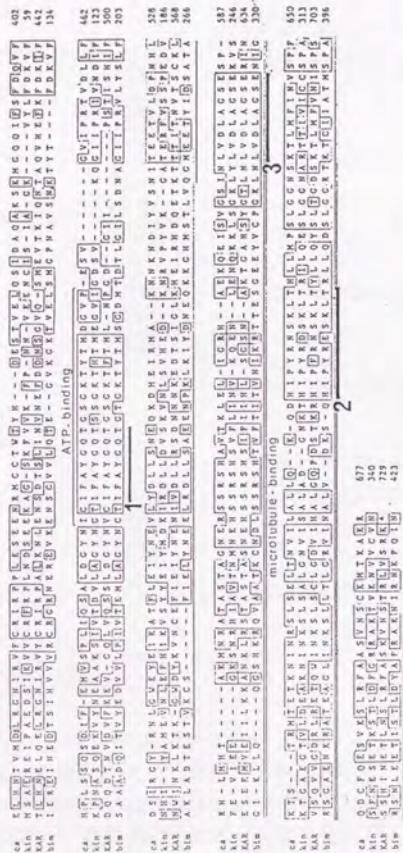


FIG. 3 Comparison of the predicted amino-acid sequences of the claret segregation product and *Drosophila* kinesin heavy chain. Predicted amino-acid sequences from KAR3 (ref. 20) and bimC (ref. 21) are included in the comparison. Identical residues are boxed. The putative ATP-binding site is indicated. The underlined sequences correspond to a region that can bind

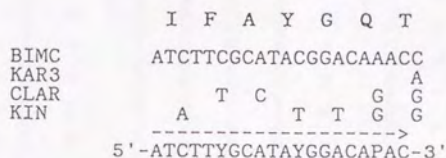
microtubules<sup>5</sup>. The N-terminal boundary of this region lies between or distal to kinesin residues 129 and 174. The uncertainty in position of this boundary (indicated by a single line) reflects the uncertainty in translation initiation site of the 5' deletion constructs that were used in the mapping experiments<sup>5</sup>. The C-terminal boundary is at or proximal to kinesin residue 331.

Fig.1-1 既知のキネシン関連蛋白質間の高保存領域のアミノ酸配列 (文献35)より転載)

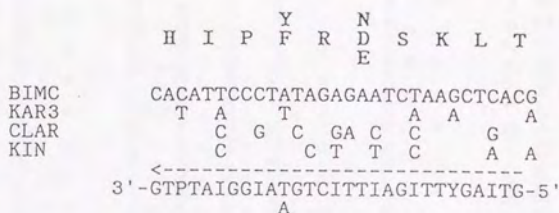
ショウジョウバエのキネシン重鎖 (kin) のモータードメイン、及びclaret segregation product (ca)、酵母のKAR3 (KAR)、カビのbimC (bim) の相当する領域のアミノ酸配列が示されている。図中、本章で行ったPCRのプライマー1、2、3に対応する配列を示した。



Primer-1



Primer-2



Primer-3

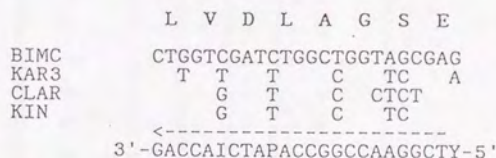


Fig.1-2 PCRに用いたプライマー

プライマーの設計に用いたカビの**bimC** (BIMC)、酵母の**KAR3** (KAR3)、ショウジョウバエの**claret segregation product** (CLAR) 及びキネシン重鎖 (KIN) の塩基配列及びコードされているアミノ酸配列をプライマーの上に示した。**bimC**以外は**bimC**と異なる塩基のみ示した。プライマーの配列中、I : inosine、P : A and B、Y : C and Tを示す。

PCR product A	primer 1 ATCTTGGCATATGGACAGACCGTTCTGGAAGACCTACACCATGATGGCGGCTCAGGCG..... G S G K T Y T M G R P E A
PCR product B	ATCTTGGCATATGGACAGACCGTTCTGGAAGACCTACACCATGATGGCGGCTCAGGCG..... G S G K T Y T M G R P G N
PCR product C	ATCTTGGCATATGGACAGACCGTTCTGGAAGACCTACACCATGATGGCGGCTCAGGCG..... G S G K T Y T M G R P G N
PCR product D	ATCTTGGCATATGGACAGACCGTTCTGGAAGACCTACACCATGATGGCGGCTCAGGCG..... G S G K T Y T M G R P G N
PCR product E	ATCTTGGCATATGGACAGACCGTTCTGGAAGACCTACACCATGATGGCGGCTCAGGCG..... G S G K T Y T M G R P G N
kinesin heavy chain	88 I F A Y G Q T S S G K T H T M E G V I G D .....TGATGTAATATTTGCAATTCGGTAAAGAAAGATCAATCCCTTCAGCAACTCCAAAGCTCAC D V I F A L A K K E D
PCR product A	.....CGATGTCATATTTGCTTACCGAAGAAAGATCAATCCCTTCAGCAACTCCAAAGCTCAC D V I F A L A K K E D
PCR product B	.....CGATGTCATATTTGCTTACCGAAGAAAGATCAATCCCTTCAGCAACTCCAAAGCTCAC D V I F A L A K K E D
PCR product C	.....CGATGTCATATTTGCTTACCGAAGAAAGATCAATCCCTTCAGCAACTCCAAAGCTCAC D V I F A L A K K E D
PCR product D	.....CGATGTCATATTTGCTTACCGAAGAAAGATCAATCCCTTCAGCAACTCCAAAGCTCAC D V I F A L A K K E D
PCR product E	.....CGATGTCATATTTGCTTACCGAAGAAAGATCAATCCCTTCAGCAACTCCAAAGCTCAC D V I F A L A K K E D
kinesin heavy chain	270 N V I S A L A D G N K T H I P Y R D S K L T .....GACATCAGATCTGGCTCTCTCTCCATCGTGGTCTATGTCATCTGTCGATTGGCCGGTCCGAG D L T S G S I L H G S M H
PCR product D	.....GACATCAGATCTGGCTCTCTCTCCATCGTGGTCTATGTCATCTGTCGATTGGCCGGTCCGAG D L T S G S I L H G S M H
kinesin heavy chain	223 N L E N Q K K L S G K L Y L V D L A G S E

Fig.1-3 PCR産物の塩基配列

クローン化したPCR産物の塩基配列を決定した結果の一部（プライマー付近）を示す。図中、太字で示した部分はプライマー由来の配列である。塩基配列の下に対応するアミノ酸配列を示した。そのうち、cDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列（第二章）と一致する部分を太文字で、cDNA上で見られなかった配列及び対応するcDNAの塩基配列が不明（E）の配列部分を小文字で示した。キネシン重鎖の対応する配列を下端に示した。



14種のクローンが得られた。クローン化したDNA断片の両端付近の塩基配列をそれぞれ決定した。そのうち5種類（A、B、C、D、Eと記す）について決定した塩基配列と予想されるアミノ酸配列の一部をFig. 1-3に示す。プライマー1に隣接する配列は5種類いずれもキネシン重鎖と類似している。プライマー1及び隣接部分に対応する部分はキネシンに特徴的なATP結合部位であり、他のキネシン関連蛋白質との間で高く保存されている配列である。そこでこの5種類のDNA断片はキネシン関連遺伝子に由来するものである可能性が高いと思われた。更に、A、B、Cについてはプライマー2に隣接する配列もキネシン重鎖の対応する配列に類似していた。一方、他の9種類のクローンは、両端がプライマー2または3のみで増幅されたようなDNA断片であり、その中にはキネシンに類似した配列は見だされなかったため、キネシン関連遺伝子とは無関係なDNA配列に由来するものと思われた。

次にPCR産物A、B、C、D、Eの各DNA断片をプローブとしてシロイヌナズナのゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション解析を行った。その結果、5種類のプローブに対して5本のバンドが見出され（Fig. 1-4）、これらのPCR産物がシロイヌナズナのゲノム由来であることが確認された。

### 3. 考察

本章では、キネシンならびにキネシン様蛋白質に特有なATP結合部位と微小管結合部位の中で高く保存されたアミノ酸配列より設計した3種の合成プライマーを用いることにより、シロイヌナズナのゲノムDNAからPCR産物を得、それらの塩基配列を決定した。14種のPCR産物の解析から、シロイヌナズナのゲノム中にキネシン重鎖のモータードメインに類似の配列が5種類存在することが示唆された。ただし、得られたDNA断片の大きさから判断すると、この配列中にはイントロンが含まれていると思われる。ジェノミックサザン解析の結果もキネシン様蛋白質遺伝子の存在を

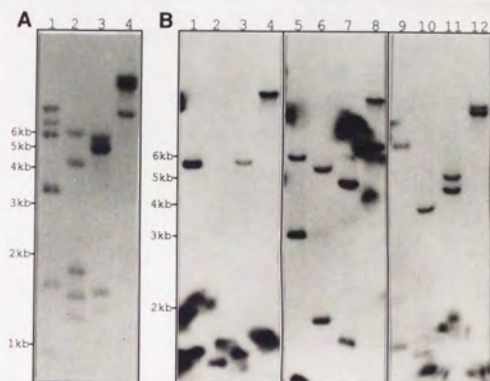


Fig.1-4 シロイヌナズナ・ゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション

Aでは5種類のPCR産物A、B、C、D、Eを混ぜてプローブに用いてシロイヌナズナのゲノムDNAに対してハイブリダイズさせた。各レーンにはゲノムDNAの *Bam*HI (1)、*Eco*RI (2)、*Hind*III (3)、*Pst*I (4) 消化物を泳動した。

Bではレーン1～4はPCR産物Aのみ、5～8はBとC、9～12はDとEを混ぜてプローブに用いてシロイヌナズナのゲノムDNAに対してハイブリダイズさせた。各レーンにはゲノムDNAの *Bam*HI (1、5、9)、*Eco*RI (2、6、10)、*Hind*III (3、7、11)、*Pst*I (4、8、12) 消化物を泳動した。



支持している。今回調べた14種にとどまらず、より多くのPCR産物を調べることで、またプライマーの配列を改変することにより、更に他のキネシン関連遺伝子が見出される可能性もある。

シロイヌナズナは他の高等植物と比べると同一の遺伝子が重複して存在する可能性が少ないと考えられるので、この結果からシロイヌナズナないし高等植物一般のゲノム上には各々別個の役割を持ったキネシン関連遺伝子が存在することが示唆される。このようなキネシン関連遺伝子ファミリーの存在は*Drosophila*や*S.cerevisiae*でも知られている。そこに含まれる遺伝子産物は共通のモータードメインに各々特有の尾部ドメインが接続したような構造を持っており、細胞内で異なる役割を分担している。シロイヌナズナにおいてキネシン関連遺伝子の存在が示されたことで、このような遺伝子ファミリーは、高等下等を問わず植物をも含めて広く真核生物に見られるものと考えられ、キネシン様微小管モーター蛋白質が真核細胞にとって必須の機能を担っていることを物語っている。

## 第二章 シロイヌナズナのキネシン関連遺伝子 cDNA のクローニング

前章で、シロイヌナズナのゲノム上に複数のキネシン関連遺伝子が存在することが強く示唆された。次に、それらの遺伝子の存在と発現を確認し、どのような遺伝子産物をコードしているのか等についての情報を得るために、A～Eに対応する cDNA のクローニングを試みた。

### 1. 材料と方法

#### シロイヌナズナの poly(A)<sup>+</sup>RNA の調製

発芽後 20 日前後の植物体のロゼット葉または 30 日前後の花を液体窒素中で乳ばちを用いて破碎し、2 倍容の抽出バッファー (5 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5 % Sarkosyl, 2 mM EDTA, 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol) を加えて混ぜ、50°C 15 分保温した。それを遠心分離して上清を集め、1 ml につき 0.1 g の CsCl を溶かし、遠心チューブ内で CsCl 溶液 (5.7 M CsCl, 0.1 M EDTA) に重層し、SW28 ローターで 24000 rpm 19 時間遠心分離した。得られたペレットを 1 M urea / 2 % Sarkosyl 溶液に溶かし、フェノール処理、エタノール沈殿を行い、水に溶かした (全 RNA)。40 g の葉から約 2 mg、15 g の花から約 4 mg の全 RNA が得られた。そこから oligo(dT)cellulose (Collaborative Research Incorporated) カラムに吸着する画分として poly(A)<sup>+</sup>RNA を調製した。

#### cDNA ライブラリーの作製

poly(A)<sup>+</sup>RNA 5  $\mu$ g から、「cDNA 合成システム・プラス」及び「cDNA クローニングシステム、 $\lambda$ gt11、アダプター法」キット (両方ともアマシャム) を



用いてcDNAライブラリーを作製した。まず、poly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として oligo(dT)をプライマーに用いて逆転写酵素によりファースト・ストランドcDNAを合成した。それによって生成したmRNA/cDNAハイブリッドをRNaseH処理することによりmRNA鎖にニックとギャップを入れ、それからDNA polymerase Iによってセカンド・ストランドを合成することにより2重鎖cDNAが得られた。次にT4 DNA polymeraseによって合成したcDNAの末端を平滑にし、そこにEcoRIアダプターを連結した。それをλgt11ベクターのEcoRI部位に連結し、in vitroパッケージングを行った。

#### ブランクハイブリダイゼーション

宿主大腸菌としてY1090 (*hsd*(r<sub>k</sub>m<sub>k</sub><sup>+</sup>), *lac*U169, *ProA*<sup>+</sup>, *lon*<sup>-</sup>, *ara*D139, *StrA*, *SupF*, *trp*C22:Tn10(pMC9))<sup>-</sup>を用いて直径15cmの平板培地上に1枚につき約5万個のブランクを出現させ、ナイロンメンブラン(NEN)に移した。このようなメンブランに対し、<sup>32</sup>Pで標識したプローブをハイブリダイゼーション溶液(50%ホルムアミド、6×SSC、1% SDS、0.1mg/ml Salmon DNA、5×Denhardt's solution)中60℃で一晩ハイブリダイズさせた。60℃の0.1×SSC/0.1% SDSで洗浄した後、オートラジオグラフィーに供した。

#### cDNAの塩基配列の決定

得たλgt11クローンのうちそれぞれの遺伝子について最長のcDNAを選び、cDNA全体をプラスミドベクターpTZ18Rまたは19Rにサブクローニングした。それぞれのcDNAを、キロシークエンス用デレーションキット(宝酒造)を用いて、Exonuclease IIIとMung Bean nucleaseにより端から200~250bpずつ欠失させた。それによってこれらのDNA断片が挿入された一連のプラスミドを作製した。各cDNAクローンについて両端からの2方向に欠失誘導体を作製した。各クロ

ーンのそれぞれのプラスミドについてヘルパーファージM13KO7を用いて一本鎖DNAを調製してシーケンシング反応の鋳型とし、二本鎖両鎖の塩基配列を解読した。反応・電気泳動等は第一章と同様に行った。

## 2. 結果

シロイヌナズナの葉及び花からそれぞれpoly(A)<sup>+</sup>RNAを調製し、 $\lambda$ gt11をベクターとして葉および花のcDNAライブラリーを作製した。そして、PCR産物A、B、C、D、Eをプローブとしてブラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。その結果、Aでは葉のライブラリー中の100万個のブラークから1個、花のライブラリー中の130万個のブラークから2個のポジティブクローンが得られた。Bでは葉のライブラリー中の100万個のブラークから13個、花のライブラリー中の50万個のブラークから1個のポジティブクローンが得られた。Cでは葉のライブラリー中の100万個のブラークから2個、花のライブラリー中の50万個のブラークから3個のポジティブクローンが得られた。Dでは葉のライブラリー中の100万個のブラークからはポジティブクローンが得られず、花のライブラリー中の180万個のブラークから5個のポジティブクローンが得られた。Eでは葉のライブラリー中の100万個のブラークからはポジティブクローンが得られず、花のライブラリー中の180万個のブラークから7個のポジティブクローンが得られた。これらのクローンについて挿入cDNAの長さを調べた。その結果、Aでは $\lambda$ -29 (2.9 kb)、Bでは $\lambda$ -6 (2.7 kb)、Cでは $\lambda$ -63 (2.8 kb)、Dでは $\lambda$ -51 (3.2 kb)、Eでは $\lambda$ -31 (3.5 kb)の各クローンが最長の長さを持つことがわかった。

これらのcDNA挿入部分全体のDNA断片を制限酵素消化(AとDはEcoRI、BとCはBamHIを用いた)及びアガロースゲル電気泳動によって調製し、AとD



はpTZ19RのEcoRI部位に、BとCはpTZ18RのBamHI部位に挿入した。次にこれらのサブクローンについて、Exonuclease IIIとMung Bean Nucleaseとを用いた欠失法により挿入断片の両端から種々の長さの削り込んだような一連の欠失誘導体を作製し、cDNAの全塩基配列を決定した。その結果をFig. 2-1、2-2、2-3、2-4に示す。いずれのcDNA上にも3'端にポリ(A)配列が存在していた。Aでは塩基配列252番から2630番までの2379bpからなるORFが見出された。その上流240番に読み枠に合う位置でナンセンスコドンが存在していたので、このcDNAはポリペプチドをコードする領域全体を含むと判断した。そこでこのcDNAには793残基、89kDのポリペプチドがコードされていると予想した。Bでは174番から2408番までの2235bpからなるORFが見出された。その上流171番にAの場合と同様にナンセンスコドンが存在していたので、ポリペプチドをコードする領域全体を含むと判断し、745残基、84kDのポリペプチドがコードされていると予想した。Cでは251番から2512番までの2262bpからなるORFが見出された。そして同様に212番にナンセンスコドンが存在していたので、このcDNAがポリペプチドをコードする領域全体を含むと判断し、754残基、85kDのポリペプチドがコードされていると予想した。Dでは48番から3008番までの2961bpからなるORFが見出された。そのORFの開始点付近の塩基配列(TCTCAGATGGCG)(下線は開始コドンを示す)はJoshi, C.P.の報告<sup>54)</sup>にある高等植物遺伝子の翻訳開始部位のコンセンサス(TAAACAATGGCT)に多少類似していることから、そこが翻訳開始部位と判断した。それにより、987残基、110kDのポリペプチドがコードされていると予想した。図では各々のcDNAにコードされていると予想したポリペプチドのアミノ酸配列を塩基配列の下に記した。これらの遺伝子産物は第三章で述べるようにキネシン重鎖と関連の深い配列を有していたので、それぞれの遺伝子をkatA、katB、katC、katD(kinesin-related gene of *Arabidopsis thaliana*)と命名した。

GAAACTACAGGCTCTGCTTCAGTCACACACTTACACACACAAAAATCCCCAAATTAGGAAAAAGTAAGAACTCTAGTTTCTCGACTT 90  
CGATTGAGAAGGTTTTCGATTGATCTCTAAGATCTTGAGAACTCAATCGGAGATTTTATGTCGGTAACCGGAATTTAGGGAGAAGACT 180  
ACCATTTTGGGATTTTATGCACCTTGACGAGCGAAAGGAGAAGAAATTTGATGCAATTTTGAGTCTCGGAGATGGCTTCTCGCAACACGA 270  
1 M A S R N Q N  
ATCGTCTCTCTCGAGTCCAAAGCCCAAAAGGAGGGTCTCGGTGGCATTTTCATTGACAAGCGAAGGAAGTGGAAACGCAAGGAGGTA 360  
R P P R S P N A K K E G L G G I S F D K R R K V E T Q G G T  
CTGGGAGAAGACAGCTTTTTCGGCTGGAATAACAAAGATGTCACGATGAACACCGATGTAGGGAGCTATGAAGAATGGTAAAGTTG 450  
38 G R R Q A F S A V N K Q D V T M N S D V G S I E C G K V D  
ACTTTACAAAAGATGAATATTGGCGTTGCTCAGTGAGAGAGCAAAAGCTGGAAAGTTTGATACTAAGGCTAAGATTGAGCAATGACGG 540  
68 F T K D E I L A L L S E R A K A G K F D T K A K I E Q M T D  
ATATTATCAAGAGGCTGAAGTTTGTGTAATGGTTCACCAAGCTGATGAACCCATGTCGAAGAGAAGGAAATTTGAGGTTTCTT 630  
98 I I K R L K V C V K W F Q Q A D E T H V Q E K E N L K V S L  
TGGAATCTTCAGACAAAAATACACCAACAAAGATTGGAGGCTAGGACAAAAGAGGAAGAGCTACAGGCCATATCTCAAAGTTGGAAG 720  
128 E S S E Q K Y N H K E L E A R T K E E E L Q A T I S K L E E  
AGAATGTAGTGTCACTACATGAAAGTTGCAAGAGGAGTCTAGTACACAGGAGCCATTGAATGTCTAGAAAGAGAAAAAGCTA 810  
158 N V V S L H E K L A K E E S S T O D A I E C H R R E K E A R  
GAGTTGCAGCTGAAAAGTGACGGCTTCTCTCGGAGAAGAACTTGATAAAGTTAAGGAAGAGAAATGGCTGCCAAGCAGAGGTCAGCT 900  
188 V A A E K V Q A S L G E E L D K V K E E K M A A K Q K V T S  
CACTTGAGGATATGTACAAAAGGCTGCAAGAGTCAACACAAAGTTGCAACAATATAACAGCAAACTTCAGACTGATCTGAAACAGTTC 990  
218 L E D M Y K R L O E Y N T S L O Q Y N S K L O T D L E T V G  
GAGCTGCACCTCACAGCTGCTGAAAAGAGAAAGTCAAGCATCTTGAGAGAATCTTAGTACACTTAGGGGACACAGCAAGCTCGCTGAGGATC 1080  
248 A A L T R A E K E K S I L E N L S T L R G H S K S L Q D Q  
AACTATCTTCAAGCAGAGTGGTGAAGATGACGCTATAAACAGAAAGGATTCATTGCTTTCGGAAGTACTAATCTTCGGAATGAGCTCC 1170  
278 L S S S R V L Q D D A I K Q K D S L L S E V T N L R N E L Q  
AACAAGTCCGGGATGACCGTGTATGCGCAAGTTGTACAGTCACAGAAGCTGTCTGAGGAGATCAGGAAGTACCAGGAGAAATGCGGAAAGT 1260  
308 Q V R D D R D Q V V Q S Q K L S E E I R K Y Q E E N V G K S  
CATCGCAAGCTAGACATCTTGACAGCAAAATCAGGATCGTTGGAGGAGACATGTTCTGTCAGAGGAGCGTTTAAATATGTTAGAGC 1350  
338 S Q E L D I L T A K S G S L E E T C S L Q K E R L N M L E Q  
AGCAATAGCAATGCCAATGAAGGCAAAAGATGGCAGATGATCAGTATCTTCTACTAGGACAGCTTGGAGGACAGAAAGCATCTAC 1440  
368 Q L A I A N E R Q K M A D A S V S L T R T E F E E Q K H L L  
TGTCGAACTACAAGACCGCTGCGAGACATGAGGATCAAGTGTGTGAGGAGAGTATTGCGGAAGAAGTCTCTAACAACATTTCTG 1530  
398 C E L Q D R L A D M E H Q L C E G E L L R K K L H N T I L E  
AATTAAGGAAATATACGTGTCTCTGCGAGTGGTCCCTTGTGTACAGACGATGGAGGAGGACATGAAGCAACTGTATAGCCATATC 1620  
428 L K G N I R V F C R V R P L L P D D G G R H E A T V I A G Y F  
CTACTTCAACAGAGCCCAAGGAAGAGGTTGATTGTTGGTTCAGAGTGGGAACAAACATCTTTCACCTTTGACAAGATTTTCAACCAGC 1710  
458 T S T E A Q G R G V D L V Q S G N K H P F T F D K V F N H E  
AAGCTTCCCAGGAGGAATTTCTTGAATATCTCAACTTGTACAGAGTGCATTGGATGGCTATAAGGTTTGTATCTTTGCCACAGCTC 1800  
488 A S Q E E V F F E I S Q L V Q S A L D G Y K V C I F A Y G Q  
AGACCGGTTCTGGAAGACCTACACCATGATGGCGGGCTGAGGCGCCAGATCAGAAAGGATGATCCCTCGATCACTTGAACAGATAT 1890  
518 T G S G K V L Y T M M G R P E A P D Q K G L I P R S L E Q I F  
TCCAAGCCAGTCAATCACTCGGTGCACAAGGCTGGAAGTACAAGATGCAGGTATCGATGTTGGAGATATATATAGAGCCATCAGAGATT 1980  
548 Q A S Q S L G A Q G W K Y K M Q V S M L E I Y N E T I R D L  
TGCTCTCTACAATCGAACCACTTCTATGGACTTGGTGGAGCAGACAGTGGCACTCAGGAAGCAATATAACAATCACTCATGACGTAA 2070  
578 L S T N R T T S M D L V R A D S G T S G K Q Y T I T H D V N  
ATGGACACACCCATCTCAGCGACTTGACCATATTTGATGTGTGCGAGCTTGGAAAGATATCCTCACTCTTGACGAGGCTGCTCAGAGCA 2160  
608 G H T H V S D L T I F D V C S V G K I S S L L O Q A A Q S R  
GGTCAGTAGGGAAGACTCAAATGAATGAGCAATCATCTAGAAGTCACTTGTGTTTACTATGAGGATTCAGGTGTTAATGAGAGCACCG 2250  
638 S V G K T Q M N E Q S S R S H F V F T M R I S G V N E S T E  
AACAGCAGGTACAAGTGTCTCAACCTAATAGATCTTCTGGAAGCGAGAGGCTATCGAAGAGTGGGCACTGGAGATCGATTAAAG 2340  
668 Q Q V L N G V L I D L A G S E R L S K S G A T G D R L K E  
AGACACAGGCTATAAACAAGTTTATCAGCTTTGAGTGATGAATATTTGCATTGGCTAGAAAGAGAGATCATGTTCTCTTCAAGAACT 2430  
698 T Q A I N K S L S A L S D V I F A L A K K E D H V P F R N S  
CAAAGTCAACATATCTGCTCCAGGCTTGGCTAGGAGGAGATTCAAAGACCTTGATGTTCTGTAACATCTTCGGCTGACCCAACTTCTGCT 2520  
728 K L T Y L L Q P C L G G D S K T L M F V N I S P D P T S A G  
GAGAGTCTTTGCTCACTCCGGTTTGTCTAGAGTAATGCGTGTGAAATGGTATACCTAGGCGACAACTTCAAGCAAGCTCTCTG 2610  
758 E S L C S L R F A A R V N A C E I G I P R R O T S T K L L D  
ACTCTCGCTTAAGCTATGGCTAAAAATGTCAGAAGATGTCGAATATTGATTCACAACCTTCTCTGTGGGTTTGACACATCAATC 2700  
788 S R L S Y G  
TCTTATCTGTAACTCTTAAACTATTACTAACATTTTTTCCGGATCTTTATGATAGTAGAGCAGCTTGGCTCTTAGCAATGTGGCTT 2790  
TCTCTATGTGTATGAGAACAATCTCTGCTATTCAATGTTTAAATGTATTTTCAAAAAAATAAATA 2863

Fig-2-1 k a t A c D N A の塩基配列と予想されるアミノ酸配列



CGGGAGAGCCCAACGGAGAGACATATGCCCATTTCAAAGCTAAACAACAGATAATAACTGAGGTTTTATGCTTATAATGGGGTGA 90  
 AAGAGACAAATCCAGAGTGTGTAAATAGGTACGAGAAGAAATTCAGCTAATCTTTTGAGAGAGGAGAAAAGATATAGATGGTTG 180  
 1 H V G  
 4 GGGAAATGACGAACAATGGAAGAATCCGGCCATCTTTCCGGTGAAGATCTGACAGTAATGAAGGATCTGAATGTGGCCCTGTG 270  
 E M T N N G R I R P S F P V K D L T S N E G S E Y T G G P V E  
 AGTTTACCAGAGAAGATGTTGAACCTCTTTCATGAGCGAATCAAGTACAAGAGCAAGTACAATACAAGGAGAGATGTGAGAATACGA 360  
 F T R E D V E T L L H E R I K Y K S K Y N Y K E R I C T M  
 34 TGGACTATGAAAAAGGCTTAGGCTTTGCATTAGATGGTTTCAAGAACTCGAGTTAGATTATGCATTTGAGCAAGAGAAGTTGAAGAAG 450  
 D Y V K R L R L C I R W F Q E L E L D Y A F E Q E K L K N A  
 64 CTATGGAGATGAATGAGAAGCATTGCCGCCATTTGGAGGTTAATTTGAAGTAAAGGAAGAGAGCTAAATATGGAATTTGATGAAGTGA 540  
 M E M N E K H C A D L E V N L K V K E E L N M V I D E L R  
 94 GGAAGAATTTGCATCTGTCAGGTGCAACTTGCCAAAGAACAAACAGAGAAATTTGGTGCARATGAATCTCTTGGAAAAGAGAGAGAG 630  
 K N F A S V Q V Q L A K E O T E K L A A N E S L G K E R E A  
 124 CAAGAATTTGCTGTTGAAAGTTTGAAGCTGCCATTACAGAAGAGCTAGCAAGAGCGCAAGGAGAGCTTCAACACAGTACCAGAGGATTC 720  
 R I A V E S L O A A I T E E L A K T O G E L Q T A N Q R I O  
 154 AAGCTGTCAATGACATGTACAACCTTTGCAAGAGTATAACTCGAGCTTACAGTTGTACAATAGCAAACTTCAAGGTGATCTGACGAAG 810  
 A V N D M Y K L L Q E Y N S S L Q L Y N S K L Q G D L D E A  
 184 CTCATGAAAATAAAGCGAGAGAGAAGAGAGCTGCGATTGTAGAAGCAATTTGGCAACTTAAAGGTCAGTTTAAAGCACTACAGG 900  
 H E N I K R G E K E R T G I V E S I G N L K G Q F K A L Q D  
 214 ATCAGCTTGTGCTCGAAGGTGTCACAAGATGATGTCATGAAGCAAAAAGATGAATTTGGTGAATGAAATTTGAAGTCTCAAGTTGAGA 990  
 Q L A A S K V S Q D D V M K Q K D E L V N E I E L V A S L R S Q G  
 244 TTCAACAGGTCAAGATGACCTGACCGCCATATAACGGAATTTGAACTCTGCAAGCAAGAGCAACCAAGCAAAATGACTTCAAGACA 1080  
 Q O V K D R D R H I T E I E T L O A E A T K N D F K D T  
 274 CCATAAATGAGCTTGAGAGTAAGTTCTGTTCAAATAAGAGAGTAGAAGAGTTGCAGGATCAATTAGTAGCTTCTGAGAGAAAATGCG 1170  
 I N E L E S K C S V Q N K E I E E L Q D Q L V A S E R K L Q  
 304 AGGTGGCTGATTATCTACTTTTGAAGAAATGAACGAGTTGAAGAGCAAAAGGAAGCAATTTAGGAGCTGAAAGGTCGCTTGAAGAAG 1260  
 V A D L S T F E K M N E F E E Q K E S I M E L K G R L E A A  
 334 CGGAATTTAACTCATCGAAGGAGAAAACACTCGGAAGAAGTTGCACAATACCACAGGAAGTGAAGGAAACATCCGTGTATCTGTGA 1350  
 E L K L I E G E K L R K K L H N T I Q E L K G N I R V F C R  
 364 GGTGAGACCTTATTATCAGGAGAGAATTTAGTGAGGAGGCCAAAACATATCTACCTACATCTCTAGAAGCACTTGGTCGGGGCA 1440  
 V R P L L L S G E N S S E E A K T I S Y P T S L E A L G R G I  
 394 TTGACTTGTGCAAAATGGACAATCGCATTTGTCACATTTGATAAGGTTTTTGCCCAAGTGATCACAAGAAGATGTTTTGTAGAGA 1530  
 D L L Q N G O S H C F T F D K V F V P S A S O E D V F V E I  
 424 TTCTCAACTTTGTCAGAGCGCTTTGATGGTTACAAGGTTTTCGATTTTCGATATGGACAACAGGATTTGGAAGAACTTATACAAATGA 1620  
 S Q L V Q S A L D G Y K V C I F A Y G Q T G S G K T Y T M M  
 454 TGGGTAGGCGAGGAACCCGGATGAAAAGAGCTGATTCCTCGATGTTTGGAGCAAAATTTTCAAACAGGCGAGTCTCTTCGATCACAGG 1710  
 G R P G N P D E K G L I P R C L E Q I F Q T R Q S L R S Q G  
 484 GTTGAAGATGAGTTGCAAGGTGCTATGTTAGAAATATACAACGAACAGGATAGGATCTCTTGTCAACAAACAGGAAGCTGTGAGAG 1800  
 W K Y E L O V S M L E I Y N E T I R D L L S T N K E A V R A  
 514 CAGACAATGGCGTTTCCCGCAGAAATATGCAATCAACATGATGCTAGTGGGAATACACATGTTTGGAACTTACTGTTGATAGTTC 1890  
 D N G V S P Q K Y A I K H D A S G N T H V V E L T V V D V R  
 544 GAAGCTCGAAACAGGTTTCGTTCTCTTAGACCAACGAGCTCGAAACAGGTCAGTAGGGAAGACCGCAATGAACGAGCAATCTCTAGAA 1980  
 S S K O V S F L L D H A A R N R S V G K T A M N E O S L E R S  
 574 GCCATTTGCTTTTACATTTGAAGATCTCTGGATTTCAACGAGAGCACAGAGCAACAGTACAAGGTGCTTGAACCTGATTGATCTTGGCG 2070  
 H F V F T L K I S G F N E S T E E Q Q V Q G V L N L I D L A G  
 604 GTAGTGAGCGTTTGTCAAAGAGCGGATCACTGGCGATAGACTGAAAGAACTCAAGCAATCAACAAAGCTTATCTCTCTAGGCGATG 2160  
 S E R L S K S G S T G D R L K E T Q A I N K S L S S L G D V  
 634 TCATATTTGCTTACGCAAGAAAGATCACGTTCTTTCAGAACTCAAAGCTCACTTATCTTCTTTCAGCCCTGTTTAGGTGGTGA 2250  
 I F A L A K K E D H V P F R N S K L T Y L L Q P C L G G D S  
 664 CGAAGAGCTAATGTTTGTGAATCACACCAAGCACTTCTCAACCGGTGAGTCTCTGTGCTCCCTCAGGTTTTCAGCAAGAGTGAAT 2340  
 K T L M F V N I T P E P S S T G E S L C S L R F A A R V N A  
 694 CTTGTGAGATTGGAAGTGCACACCGCTATGTTAACCCAGGCGGTTAGATTATCGCTTGAGCTTTGGATGAGAATTTTCTCCACTGAAGC 2430  
 C E I G T A H R H V N A R P L D Y R L S L G  
 724 CAAGAAAATAAGTTATGTTTATACCCGAATGTGGGCACTACTTGTGTTGCTACAAATCTGTATATAGCTTGAATAGTTTCAAGGTT 2520  
 CTGTTATCTTCTACTCTTGTCTGGATCAGAAGATTTGTGTGCTGGAAGAAATATAATGTTCTGAGACCATTAACCGCATATTTCAATTA 2610  
 AAAAAAAAAA 2620

Fig.2-2 *k a t B c D N A* の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

GAAACGTCCTCCATTTCTAAACCCAAATCTCTTCGTACAAACGACACAATCTCTCTTAAATGCCAAAGGTCCTCTTTTCGCTCTC 90  
 TTCACCTCTCTTACTCTCTCTCAAACTCGGGCATGTTTGAATCCACATCTCTTCACTGAAGTTTCTTACCTCTTAAAGTT 180  
 TCAATCTTTAGATTGAGAGAGAAATTTGAAGTAATTTAAGGTAAACAAGAGAGACAATTTTGTCTGTTATGGTGGGGCGATGGCAAA 270  
 1 CAATGGAGAATCCGGTCAGCTTTTCGGTGACTAATGGGTCAAAGATCTGAGCGCAACAGTCTCGGGCGAGTACAACGGATCTGA 360  
 8 NGRIRSFARFVFNKGLTPNSAPASTTGGSE  
 ATATGGTCTGTGAGTTTCAACAAGAGAGCGTTGAACTCTTCTTAATGAACGAATCAAGTACAAGAGCAATCAACTACAAGGAGAG 450  
 38 YGPFVEFTR EDVETLLNERIKYKSKFN YKER  
 ATGCGAGAATATGATGGATTATATAAAAGACTTAGACTTTGCAATTAGATGGTTTCAAGAAGCTTGAGTTGATTTGCGTTTGAAGCAAGA 540  
 68 CENMMMDYIKRRLRLCIRWFQEELELDYAFEEQE  
 GAAGTTGAAGAAGCGATTGGAATTGAATGAGAAGCATTTGTTGACATGGAGTTAGTTTGAAGAACAAAGAAGAGGAGCTGAATATGAT 630  
 98 KALKNAL E L N E K H C V D M E V S L K N K E E E L N M I  
 AATTGAAGAGCTGAGGAAAACCTTGAATCTGTTCAGTTCAACTTGGCAGGGAACAAACGAGAGAAGTTGGCGGGAATGATCTCTCTTG 720  
 128 IEEELRKNFESVQVQLAREQTEKLAANDSLG  
 AAAAGAGAAGAAGCAAGCTTTCTGTTAAAAGGCACAAGCTGGTCTCACAGAAGAGCTAGGAAAAGCACAAGGAGATCTTCAAACGGC 810  
 158 KEK E A R L S V E K A Q A G L T E E L Q L O T A  
 TAACAGAGGATACAACTCGTGAATGACATGTACAAACTGTTGCAAGAGTATAACTCAAGCTTGACGTGTATACAGCAAGCTACAAGG 900  
 188 NQRITQSVVNMDYIKRRLRLCIRWFQEELELDYAFEEQE  
 TGATCTTGATGAAGCTCAGGAGCTATAAAACGGGTCGAGAAGAAGGAGTGGCATTATGAAAATATTGGCAATTTGAAGGGTCAAGTT 990  
 218 D L D E A H E T I K R G E K E R T A I E N I G N L K G Q F  
 TTCAGCTATACAGGAACAACCTTGTCTGCTTAAAGCTTCTCAAGAAGATATCATGAAGCAGAAAGGTGAATTTGTTAAATCAATTTGCGAG 1080  
 248 S A L Q E Q L A S A S Q E D I M K Q K A G L V N E I A  
 TCTCAAGGTAGAGCTTCAGCAAGTCAAGATGACCGTGATGCCATTAGTGGAGTTAAAACCTTACAACCCAGGCAACCAAGTACAA 1170  
 278 L K V E L Q Q V K D D R D R H L V E V K T L Q T E A T K Y N  
 TGACTTCAAAGACGCCATAACCGAGCTTGAGACTACATGTTCTGCCAGAGTACCAGATACGAGAGTGCAGGATCGACTAGTAAACTC 1260  
 308 D F K D A I T E L E T T C S S Q S T Q I R Q L Q D R L V N S  
 TGAGAGGAGCTGCAAGTGTCTGATCTATCTACCTTTGAGAAAATGAATGAGTATGAAGACCAAGCAAGCATTATGCAATCTGAAAG 1350  
 338 E R R L Q V S D L S T F E K M N E Y E D Q K C S I I D L K S  
 TCGGCTAGAAGAAGCAGAACTTAACTCGTTGAAGGAGAAAACACGGAAGAAGTTGCACAATACCATCTTGAAGTGAAGGTAACAT 1440  
 368 R V E E A E L K L V E G E K L R K K L H N T I L E L K G N I  
 ACGTGTCTCTGTAGAGTTAGACCTCTATTGCGGGTGAGAACAAATGGAGATGAGGGAAAACATATTCTTACCAGCATCCCTAGAAGC 1530  
 398 R V F C R V R F L P L P G E N N G D E G K T I S Y F T S L E A  
 ACTTGGCCGTGGTATTGATGCAAAATGCGCAAAAGCATGCTTTCACATTGATAAGGTTTTTGCGCCGAGTGCATCAACAAGA 1620  
 428 L G R G I D L M Q N A Q K H A F T F D K V F A P T A S Q E D  
 TGCTTCTAGTGAATTTCTCAACTTTCAAAGTGCTCTCGATGGTTACAAGGTGTGCAATTTTGCATATGGACAAGCTGGATCGGGAAA 1710  
 458 V F T E I S Q L V Q S A L D G Y K V C I F A Y G Q T G S G K  
 AACTTACCATATGAGGTAGCGGAGGAGCTGAGGAAAAGGCTGATCCCGGATGTTTGGAGCAAAATTTTGAGACGAGGAGCT 1800  
 488 T Y T M M G R P G N V E E K G L I P R C L E Q I F E T R Q S  
 TCTTCGATCTCAGGTTGGAATACGAAGTCAGGATATCCATGTTAGAAATATACAATGAACGATCCGAGATCTCTGTCAACAAACAA 1890  
 518 L R S Q G W K Y E L Q V S M L E I Y N E T I R D L L S T N K  
 AGAAGCAGTAAGACAGACAGCTGTTTCTCCACAGAAACATGCTATTAAACATGATGCTAGTGAAGAACCGCATGCTCGCTGAGCTTAC 1980  
 548 E A V R T D S G V S P Q K H A I K H D A S G N T H V A E L T  
 TATTTTGGATGTTAAAGCTCTCGGGAGGTTTCACTCTCTTAGATCATGCTGCTCGTAACAGGCTCTGAGGGAAGACTCAGATGAACGA 2070  
 578 I L D V K S S R E V S F L L D H A A R N R S V G K T Q M N E  
 GCAATCTCCAGAAGCCATTGTTTTCACGTAGAATCTCTGGTGTAAACGAGCACTGAGCAACAAGTACAAGTGTCTTGAACCT 2160  
 608 Q S S R S H F V F T L R I S G V N E S T E O Q V O G V L N L  
 GATTGATCTTGGGGAGTGAGCGTTTATCGAAGAGTGGATCAACCGGAGATAGACTTAAAGAACTCAAGCAATCAACAAAAGTTTGTG 2250  
 638 I D L A G S E L S K S G S T G D R L K E T Q A I N K S L S  
 GTCGCTAGGCGATGTCATATTCGCTTAGCAAGAAAGAGATCATGTACCATTCGAAACTCAAGCTCACATATCTCTCCAGCGCTTG 2340  
 668 S L G D V I F A L A K K E D H V P F R N S K L T Y L L Q P C  
 CTTAGCGGTGAGCGCAAGAGCGTAAATTTTGTGAACATTGACCGGAATCTCTTCAACCGGTGAGTCTCTCTGCTCTCTTAGATTCGC 2430  
 698 L G G D A K K T L M F V N I A P E S S S T G E S L C L R F A  
 AGCGAGAGTGAATGTTGGGAGATTGGAACACACGCTAGGCGAGCTAACATCAACCAATGGAAAACTCGTTGAGCTTGGATGAGGGA 2520  
 728 A R V N A C E I G T P R R O T N I K P L E N R L S L G \*  
 AGAAAAGAGAGATGATTTGAAGTTTGAAGCTTAAAGCTTCAATTTCAAAGTTAATATATGAATGACTTAATATGTCACAACTTGATG 2610  
 AAGAGCATGGGATGATTTCAACAGAAATCAAGAGCTTTGTTGTAATTTGATAGTTTGGTTAGCAATTTATATCTGTTGTTT 2700  
 ATGTAATCTTTCTTTTGGATCATAAGTAGGATTTGCTTGTGATGTTGGGATCATATCTCTCTGGGATCAAAATATTACT 2790  
 TCTCAAAAAAAA 2804

Fig.2-3 *k a t C c* DNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列

Fig.2-4 *k a t D c* DNAの塩基配列と予想されるアミノ酸配列 (次ページ)



AAACACCCGCAATTTCTCTGCATCTCATAATTTACCAGAAATCTCAGATGGCGACGACATCGGAGATCAACAATGATCTTTCTTTCCG 90  
 1 M A T T S E I N N D L S F S V  
 TTGTATCGATGTTGAAGATGTTCTTCAACAACATAGTAGCCGATCAAGCGACGTCGGTTTGGTTTCCAGAAAAGTTGAAGAATCTTCT 180  
 16 V S I V E D V L Q Q H S S R S S D V G L V S R K V E E S S L  
 TGAGAAGATATGAAGCTGCTGGGTGAGATATGATCGGAGTTTCCAATGGTAAGATTTCCAGGAGAGCCCTCTGAAGAAGAT 270  
 46 R R Y E A A G W L R D M I G V S N G K D F P G E P S E E E F  
 TTAGGTTGGATTCGGAAGTGGGATGTTCTTGAATGTTTAAACAAAGTTAATCTGGATCAGTCTCAAAGCTGTTGAAGCGCGG 360  
 76 R L G L R S G I V L C N V L N K V N P G S V S R V V E A P D  
 ACGATGTTGCAGATGGAGCTCAGCTTTCACTTTTCAATCTTTGAAACATAAGGAATTTTATAGTATAGAGAAATGGGTTGC 450  
 106 D V A D G A A L S A F Q Y F E N I R N F L V A T E E M G L P  
 CATCATTTGAAGCTTCAGATATGGAGAAGGGAGGCAAGCTTATAAGGATAGTGAAGTGCATTCTTCCCTTAAAGTCTTATAGTGAGTGA 540  
 136 S F E A S D M E K G G K S I R I V N C I L A L K S Y E W K  
 AACTGAAAGGTGAAATGGTCCATGGAGGTATGGATCTAACATGAAACATAACTTTGGATCGAGAAACTATTTCTGAGAAAAGTTCAG 630  
 166 L K G E N G P W R Y G S N M K H N F G S R K L F L R K S S E  
 AGCCATTGTTAGTTCTATATCGAAGCTCAGTCGAGGATATGTTATCACTGATCAACCTCTGAGTTCTGATGGAGATCTAGATCCA 720  
 196 P F V S S I S R T Q T D M L S T D Q P L S S D G D S R S I  
 TAAATGGGCTTCTCGGTCAATTCATTCAGACAGAAAGCATGAAGATATTCCTAAATGTTGTAGATCTGTGTGAACAAAGTTATGAAG 810  
 226 N G L V R S L I A D R K H E D I P N V V E S V L N K V M E E  
 AAGTCCAGCAGCGTTTATCAATCCACAATGAAATGATGAAATCAAGTTCAAAGCTATTCCAGAAAGATGATTCATCTGTGAGACAGTGG 900  
 256 V Q Q R S L S I H N E M M K S S S K P I P E D D S S C E T V V  
 TCCGGCTCAGCTGTGTGATGACAGACATGAGGAGAGAGAAATAGTCCGCCAGGTTGTGGAAAAGATTTCAAAGACAA 990  
 286 R S Q L C D A R Q H E E A E E N S P P Q V V E K K F Q R T N  
 ATTTGAACATCACGAAGAACAAAGATTTCTTGAATCAACAAAACACATCCAGGAGTTGAAGCAACCTTATACACTACAAAAGCAG 1080  
 316 F E H H E E Q K I L L N Q Q K H I Q E L K Q T L Y T T K A G  
 GAATGAATTTCTGCAGTGAAGTATCAAGAAGATTTCTTATCTAGCAAGCATTAAATGGTTAGCTTACGGCTACGGGATACA 1170  
 346 M K L L L Q M K Y Q E D F F H L G K H L N G L A Y A A T G Y K  
 AAAGGTTCTTGAAGAAAACCGTAACTGTACAATCTAGTCAGGATCTAAAAGAAACATACGGGTGTACTGTGAGTTAGCCGCTTCT 1260  
 376 R V L E N R L V Q D L L K G N I R V Y C R V R P F L  
 TGCTGGCCAGAAAGTGTGTGTTGAGTGGCTGGAAGACATAGACGAGGAGGACCATCAGATCAGAGTCCATCAAAGTATGGGAAAG 1350  
 406 P G Q E S G L S V E D I D E G T I T I R V P S K Y G K A  
 CAGGACAAAACCATTTATGTTCAACAAGCTTTTGGTCTTCTGCAACACAAGAGGAAGTGTTCAGACATCGAGGCTTTGTGACGGT 1440  
 436 G Q K P F M F N K V F G P S A T Q E E V F S D M Q P L V R S  
 CGGTTCTGATGGCTACATCTGCTGCTTCTGCTTATGGCCAAACCGGGTCAGGAAACTTTTACATGACAGGGCTTAAGAACTGA 1530  
 466 V L D G Y N V C I F A Y G Q T G S G K T F T M T G P K E L T  
 CTGAAGAGAGCCTAGGTGTGAACACTACAGGCACTGGCAGATCTGTTTCTTCTATCAAATCAAAGAAAAGACACAGCAGCTACGAAATCT 1620  
 496 E E S L G V N Y R A L A D L F L L S N Q R X D T S Y E I S  
 CAGTTCCAGATTTGGAAATTTACAAAGGAGCACTGAGATCTACTTGGCCAGATGGCCAGACATAAAGGTTAGAGATCAGAAACAACT 1710  
 526 V Q M L E I Y N E Q V R D L L A Q D G Q T K R L E I R N N S  
 CTCACATGGAATCAATGTACCGGAAGCAAGTCTAGTGGCTGTCTATCGACGAGGATGACGTTATACAGCTAAATGGATTTGGGACACATGA 1800  
 556 H N G I N V P P E A S L V P V S S T D D V I Q L M D L G H M N  
 ATCTGCAAGTGGCTACAGGCACTGAATGACAGAAAGTGTGATCTCAGAGTTGTGTAATCTGTCTGTTCAAGGCAAGAGCACTACAT 1890  
 586 R A V S S T A T M N D R S S R S H S C V T V H V Q G R D L T S  
 CTGGCTCTATCTCCATGTTCTATGCATCTGGTGTGATCTTGCAGGAAGCGAGAGAGTGACAAAGTCTGAGGTGACTGGAGCAGACATGA 1980  
 616 G S I L H G S M L V D L A G S E R V D K S E V T G D R L K  
 AGGAGGCTCAACACATCAACAAGTCCCTCTCGGCTTTGGAGATGTCTATCTCTCGCTTTCCCAAGAGACTTCTCATGTGCTCTACAGAA 2070  
 646 E A Q H I N K S L S A L G D V I S S L S Q K T S H V P Y R K  
 ACAGTAACTCACTCAGCTGTCTGAGGAGCTCCCTCGGAGGATCAGCAAGACACTTATGTTTGCACATAAGTCCAGAACCTGACACTC 2160  
 676 S K L T Q L T Q D S L L G G S A K T L M F V H I S P E P D T L  
 TCGGAGAACTATTAGTACTTGAAGTTTCTGGAACGAGTGGGAGTGTGAGCTAGGCGCTGCTCTGTGTAACAAAGATAACTCAGAGG 2250  
 706 G E T I S T L K F A E R V G S V E L G A A R V N K D N S E V  
 TTAAGGAGCTTAAAGAGCAGATTGCTAATCTTAAGATGGCTTGTAGTGAAGAAAGAAATGGTAAATGATGTACAACCAACAGCTATACCAA 2340  
 736 K E L K E Q I A N L K M A L V R K G N G N D V Q P T A I P I  
 TCAACGTCAGAGAATATCGAGAAGAGTCACTCGAAATCTTACTATTGACCCAAATACCTACCATGGGAAACACATCAAAACAACA 2430  
 766 N R E R I S R R R S L E T P T I R P K L P T M G N T S N N S  
 GTAGGCCCCAGATCATGGATCTAAGTGAGCCAGAGGCTTTAAGCAGACAGTACTGATCTTCAAGAGACACAGCTTAGATATTCATGAGC 2520  
 796 R P Q I M D L T L S G P E A F N D S T A S S R R H S L D I H E L  
 TAAAGAAATCTTCTTCCGCTTGGCGAGGAGCCACTCAATGGAAGAACAGGAGAGAGAAATTAAGTGGGCGAGTGGATCGATA 2610  
 826 M K S S S P A W F R Q P L N G K D E D R E S K S G E W I D K  
 AGCATGAAGAATTAATCAAAATCAGAAATCTCCGAGCAATCTACCAGTCAATGGTCCCTCAACAACATCACTATATGGT 2700  
 856 H E E L I J Q N O N P N S P E Q F Y Q S M V P Q C A Q S L Y G G  
 GGAAACAGAGTTTCAAGTGCAGAGATTTACAGATCAACAAATCTGATGAAGCCGCAACAGGATTTGCTCAGATTTCCGATTTGCTGTGGC 2790  
 886 K Q D F E V L Q S I T D N E S D E A A T S D C S D S D L W R  
 GATTGAGCGTTCAAGTGAATGTTCCCAAGTTTCTATATCAAAACTCAGCAACCCCAACAAAGAAATTAAGCCGACAGACTGCTA 2880  
 916 L S V V N P K V S N I Q N S A N P K P K I Q P R T A K  
 AACTCTCAGAAATGAGAGTTTAAATTCATCGCTGATCCGACCAAGCAAGAGACCTCTCAACAGCTAAATTCACAGCCGACAGGAC 2970  
 946 L S E T R S L I P A P S K R P P N T V N S Q P Q R P  
 CAACGAGAGATGAAAACGACAGCTAGTTTATGGACATGAACACACAGTTTGTAAAGAGTTTAAAGGAAGGAGAGACAAATATTTGT 3060  
 976 T R D G K R L S L G T  
 TGTTTGTATATTGAGAGAAAGCTTTCTCTGTTGTGGCGCTCTTATTGTGCATTAAGGTAAAAATCTCAAATTTGCTGTTTGTAGT 3150  
 GTACAAAAATGATTCCTTATTATACAAATCTCTTTTGGATTCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA 3219

### 3. 考察

本章では、第一章で得た5種類のPCR産物に対応するcDNAのクローン化を試みた。その結果、5種類全てに対応するcDNAクローンが得られた。このことは、それらの遺伝子が少なくとも転写段階で発現していることを示している。cDNAクローンのスクリーニングは葉と花別々に作製したライブラリーから行った。各々のライブラリーから得られたポジティブクローンの数からそれぞれの遺伝子のおおよその発現量を推測することが可能である。5種類とも相当発現量が少ないと予想されるが、中でも特にAは発現が微弱であると思われる。Bは葉と花両方のライブラリーからクローンが得られたが、特に葉のライブラリーから比較的効率良く得られたので、植物体中で広く発現が見られるが、特に葉で割と多く発現していると思われる。Cも葉と花両方のライブラリーからクローンが得られたが、Bとは逆に花のライブラリーから効率良く得られたので、植物体中広く発現が見られるものの、特に花で割と多く発現していると思われる。一方、DとEは葉のライブラリーからはクローンが得られず、花のライブラリーからのみクローンが得られたので、かなり花特異的に発現していると思われる。以上のように、各々の遺伝子で予想される発現パターンに特徴が見られることから、それぞれが独自の役割を持った別個の遺伝子であると考えられる。

クローン化したcDNAのうち、A、B、C、Dの全塩基配列を決定した。いずれのcDNA中にもORFが存在しており、それぞれ89 kD (A)、84 kD (B)、85 kD (C)、110 kD (D)の蛋白質がコードされていると予想された。ここで決定したcDNAの塩基配列を第一章で部分的に決定したPCR産物の塩基配列と比較してみると、PCR産物中には、cDNAの塩基配列で言うと、Aでは2344番と2345番の間、Bでは2126番と2127番の間、Cでは1838番と1839番の間及び2230番と2231番、Dでは1511番と1512番の間及び1



849番と1850番の間に相当する領域にcDNAでは見られない塩基配列が存在しており、そこがイントロンであることがわかった。

### 第三章 K a t 蛋白質のアミノ酸配列の解析

キネシン・スーパーファミリーに属する蛋白質はキネシン重鎖のモータードメインと類似の配列を有していることに特徴がある。また、キネシンには細長く伸びたストーク（柄）構造が中央部に存在することが電子顕微鏡による観察などから知られているが、その構造の特徴はアミノ酸配列にも現われている。キネシン重鎖のアミノ酸配列の中央部の領域は $\alpha$ ヘリックスを取りやすいことが二次構造予測から示され、更に疎水性アミノ酸が7残基毎に現われていることから、2分子がcoiled coilを形成する領域であるとされている。本章ではk a t遺伝子産物（以下K a t蛋白質と記す）のアミノ酸配列の特徴を調べることにより他のキネシン関連蛋白質に対する位置づけを試みた。

Fig.3-1 K a t 蛋白質と既知のキネシン関連蛋白質とのアミノ酸配列の比較（次ページ）

KatA、KatB、KatC、KatD、酵母のKAR3、ショウジョウバエのclaret segregation product (CAと記す) 及びキネシン重鎖 (KINと記す) のモータードメイン相当部分の配列を並列した。7個全ての蛋白質でアミノ酸残基が一致している部分には\*印を、一致していないが性質の似たアミノ酸残基のみ見られる部分には+印を付した。キネシン重鎖でA T P結合部位及び微小管結合部位と考えられている配列を下に示した。



KATA ELLRKKLHNTILELKGNIIRVFCRVRPLLPD-DGGRHEATVIA-YPTSTEAQGRGVDLVQS 472  
KATB EKLRLKHLHNTIQELKGNIRVFCRVRPLLSG-ENSSEEAKTIS-YPTSLAALGRGIDLLQN 428  
KATC EKLRLKHLHNTILELKGNIIRVFCRVRPLLP-ENNGDEGKTIS-YPTSLAALGRGIDLMQN 437  
KATD LEENRKLNLVQDLKGNIRVFCRVRPLPG-QESGGLSLED-IDEGTITIRVPSKYGKA 435  
KAR3 ETVRRTLHNLQELRGNIRVFCRIRPALKNLNSDTSLINVNEFDDNSGVQSMVEVTKION 429  
CA NMRKELHNTVMDLRGNIRVFCRIRPLES-EENRMCCTWTY-HDESTVELQSIDAQARS 389  
KIN MSAEREIPAEDSKVVCFRPLNDS-EEKAGSKFVVK-FNNNVE-----ENCIS 47

KATA -GNKHPTTFDKVFNHEASQEEVFVEISQ-LVQSALDGYKVCIFAYGQTSGSKTYTMMGRP 530  
KATB -GQSHCFTFDKVFPSPASQEDVFVEISQ-LVQSALDGYKVCIFAYGQTSGSKTYTMMGRP 486  
KATC -AQKHAFTFDKVFAPTASQEDVFVEISQ-LVQSALDGYKVCIFAYGQTSGSKTYTMMGRP 495  
KATD -GQKP-FMFNKVFGPSATQEEVFSDMQP-LVRSVLDGYNVCFAYGQTSGSKTYTMTGPK 492  
KAR3 TAQVHEFKFDKIFDQDNTNVDVFKVGVQ-LVQSALDGYKVCIFAYGQTSGSKTYTMTGPK 485  
CA KMGQIQIFSDQVFPSPASQEDVFVEISQ-LVQSALDGYKVCIFAYGQTSGSKTYTMDG-- 446  
KIN -IAGKVILFDKVFKNASQEKVYNEAAKSIVTDVLGYNGTIFAYGQTSGSKTYTMEGVI 106  
ATP binding

KATA EAPDQK-GLIPRLEQIFQASQSLGAQGWKYMVSMLEIYNETIRDLSTNRTTSMIDL 589  
KATB GNPDEK-GLIPRLEQIFQTRQSLRSQGWKYLQVSMLEIYNETIRDLSTNRTTSMIDL 541  
KATC GNVEEK-GLIPRLEQIFETRQSLRSQGWKYLQVSMLEIYNETIRDLSTNRTTSMIDL 550  
KATD ELTEESLGVNRYALADLFLLSNQ-RKDTTSYEISVQMLEIYNEQVRLDQAQD----QTK 547  
KAR3 -NPGD-GIIPSTISHIFNWKILKTKGWDYKVNCEFEIYENINIVDLRSDN----NN- 537  
CA -VPESV-GVIPRTVLDLSDIRGYRNLGWEYIKATFLEIYNEVLYDLRSDN----KDM 500  
KIN GDSVKQ-GIIPRIVNDIFNHIYAMEVN-LEFHIKVSYYEIMDKIRDLDSVK----VNL 160

KATA RADSGTSGKQYTIHVDNGHVSVDLTFDVCVSGKISSLLQQAQSRVSGKTMQNEQSS 649  
KATB RADNGVSPQKAIKHDASGNTHVVELTVVDVRSKQVSLDHAARNRSVGKTMAMNEQSS 601  
KATC RTDSGVSPQKAIKHDASGNTHVAELTILDVKSREVSFLDHAARNRSVGKTMQNEQSS 610  
KATD R-----LEIRNNSHNGINVPESALVPSSTDDVIQLMDLGHMNRVSSAMNDRSS 598  
KAR3 KEDTISGLKHEIRHDEQETKTTITNTVTSKLESEEMVEIILKKANKLRSTASTASNEHSS 597  
CA ----EIR-----MAKNKNNDIYVSNITEETVLDPNHLRHLMTAKMNRATASTAGNERSS 551  
KIN SVHEDKNRVPY-VK-GATERFVSSPEDVFEV-----IEEGKSNRHTAVTNMNEHSS 209  
microtubule binding

KATA RSHFVFTMRISGVNNESTEQQVQGVNLIDLAGSERLSKSGTGDRLEKTAQINKSLSALS 709  
KATB RSHFVFTLRISGVNNESTEQQVQGVNLIDLAGSERLSKSGTGDRLEKTAQINKSLSALS 661  
KATC RSHFVFTLRISGVNNESTEQQVQGVNLIDLAGSERLSKSGTGDRLEKTAQINKSLSALS 670  
KATD RSHSCVTVHVQGRDLTSGSILHGSMLVLDLAGSERVSKSEVTGDRLEKTAQINKSLSALS 658  
KAR3 RSHSIFIIHLSGNSNAKTGAHSYGTNLVLDLAGSERINVSQVVGDRLEKTAQINKSLSALS 657  
CA RSHAVTKLELIGRHAKEQISVGSINLVLDLAGSE----SPKTSTRMTETKINRSLSEL 607  
KIN RSHSVFLINVKQENLENOKKLSGLYLVDLAGSEKVSKTGAEGTVLDEARNINKSLSALS 269

KATA DVIFALAKKE---DHVPFRNSKLTLYLQPCLGDSKTLMFVNISPDPSTAGESLCSLRFA 766  
KATB DVIFALAKKE---DHVPFRNSKLTLYLQPCLGDSKTLMFVNISPDPSTAGESLCSLRFA 718  
KATC DVIFALAKKE---DHVPFRNSKLTLYLQPCLGDSKTLMFVNISPDPSTAGESLCSLRFA 727  
KATD DVISLSQKT---SHVPYRNSKLTQLQDSLGSAKTLMFVHISPDPDTLGETISTLKF 715  
KAR3 DVIHALGQPDSTKRHPFRNSKLTLYLQYSLTGDSKTLMFVNISPDPSTAGESLCSLRFA 717  
CA NVILALLQKQ---DHVPYRNSKLTQLQDSLGSAKTLMFVHISPDPDTLGETISTLKF 664  
KIN NVISALADGN--KTHIPYRNSKLTQLQDSLGSAKTLMFVHISPDPDTLGETISTLKF 327

KATA ARVNACEIGIPRQTSTKLLDSRLSYG 793  
KATB ARVNACEIGTAHRHVNRPLDYRLSLG 745  
KATC ARVNACEIGTPRQTNIKPLENRLSLG 754  
KATD ERVGSVELGAARVKNDSSEVKELKEQI 742  
KAR3 SKVNSTRLSVRK 729  
CA ASVNSCKMTKAKRNRNLYNNSVANSSTQ 691  
KIN PRAKTVKNVVCVNEELTAEWKRRYEK 354

KATB	MVGEMINNGRIRPSFPV---KDLTIN-----EGS	26
KATC	MVGEMINNGRIRPSFPVINGSKDLTPNSAPASTTGS	36
KATA	MASRNQNRPRSPNAKKEGLGGISFDKRRKVETQGGTGRRQAFSAVNKQDVTMNSDVGSI	60
KATB	EYGGPVEFTREDVETLHERIKYKSNYKERCENIMDYVKRLRLCIRWFQLELDYAFE	86
KATC	EYGPVEFTREDVETLNERIKYKSKFYKERCENMDYIKRLRLCIRWFQLELDYAFE	95
KATA	ECCGVETDKDEILALLSEBAK-AQKEDTKAKTEQMTDIKRIKVCVWFQOADETHVQE	119
KATB	QEKLNAMNEKHQCDLEVNLRVKEEELNMVDELKNEASVQVQLAKEQTEKLAANES	146
KATC	QEKLNALNELNEKHQCDMEVSLNKEEELNMDELKNEASVQVQLAKEQTEKLAANDS	155
KATA	KENLVKSLESSEQKYNHKELEARTKEEELQATISKEENNVSLHEKLAKESSTQDAIEC	179
KATB	LGKEBEARIAVESLOAAITTEELARTQGELOTANQRIQAVNDMYKLLQEYNSSSLQLYNSKL	206
KATC	LGKEKEARLSVEKAQAGLTEELGKAQGDLOTANQRIQSVNDMYKLLQEYNSSSLQLYNSKL	215
KATA	HRREKEARVAPEKMQASIGEEIDGVKEEKMAKQKVTSLDPMYKRLQEYNTSLQDYNKSL	239
KATB	QGDLEAHENIKRGEKERTGIVESIGNLKQGFALQDQLAASKVSDMMKQKDELVNEI	266
KATC	QGDLEAHETIKRGEKERTATIGENIGNLKQGFALQDQLAASKVSDMMKQKDELVNEI	275
KATA	QTDIETVRAALTBAKEKKSSTIENLSTIRGHSEKLODOLSSSTIODDAIKQKDSILSEV	299
KATB	VSLKVELQOVKDDDRDHITTEITLQAEATKQ-----NDFKDTINELSKSCSVQN	315
KATC	ASLKVELQOVKDDDRDHILEVKTLDTEATKY-----NDFKDAITTEITTCSSQS	324
KATA	TNIRNELQOVKDDDRDHVQSQRLSEETIRKYQENVGKSSQELDILTAKSGSLEETCSLCK	359
KATB	KEITELODOLVASERKLOVADLSTFEKMNEFEQKESIMELKGRLEEAELKIIEGEKLRK	375
KATC	TOURQLODRLVNSERRLOVSDLSTFEKMNEFEQKOSIIDLKSRVEEAELKIIEGEKLRK	384
KATA	ERLNMIEQOLNIANEBOKMADASVSLTRTEFEQKHLLCELODRJADMEHCICEGFTLRK	419
KATB	KLHNTIQLKGNIRVFCRVRPLISGENSSSEAKTISYPTSLAALGRGIDILONGOSHCFE	435
KATC	KLHNTILELKGNIIRVFCRVRPLLPGENNGDEGKTISYPTSLAALGRGIDIMONAKHAFET	444
KATA	KLHNTILELKGNIIRVFCRVRPLLEDGGRHEATVITAYPTSTEACGRGVQDVQSGNKHAFET	479
KATB	FDKVFESASQEDVFEISQLVQSALDGYKVCIFAYGQTGSGKTYTMMGRPGNPDEKGLI	495
KATC	FDKVFETASQEDVFEISQLVQSALDGYKVCIFAYGQTGSGKTYTMMGRPGNPVEKGLI	504
KATA	FDKVFENHEASQEEVFEISQLVQSALDGYKVCIFAYGQTGSGKTYTMMGRPEAPDQKGLI	539
KATB	PRCLEQIFQTRQSLRSQGWYELQVSMLEIYNETIRDLLSTNK----EAVRADNGVSPQK	551
KATC	PRCLEQIFETRQSLRSQGWYELQVSMLEIYNETIRDLLSTNK----EAVRADSGVSPQK	560
KATA	PRGLEQIFQASQSLGAQGWYKMQVSMLEIYNETIRDLLSTNRTTSMDIVRADSGTSGKQ	599
KATB	YAIKHDASGNTHVVELTVVDVRSKQVSFLDHAARNRSVGKTMNEQSSRSHFVFTLRI	611
KATC	YAIKHDASGNTHVVELTILDVKSREVSFLDHAARNRSVGKTMNEQSSRSHFVFTLRI	620
KATA	YTIITHDVNGRTHVSDLTTFDVQSVGKISGLIQQAQSRVSGKTMNEQSSRSHFVFTLRI	659
KATB	SGVNESTEQQVQGVNLNIDLASGERLSKSGSTGDRKQININKSLSSLDGVIFALAKKE	671
KATC	SGVNESTEQQVQGVNLNIDLASGERLSKSGSTGDRKQININKSLSSLDGVIFALAKKE	680
KATA	SGVNESTEQQVQGVNLNIDLASGERLSKSGATGDRKQININKSLSSLDGVIFALAKKE	719
KATB	DHVPFRNSKLTLYLQPCLGDSKTLMFVNIITPEPSSTGESLCSLRFAARVNACEIGTAHR	731
KATC	DHVPFRNSKLTLYLQPCLGDSKTLMFVNIITPEPSSTGESLCSLRFAARVNACEIGTPRR	740
KATA	DHVPFRNSKLTLYLQPCLGDSKTLMFVNIISPEPSSTGESLCSLRFAARVNACEIGIPRR	779
KATB	HYNARPLDYRLSLG	745
KATC	QTNIKPIENRSLG	754
KATA	QTSTKILLDSRLSVG	793

Fig.3-2 Kat蛋白質間のアミノ酸配列の比較

KatA, KatB, KatCのアミノ酸配列全体を並列した。互いに一致しているアミノ酸残基を枠で囲んで示した。



## 1. 結果

### 1) K a t 蛋白質と他の蛋白質とのアミノ酸配列との比較

K a t 蛋白質と既知の蛋白質とのアミノ酸配列を比較したところ、4種のK a t 蛋白質はいずれもC末端側にキネシン重鎖のモータードメインと類似の配列を有していた。F i g. 3-1で、キネシン重鎖（ショウジョウバエ）<sup>24)</sup>及び他のキネシン関連蛋白質であるK A R 3産物（酵母）<sup>31)</sup>、claret segregation product（ショウジョウバエ）<sup>35)</sup>とK a t 蛋白質との間で対応するアミノ酸配列を並列させた。キネシン重鎖のアミノ酸残基11番から332番までの領域と配列が一致している割合は、K a t A蛋白質の430番から771番までの領域で36%、K a t B蛋白質の386番から723番までの領域で36%、K a t C蛋白質の395番から732番までの領域で36%、K a t D蛋白質の393番から717番までの領域で40%であった。特にATP結合部位（キネシン重鎖の86番から106番）や微小管結合部位（129ないし174番から331番）等キネシン・スーパーファミリーに属する蛋白質の間で高く保存されている配列はK a t 蛋白質でも見出された。ただし、キネシン重鎖ではモータードメインがN末端側に位置するのに対し、K a t 蛋白質ではいずれもC末端側に相当する配列が存在する点が特徴である。モータードメイン様の配列をC末端側に持つ既知の蛋白質として酵母のK A R 3産物が挙げられるが、これとの類似度は更に高く、K A R 3産物のアミノ酸残基376番から722番までの領域で配列が一致している割合は、K a t A蛋白質の421番から771番までの領域で46%、K a t B蛋白質の377番から723番までの領域で49%、K a t C蛋白質の386番から732番の領域で49%、K a t Dの384番から720番までの領域で41%であった。しかし、K a t 蛋白質のN末端側領域に関しては、データベース（S W I S S - P R O T、N B R F - P D B）中に既知の蛋白質の中に類似したものは見出

されなかった。

一方、K a t 蛋白質同士では、K a t B 蛋白質と K a t C 蛋白質とが全体で 84 % のアミノ酸配列の一致が見られた。しかし、K a t A 蛋白質と K a t B 蛋白質とでは全体では 59 % にとどまり、K a t D については C 末端領域以外では他の 3 個と類似の配列は見出されなかった。K a t A、B、C 蛋白質の全長のアミノ酸配列の並列を F i g 3-2 に示す。

## 2) K a t 蛋白質の二次構造予測

ジョイント法<sup>55)</sup> によって K a t 蛋白質の二次構造を予測した。この方法は 5 種類の異なる二次構造予測法 (Gibrat-Garnier-Robson の方法、Ptitsyn-Finkelstein の方法、Nagano の方法、Nishikawa-Ooi の方法、Qian-Sejnowski の方法) を併用することにより予測の信頼度を高める方法である。その結果を F i g 3-3 に図示する。それによると、K a t A 蛋白質のアミノ酸残基 429 番から C 末端側、K a t B 蛋白質の 386 番から C 末端側、K a t C 蛋白質の 394 番から C 末端側、K a t D 蛋白質の 392 番から C 末端側の各領域にはいずれも、 $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ シート、コイルといった構造が交互に混ざって存在すると予測された。これより、これらの領域は球状のドメインとなっていると考えられる。すなわち、これらの領域はアミノ酸配列がキネシン重鎖のモータードメインと類似していることに加え、予測される二次構造もモータードメインに類似していると言える<sup>24)</sup>。一方、K a t A 蛋白質のアミノ酸残基 70 番から 428 番、K a t B 蛋白質の 36 番から 385 番、K a t C 蛋白質の 46 番から 393 番の各領域は  $\alpha$ ヘリックスを取る可能性が高いと予測された。しかもそれらの領域では疎水性アミノ酸が 7 残基ごとに並んでいることから (F i g. 3-4)、それらの領域は 2 分子が c o i l e d c o i l を形成して二量体となるのを仲介する領域である可能性が高い。これもキネシン<sup>24)</sup> 及び他のキネシン関連蛋白質<sup>31) 36)</sup> に



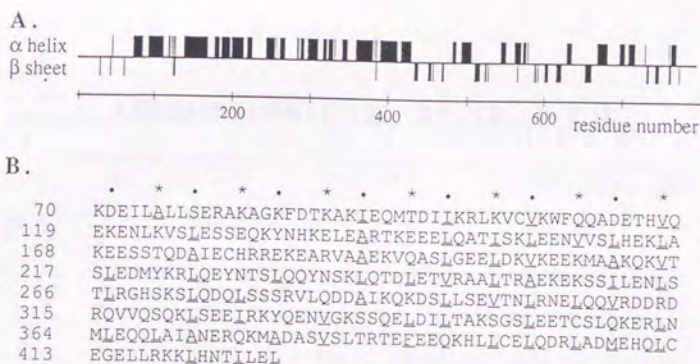


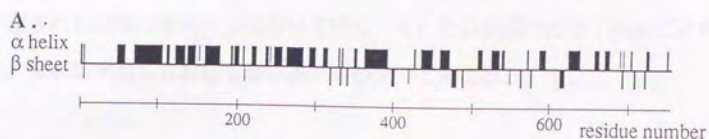
Fig.3-3 K a t A蛋白質の二次構造予測

Aではジョイント法による二次構造予測結果をグラフに示した。横軸はアミノ酸配列を表す。上向きの線はその場所で $\alpha$ ヘリックス構造を、下向きの線は $\beta$ シート構造をとると予測されたことを示す。それ以外の部分はコイルを示す。Bでは中央の $\alpha$ ヘリックスに富む領域中に見られる疎水性アミノ酸残基のくり返し配列を示した。7残基ごとの疎水性アミノ酸に下線を付した。



Fig.3-4 K a t B蛋白質の二次構造予測

Aではジョイント法による二次構造予測結果をFig.3-4と同様にグラフに示した。BではFig.3-4と同様に中央の $\alpha$ ヘリックスに富む領域中に見られる疎水性アミノ酸残基のくり返し配列を示した。



B.

46	EDVETLLNERIKYKSKFNYKERCENMMDYIKRLRLCIRWFQELELDYAF
95	EQEKLNKALELNEKHCVDMEVSLKNKEEELNMIIEELRNKFESVQVQLA
144	REQTEKLAANDSLGKEKEARLSVEKAQAGLTEELGKAQGDLOTANQRIQ
193	SYNDMYKLLQEYNSSLQLYNSKLQGDLEAHETIKRGEKERTAIENIG
242	NLKGQFSALQEQLAASKASQEDIMKQKGLVNEIASLKVELQQVKDDRD
291	RHLVEVKTLLQTEATKYNDPKDAITELETTCSSTQIRQLQDRLVNSER
340	RLQVSDLSLTFEKMNEYEDQKQSIIDLKSRVEEAELKLVEGEKLRKKLHN
389	TILEL

Fig.3-5 K a t C蛋白質の二次構造予測

Aではジョイント法による二次構造予測結果をFig.3-4と同様にグラフに示した。BではFig.3-4と同様に中央の $\alpha$ ヘリックスに富む領域中に見られる疎水性アミノ酸残基のくり返し配列を示した。

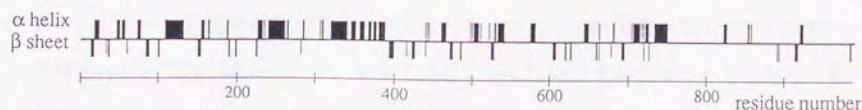


Fig.3-6 K a t D蛋白質の二次構造予測

ジョイント法による二次構造予測結果をFig.3-4と同様にグラフに示した。



も見られる特徴である。ところが、K a t D蛋白質は、中央部分で $\alpha$ ヘリックスを取ると予測された範囲は他の三つに比べて短く、またその領域内には7残基ごとの疎水性アミノ酸の繰り返しも存在しない点で他の3つと異なる。

## 2. 考察

本章では、まず4種のK a t蛋白質ではキネシン重鎖のモータードメインと類似の配列がC末端側にあることを示した。しかし、N末端側領域ではいずれも既知の蛋白質と類似の配列は見出されなかった。このことから、K a t蛋白質はキネシンと相同なモータードメインを持ち同様な微小管モーター活性を有しているが、細胞内では既知のキネシン関連蛋白質とは違う役割を担っているような別個の蛋白質であると考えられる。キネシン・スーパーファミリーは共通のモータードメインに各々特有の尾部ドメインが連結したような構造を持つ蛋白質の集合であるが、K a t蛋白質もその一員として加えることができよう。ただし、尾部ドメインに相当する領域には他に類似の配列を有する蛋白質が見つからないので、K a t蛋白質はスーパーファミリーの中でも新規の範疇に属する可能性がある。4種のK a t蛋白質はいずれもC末端側にモータードメインに相当する配列を有しており、その点がN末端側にモータードメインが位置するキネシン重鎖と異なる。K a t蛋白質と同様にC末端側にモータードメインに相当する配列を有する蛋白質として酵母のK A R 3産物があるが、これとの類似性は更に高く、機能の面でも近い可能性がある。K a t蛋白質同士では、K a t BとK a t CとはN末端からC末端まで全体にわたってアミノ酸配列が似ており、同様の機能を持つ可能性が高い。一方、K a t AとK a t DのN末端領域は他と類似した配列は見出されず、それぞれ異なる機能を持っていると思われる。

アミノ酸配列の二次構造予測によると、K a t蛋白質のモータードメインに相当する領域はいずれもキネシン重鎖のモータードメインに見られるような二次構造のパタ

ーンを示し、この点からもK a t 蛋白質がキネシン・スーパーファミリーに属するものであることが支持される。しかもK a t A、B、Cに関しては、ポリペプチドの中央部分に2分子がc o i l e d c o i lを形成するような構造が予測され、キネシンに特徴的な構造がK a t 蛋白質でも見られることが示された。



#### 第四章 K a t 蛋白質の活性の検出

本章では、K a t 蛋白質が実際にキネシン様の活性を有するかどうかを *in vitro* で試験した。キネシンは A T P 感受性の微小管結合能を有する。それと関連して、A T P のアナログである 5'-adenylylimidodiphosphate (A M P P N P) の存在下では微小管に安定に結合した状態が保たれる。この性質を用いて、種々の生物種からキネシンを精製する際の第一段階の濃縮法として、A M P P N P 存在下で微小管を超速心分離することによりキネシンを微小管に付着させて他の可溶成分から分離する手法が一般に行われている。また、キネシンはそれ自身のみでも微弱な A T P a s e 活性を有するが、それに微小管を添加することにより A T P a s e 活性が数倍に増幅されることが知られている。これらの性質はキネシン、ダイニンといった微小管モーター蛋白質に特徴的に見られるものである。そこで K a t 蛋白質も同様の性質を有しているかどうかを調べた。キネシンの微小管モーター活性の発現には重鎖の N 末端モータードメインの 450 残基のみで十分であることが知られているので、本章では K a t C 蛋白質を用いて、モータードメインに相当する C 末端側の領域を含むが N 末端領域は含まないようなポリペプチドを用いてアッセイを行った。

##### 1. 材料と方法

##### K a t C (207-754) 蛋白質の大量発現と精製

k a t C の c D N A 中の約 1.7 k b の *H i n d I I I* 断片 (塩基配列 868 番から 2560 番) を発現ベクター p Q E 9 (Q I A G E N) の *H i n d I I I* 切断部位に組み込んだ。この発現ベクターは挿入した D N A 断片のコードするアミノ酸配列を、ベクター上にコードされている *H i s* 6 個その他のアミノ酸配列に融合させて発現させるものである。この翻訳部分の上流には *l a c* オペレーターを含むバクテリオファ

ージT5のプロモーターが存在している。このプラスミドの宿主には大腸菌M15 [pREP4]株(QIAGEN)を用いた。この宿主菌は*lac*リプレッサーをコードする遺伝子*lacI*がのっているプラスミドpREP4を発現ベクターとは別個に保持しており、そのため通常は発現ベクター上のT5プロモーターからの転写は抑制されている。そして培養中に随時IPTGを添加することによりT5プロモーターからの転写を誘導し、目的の蛋白質を発現させることができる。このプラスミドを導入した大腸菌をLB培地中37℃で培養した。そしてOD0.7に達した時にIPTGを0.2mMになるように添加し、以降20℃で一晩培養した。こうして、KatC蛋白質のアミノ酸残基207番からC末端までの領域に6個のHisがN末端に連結しているようなポリペプチド(KatC(207-754)蛋白質と記す)を発現させた。その培養液から3500g、20分間の遠心によって菌体を集めて4倍容のバッファー(100mM Pipes (pH6.9)、300mM NaCl、10mM 2-mercaptoethanol、1mM PMSF、1μg/ml leupeptin)に懸濁させた。それを超音波破碎し、6000g、20分間遠心してその上清を集めた。それをNi-NTAアガロース(QIAGEN)カラムに添加し、上記のバッファーにimidazole (pH6.9)を100mM加えたものでカラムを洗い、imidazole (pH6.9)を250mM加えたもので溶出した。それにMgSO<sub>4</sub>を1mM、DTTを2mMになるように加え、セントリコン30(amicon)で濃縮してKatC(207-754)蛋白質標品とした。

#### チューブリンの精製

文献56)57)の方法を参考にして行った。ウシの脳(芝浦臓器、品川)から大脳を取り出し、そのうちの250gに190mlのPEM-4Mバッファー(4M glycerol、1mM 2-mercaptoethanol in PEM)(PEM:100mM Pipes (pH6.9)、1mM EGTA、1mM MgSO<sub>4</sub>)加えてミキサーを用いて組織を破碎した。それを3500g、10分間(4℃)遠心し、続いてその上清を7



0 0 0 0 g、6 0 分間 (4°C) 遠心した。その上清に GTP を 0.1 mM、ATP を 2.5 mM になるように加え、3 4°C、3 5 分間保温した。それを 1 0 0 0 0 0 g、5 0 分間 (3 0°C) 遠心した。上清を捨て、沈殿を 4 0 ml の PEM バッファーに溶かし、氷中に 3 0 分間おいた。それを 1 0 0 0 0 0 g、5 0 分間 (4°C) 遠心し、上清を集めた。それに等容の PM-8 M バッファー (8 M glycerol、2 mM GTP in PEM) を加えて 3 4°C、3 5 分間保温した。それを 1 0 0 0 0 0 g、5 0 分間 (3 0°C) 遠心し、得られる沈殿を 1 0 ml の PEM に溶かした。それを氷中に 3 0 分間おき、1 0 0 0 0 0 g、5 0 分間 (4°C) 遠心し、上清を集め、それを Twice-cycled Microtubule Protein とした。以上で 1 3 3 mg の微小管蛋白質が得られた。次に、そのうちの 1 0 0 mg のサンプルを NaCl 濃度 0.2 5 M として DEAE-Sephadex A-50 (ファルマシア) (4 ml。平衡化バッファー (0.2 5 M NaCl、0.1 mM GTP in PEM) で平衡化したもの) カラムに添加し、平衡化バッファーで洗った後、溶出バッファー (0.5 M NaCl、0.1 mM GTP in PEM) でチューブリンを溶出した。それを 0.1 mM GTP in PEM に対して透析し、セントリコン 3 0 (amicon) で濃縮した。それをチューブリン標品とした。

#### KatC(207-754)蛋白質の ATPase 活性の測定

文献 5 8) に基づき次のように行った。KatC(207-754)蛋白質 1 0 μg を 1 mg/ml チューブリン (2 0 μM taxol、2 mM GTP in PEM 中で室温に 3 0 分間おいて重合させたもの) を含む (または含まない) 反応液 (1 0 μM taxol、1 mM GTP、2 mM DTT in PEM) (PEM バッファー: 1 0 0 mM Pipes (pH 6.9)、1 mM EGTA、1 mM MgSO<sub>4</sub>) に加えて室温に 5 分間おき、[γ-<sup>32</sup>P] ATP (1 × 1 0<sup>4</sup> cpm/nmol) を 1 mM になるように加えて全体を 1 0 0 μl にして反応を開始させた。室温で 1 0 分間または 1 5 分間反応させ、1 0 % SDS を 1 0 μl 加えて反応を止め、更にリン酸試薬 (1 0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 0 %

(w/v) ammonium molybdate, 0.1 N silicotungstic acidをそれぞれ2:2:1の割合で混ぜたもの) 100  $\mu$ lと65:35のxylene/isobutanolとを1ml加えて15秒間激しく混ぜ、それを数秒間遠心分離して、生じる上層の0.5 mlをとりシンチレーター (0.8% omnifluor (NEN) in 70:30 (v/v) toluene:ethanol) 5 mlに入れ、液体シンチレーションカウンター (ベックマン) で計測した。同時にKatC (207-754)蛋白質を入れないで同様の操作を行い、その時の値をKatC (207-754)蛋白質を入れた場合の値から差し引くことによってATPase活性を計算した。

#### KatC (207-754)蛋白質と微小管との結合実験

反応液 (1 mg/ml tubulin (taxolにより重合させたもの)、20  $\mu$ M taxol、1 mM GTP、2 mM DTT、2.5 mM AMPPNP、2.5 mM  $MgSO_4$  in PEM) にKatC (207-754)蛋白質を20  $\mu$ g加えて200  $\mu$ lにし、室温に15分間おいた。それを卓上超遠心 (ベックマン) で100000 g、30分間 (22°C) 遠心した。得られる上清と沈殿とを分け、次に沈殿を200  $\mu$ lの溶液 (20  $\mu$ M taxol、1 mM GTP、2 mM DTT、2.5 mM AMPPNP、2.5 mM  $MgSO_4$  in PEM) に溶かし、それを再び遠心した (100000 g、30分間 (22°C))。得られる上清と沈殿とを分け、次にその沈殿を200  $\mu$ lのATP抽出溶液 (10 mM  $MgATP$ 、20  $\mu$ M taxol、1 mM GTP、2 mM DTT in PEM) に溶かし、室温に15分間おいた。それを超遠心し (100000 g、30分間 (22°C)) 上清と沈殿とに分けた。対照実験としては、AMPPNPの代わりにATPを用いて同様の操作を行った。

## 2. 結果

KatC蛋白質のアミノ酸残基207番からC末端までをコードするDNA断片を



発現ベクター pQE9 に組み込んだ。この発現ベクターは挿入した DNA 断片のコードするアミノ酸配列をベクター上にコードされている His 6 個その他のアミノ酸配列に融合させて発現させるものである。そのプラスミドによって KatC 蛋白質の 207 番から 754 番までのアミノ酸配列の N 末端に His が 6 個付加したようなポリペプチド (KatC(207-754)蛋白質) を大腸菌の系を用いて発現させた。そしてその菌体の抽出液から Ni-NTA アガロースを用いて発現させたポリペプチドを精製した (Fig. 4-1A)。これとウシの脳から精製したチューブリン (Fig. 4-1B) とを組合せた実験によって、キネシンに特有な微小管添加による ATPase 活性の上昇、及び ATP のアナログである 5'-adenylylimidodiphosphate (AMP-PNP) 添加によって誘起される微小管との安定な結合の検出を試みた。キネシンでは重鎖のモータードメインのみで微小管モーター活性を有することが知られているので、KatC 蛋白質の場合もその一部分のみの配列を持つ KatC(207-754)蛋白質で上記の活性が検出されることが期待された。

その結果を Fig. 4-2、4-3 に示す。KatC(207-754)蛋白質の ATPase 活性はチューブリン非存在下では  $0.8 \pm 0.4$  nmol/min/mg (10 回の実験の平均値)、チューブリン 1 mg/ml 存在下では  $2.5 \pm 0.4$  nmol/min/mg (10 回の実験の平均値) と測定され、チューブリン添加により 3 倍の上昇が観察された。また、Fig. 4-3 では、KatC(207-754)蛋白質が AMP-PNP 存在時には重合チューブリンと安定に結合して超遠心分離でチューブリンとともに沈殿に來ること (レーン 3、4)、その沈殿を ATP を含む溶液に溶かすと KatC(207-754)蛋白質が重合チューブリンから離れ、再び超遠心を行うと上清にくること (レーン 6、7) が確認できる。比較のために AMP-PNP の代わりに ATP の存在下で同様の実験を行ったところ、超遠心で KatC(207-754)蛋白質のほとんどは重合チューブリンと挙動をともにせず (レーン 8、9)、重合チューブリンとの安定な結合を引き起こすのは AMP-PNP に特有の働きであることがわかった。また、KatC(207-754)蛋白質が AMP-PNP 添加によ

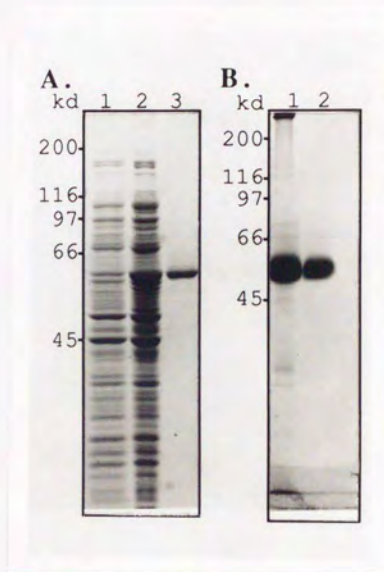


Fig.4-1 K a t C(207-754)蛋白質とチューブリンの精製

AではK a t C(207-754)蛋白質発現菌のI P T G添加前の菌体の全抽出物（レーン1）、I P T G添加後一晚培養した菌体の全抽出物（レーン2）、N i -N T Aアガロースからの250mM imidazole溶出画分（レーン3）をS D S -P A G Eに供し、C B B染色を行った。

BではTwice-cycled Microtubule Protein（レーン1）、DEAE-Sephadex A50カラムから0.5 M-N a C lで溶出したチューブリン（レーン2）をS D S -P A G Eに供し、C B B染色を行った。



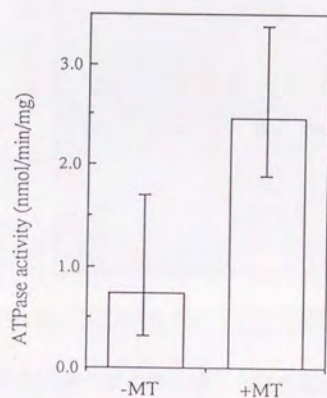


Fig.4-2 K a t C(207-754)蛋白質のATPase 活性

-MTは重合チューブリン非存在下、+MTは重合チューブリン1mg/ml存在下でのATPase活性を示す。それぞれ10回づつ実験を行い、その平均値と最大値・最小値とを示した。

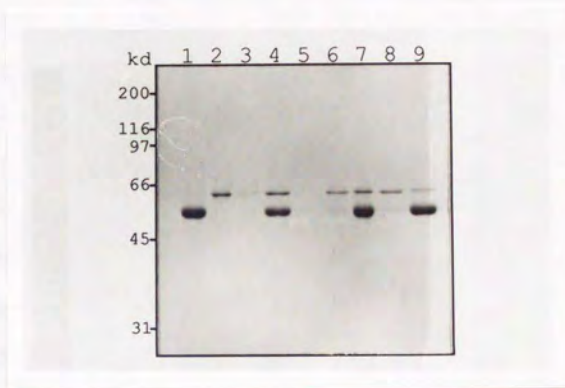


Fig.4-3 K a t C(207-754)蛋白質の微小管との結合実験

チューブリンのみ（レーン1）、K a t C(207-754)蛋白質のみ（レーン2）、AM P P N P 存在下でK a t C(207-754)蛋白質と重合チューブリンを混ぜて超遠心分離して得られる上清（レーン3）及び沈殿（レーン4）、その沈殿をAM P P N Pを含む溶液に懸濁して超遠心分離して得られる上清（レーン5）、得られた沈殿をAT P抽出溶液に懸濁して超遠心分離して得られる上清（レーン6）及び沈殿（レーン7）、AT P 存在下でK a t C(207-754)蛋白質と重合チューブリンを混ぜて超遠心分離して得られる上清（レーン8）及び沈殿（レーン9）をSDS-PAGEに供し、CBB染色を行った。



って結合しているチューブリンからK a t C(207-754)蛋白質が溶出されるのも、A T P に特有の働きであることが判明した (レーン5、6)。

### 3. 考察

本章では、K a t 蛋白質のうちK a t C蛋白質を選び、そのモータードメインに相当する領域を含むポリペプチドK a t C(207-754)蛋白質が *i n v i t r o* でキネシンに特徴的な性質を持つかどうかを試験した。その結果、重合チューブリンを添加することによってA T P a s e 活性が3倍に上昇するのが検出された。また、A M P P N P を添加することによって重合チューブリンとの安定な結合が誘起され、A T P の添加によってその結合から遊離されることが観察された。これより、アミノ酸配列の類似性のみならず、K a t C蛋白質が実際にキネシンに類似した性質を有していることが示された。

K a t C(207-754)蛋白質のアッセイは全て室温で行った。これはシロイヌナズナの栽培は室温付近 (22°C) で行っていることを考慮したためである。ウシの脳から精製されたキネシンのA T P a s e 活性は37°Cでチューブリン非存在下で0.05  $\mu$  mol/min/mg、1 mg/mlチューブリン存在下では0.31  $\mu$  mol/min/mgと報告されている<sup>15)</sup>。検出されたK a t C(207-754)蛋白質の活性はこの値に比べて、チューブリン非存在下で60分の1、チューブリン存在下で120分の1にとどまっていた。その理由として、反応温度の違い、蛋白質の性質の違い、K a t C(207-754)蛋白質サンプルの劣化等が考えられる。また、ウシ脳キネシンではチューブリン添加により活性が約6倍にまで上昇するのに比べ、K a t C(207-754)蛋白質では3倍にとどまった。ウシ脳のキネシンのアッセイでは同じウシ脳から精製したチューブリンと組み合わせているが、K a t C(207-754)蛋白質のアッセイでもウシ脳のチューブリンとのヘテロな組み合わせであるため、K a t C(207-754)蛋白質とチューブリンとの相互作用が弱く、

活性化が不完全であったということも考えられる。



## 第五章 植物細胞からのK a t 蛋白質の検出

植物細胞内には小胞やオルガネラ等の微小管依存性の輸送系が存在するにもかかわらず、微小管モーター蛋白質の存在に関する報告はほとんどなかった。最近、タバコ (*Nicotiana tabacum*) の花粉管中にウシ脳のキネシン重鎖に対する抗体と反応するポリペプチドが存在することが示されたが、その他の一般の植物組織でキネシン様蛋白質の存在を示す報告はない。一般の植物細胞中にはいろいろな微小管構造が存在し、また、微小管依存性の小胞やオルガネラ等の輸送系も存在するが、それに関与すると思われる微小管モーター蛋白質に関する知見はほとんど無いのが現状である。本章では、シロイヌナズナのcDNAライブラリーからクローン化したk a t 遺伝子産物が実際に発現して植物細胞内で機能しているかどうかを調べるために、まずK a t 蛋白質の抗体を用いてシロイヌナズナやタバコ培養細胞中でのK a t 蛋白質の存在を検出することを試みた。

### 1. 材料と方法

#### タバコ培養細胞BY-2

日本たばこ産業株式会社たばこ中央研究所より分与された。

#### BY-2細胞の培養

Linsmaier and Skoogの培地<sup>60)</sup>にsucroseを3%、2,4-Dを0.2 mg/l、myoinositolを100 mg/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を200 mg/ml加えた培地80 mlを300 mlの三角フラスコに入れ、それに7日目の培養液を5 ml移し、27℃で振盪培養した。

#### K a t B(5-249)蛋白質の大量発現と精製

オリゴヌクレオチド 5'GCGCGGATCCATGACGAACAATGGAAGAATCC3' 及び 5'GCGCGGATCCCTTCGAGGCAGCAAGCTG3' をプライマーに用いて *k a t B c* DNA 1  $\mu$ g を鋳型として反応液に加え (バッファーの組成は第一章と同様)、94°C 1分、55°C 30秒、72°C 1.5分のサイクルを20回繰り返すPCRを行った。これにより、*k a t B c* DNAの塩基配列186番から920番までのDNA領域の両端に *B a m*HI 切断部位を付加したようなDNA断片を合成した。それを *B a m*HI で消化して発現ベクター pQE16 (QIAGEN) の *B a m*HI-*B g* l I I 部位に組み込み、そのプラスミドを大腸菌M15 [pREP4] (QIAGEN) に導入した。この発現ベクターは第四章で用いた pQE9 と同様に、挿入したDNA断片のコードするアミノ酸配列をベクター上にコードされている *H i s* 6個その他のアミノ酸配列に融合させて発現させるものである。それをLB培地中37°Cで培養し、OD0.7でIPTGを1mMになるように添加し、以降37°Cで3時間培養した。こうして *K a t B* 蛋白質のアミノ酸配列5番から249番までの領域のC末端に *H i s* が6個付加したようなポリペプチドを発現させた。このポリペプチド (以下 *K a t B* (5-249)蛋白質と記す) は大腸菌細胞内でインクルージョンボディーとなったので以下のように可溶化してから精製した。その培養液から3500g、20分間の遠心によって菌体を集め、それを5倍容の超音波破碎用バッファー (50mM  $N a H_2 P O_4$  (pH8.0)、300mM  $N a C l$ 、10mM 2-mercaptoethanol) に懸濁して超音波破碎した。それを6000g、20分間 (4°C) 遠心し、得られる沈殿を最初の菌体の2.5倍容の溶液 (6M guanidine hydrochloride、0.1M  $N a H_2 P O_4$ 、10mM *T r i s*、10mM 2-mercaptoethanol (pH7.5)) に懸濁して室温で1時間攪拌した。それを6000g、20分間 (室温) 遠心し、得られる上清を *N i*-NTAアガロース (QIAGEN) カラムに添加した。バッファー (8M urea、0.1M  $N a H_2 P O_4$ 、10mM *T r i s*、10mM 2-mercaptoethanol (pH6.8) でカラムを洗い、同じ組成でpH5.8のバッファーで目的のポリペプ



チドを溶出した。次に蛋白質調製用の電気泳動装置 (Cell Prep, BioRad) を用いて SDS-PAGE (14% アクリルアミド) により単一のポリペプチドとして精製し、KatB(5-249)蛋白質標品とした。

#### KatC(207-754)蛋白質の大量発現と精製

第四章と同様に KatC(207-754)蛋白質を大腸菌の系を用いて発現させた。その菌体を集め、4 倍容の溶液 (6M guanidine hydrochloride、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10mM Tris、10mM 2-mercaptoethanol (pH 7.5)) に懸濁して超音波破碎を行った。それを 6000g、20 分間 (室温) 遠心し、得られる上清を Ni-NTA アガロース (QIAGEN) カラムに添加した。バッファー (8M urea、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10mM Tris、10mM 2-mercaptoethanol (pH 6.8)) でカラムを洗い、同じ組成で pH 5.8 のバッファーで目的のポリペプチドを溶出し KatC(207-754)蛋白質標品とした。

#### KatD(230-380)蛋白質の大量発現と精製

オリゴヌクレオチド 5'CGCGGATCCCGGTCATTCATTGCAGACAG3' 及び 5'GCGGGATCCTTCTTCAAGAACCCTTTTGTAA3' をプライマーに用いて *katDc* DNA 1  $\mu\text{g}$  を鋳型として反応液に加え (バッファーの組成は第一章と同様)、94  $^{\circ}\text{C}$  1 分、55  $^{\circ}\text{C}$  30 秒、72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 分のサイクルを 20 回繰り返す PCR を行った。これにより、*katDc* DNA の塩基配列 735 番から 1187 番までの DNA 領域の両端に BamHI 切断部位を付加したような DNA 断片を合成した。それを BamHI で消化して発現ベクター pQE16 (QIAGEN) の BamHI-BglII 部位に組み込み、そのプラスミドを大腸菌 M15 [pREP4] (QIAGEN) に導入した。それを LB 培地中 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養し、OD 0.7 で IPTG を 2 mM になるように添加し、以降 37  $^{\circ}\text{C}$  で 3 時間培養した。こうして KatD 蛋白質のアミノ酸配

列230番から380番までの領域のC末端にHisが6個付加したようなポリペプチドを発現させた。このポリペプチド（以下KatD(230-380)蛋白質と記す）は大腸菌細胞内でインクルージョンボディーとなったのでKatB(5-249)蛋白質の場合と同様に可溶化してから精製した。その培養液から3500g、20分間の遠心によって菌体を集め、それを5倍容の超音波破碎用バッファー（50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ （pH8.0）、300mM  $\text{NaCl}$ 、10mM 2-mercaptoethanol）に懸濁して超音波破碎した。それを6000g、20分間（4℃）遠心し、得られる沈殿を最初の菌体の2.5倍容の溶液（6M guanidine hydrochloride、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10mM Tris、10mM 2-mercaptoethanol（pH7.5））に懸濁して室温で1時間攪拌した。それを6000g、20分間（室温）遠心し、得られる上清をNi-NTAアガロース（QIAGEN）カラムに添加した。バッファー（8M urea、0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10mM Tris、10mM 2-mercaptoethanol（pH6.8））でカラムを洗い、同じ組成でpH5.8のバッファーで目的のポリペプチドを溶出し、KatD(230-380)蛋白質標品とした。

#### 抗血清の作製

精製したKatB(5-249)蛋白質1.5mg及びKatC(207-754)蛋白質1.5mgをそれぞれウサギ（日本白色種、メス、日本生物材料センター）2羽づつに免疫した。最初に1羽につき300 $\mu\text{g}$ の蛋白質サンプルを等容のフロイントの完全アジュバントと混合し、下肢の筋肉中に注射した。次に、その3週間後に250 $\mu\text{g}$ の蛋白質サンプルを等容のフロイントの不完全アジュバントと混合し、同様に下肢の筋肉中に注射した。更にその2週間後に200 $\mu\text{g}$ のサンプルを同様にフロイントの不完全アジュバントと混合し、注射した。そしてその1週間後に心臓から全採血を行った。各注射及び採血の際に、精製したKatB(5-249)蛋白質及びKatC(207-754)蛋白質を用いてELISAにより血液中の抗体価の上昇を確認した。



#### K a t 蛋白質に特異的な抗体の精製

K a t B(5-249)蛋白質 4mg、K a t C(207-754)蛋白質4mg、K a t D(230-380)蛋白質4mgを各々CNBr-activated Sepharose 4B (ファルマシア) 1mlづつに固定してアフィニティークロマトグラフィー用ゲルを調製した。ただしK a t C(207-754)蛋白質に関しては、第四章に記した方法 (guanidine hydrochlorideやureaなどで変成させない) によって精製したものを用いた。抗K a t B(5-249)蛋白質抗血清 3mlを10mMのT r i s-HC l (pH 7.5) で30mlに希釈してK a t D(230-380)蛋白質カラムに添加し、その素通り画分をK a t B(5-249)蛋白質カラムに添加した。それを10mM-T r i s-HC l (pH 7.5)、10mM-T r i s-HC l (pH 7.5) / 1M-N a C l、10mM-T r i s-HC l (pH 7.5) で続けて洗ったのち、100mM-glycine (pH 2.5) で溶出した。それに即座に1M-T r i s-HC l (pH 8.0) を1/10容加えて中和し、P B S (20mM sodium phosphate (pH 7.2)、0.145M N a C l) に対して透析を行った。最後にセントリコン30 (a m i c o n) で濃縮し、抗K a t B(5-249)蛋白質抗体標品とした。抗K a t C(207-754)蛋白質抗体の場合も同様に、抗血清をK a t D(230-380)蛋白質カラムに通してからK a t C(207-754)蛋白質カラムに添加し、精製・濃縮して標品を得た。

#### タバコ培養細胞B Y-2からの微小管モーター蛋白質の濃縮

培養2日目のB Y-2細胞6gを1×P E Mバッファー (100mM P i p e s (pH 6.9)、1mM E G T A、1mM M g S O<sub>4</sub>) で1回洗浄し、溶液 (7.5mM D T T、15μg/ml leupeptin、15μg/ml pepstatinA、15μg/ml aprotinin、15μg/ml tosyl arginine methyl ester hydrochloride in 1.5×P E M) 6mlに懸濁して超音波破碎し、それを6000g、10分間 (4℃) 遠心し、その上清を次に100000g、30分間 (4℃) 遠心 (ベックマン75 T i ローター) し、

その上清を6.84ml集めた。それにGTPを1mM、taxolを20 $\mu$ M、tubulin (taxol, GTP存在下で重合させたもの)を1mg/ml、AMPPNPを2.5mM、sodium tripolyphosphateを2.5mMになるように加えて8mlにし、氷中に30分間おいた。次にそれを遠心チューブ内でsucrose cushion (20% sucrose、1mM GTP、20 $\mu$ M taxol、5mM DTT、2.5mM AMPPNP in PEM) 800 $\mu$ lに重層し、100000g、30分間(4 $^{\circ}$ C) (ベックマンSW50.1ローター) 遠心した。得られる沈殿をATP溶出バッファー (1mM GTP、20 $\mu$ M taxol、5mM DTT、10mM ATP、20mM MgSO<sub>4</sub>、100mM NaCl in PEM) 300 $\mu$ lに溶かし、氷中に1時間おいた。それを100000g、30分間(4 $^{\circ}$ C) (ベックマン卓上遠心機) 遠心し、上清を微小管モーター蛋白質画分とした。

#### ウエスタンブローディング

蛋白質をSDS-PAGEにより分離し、セミドライブロッティング装置(バイオクラフト)を用いてImmobilonメンブラン(ミリポア)にトランスファーした。それを5%のスキムミルクを含むPBS-T (0.1% Tween 20、136.9mM NaCl、2.7mM KCl、10.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 中で1時間振盪し、次いでPBS-Tで洗ってから抗KatB(5-249)蛋白質抗体(または抗KatC(207-754)蛋白質抗体)を1/10000含むPBS-T中で1時間振盪した。それをPBS-Tで洗い、次にanti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (from donkey) (アマシャム)を1/50000含むPBS-T中で1時間振盪した。それをPBS-Tで洗いECLシステム(アマシャム)で発色させた。

## 2. 結果



## 1) 抗K a t蛋白質抗体の調製

K a t B蛋白質のアミノ酸残基5番から249番をコードするDNA断片を発現ベクターp Q E 1 6に組み込み、K a t B蛋白質の5番から249番までのアミノ酸配列のC末端にH i sが6個付加したようなポリペプチドを大腸菌の系を用いて発現させた。そしてその菌体の抽出液からN i -N T Aアガロースカラム及びS D S -P A G Eを用いて発現させたポリペプチド（以下K a t B(5-249)蛋白質と記す）を精製した（F i g. 5-1 A）。また、第四章で述べたK a t C(207-754)蛋白質をN i -N T Aアガロースカラムを用いて精製した（F i g. 5-1 B）。得られたK a t B(5-249)蛋白質とK a t C(207-754)蛋白質とをそれぞれウサギに免疫して抗血清を得た。更にそれから抗原蛋白質を固定した樹脂を用いてK a t B(5-249)蛋白質及びK a t C(207-754)蛋白質に特異的な抗体を精製した。この際、それぞれの抗血清を各々の蛋白質カラムに添加する前に、K a t D蛋白質カラムに通してそれに吸着する画分を除いた。これにより、H i s 6個の連続部分等K a t B(5-249)蛋白質及びK a t C(207-754)蛋白質中の元のK a t蛋白質に存在しないベクター由来の配列部分を認識するような抗体の画分を除くことができると思われた。以下、本論文ではこのように精製した特異的な抗K a t B(5-249)蛋白質抗体及び抗K a t C(207-754)蛋白質抗体を用いた。K a t B蛋白質とK a t C蛋白質とはアミノ酸配列が全体にわたって高度に保存されているので、抗K a t B(5-249)抗体は両蛋白質のN末端側領域を認識し、抗K a t C(207-754)抗体は両蛋白質の中央部からC末端に至る領域を認識するものと考えられた。

## 2) 植物細胞成分中のK a t蛋白質の検出

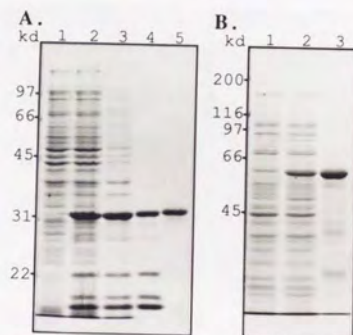


Fig.5-1 K a t B(5-249)蛋白質とK a t C(207-754)蛋白質の精製

AではK a t B(5-249)蛋白質発現菌の I P T G添加前の菌体の全抽出物 (レーン1)、I P T G添加後3時間培養した菌体の全抽出物 (レーン2)、菌体中の不溶性蛋白質を可溶化した画分 (レーン3)、N i -N T Aアガロースからのp H 5.8での溶出画分 (レーン4)、S D S -P A G Eからの溶出画分 (レーン5) をS D S -P A G Eに供し、C B B染色を行った。

BではK a t C(207-754)蛋白質発現菌の I P T G添加前の菌体の全抽出物 (レーン1)、I P T G添加後一晩培養した菌体の全抽出物 (レーン2)、N i -N T Aアガロースからのp H 5.8での溶出画分 (レーン3) をS D S -P A G Eに供し、C B B染色を行った。



これらの抗体を用いてシロイヌナズナ及びタバコ培養細胞BY-2<sup>61)</sup>の全抽出物に対しウエスタンブロッティングを行ったところ、明確なシグナルは検出されなかった。これは植物細胞にKatBまたはKatC蛋白質が含まれる量が少ないためであると予想し、次にKatBまたはKatC蛋白質を植物全蛋白質から濃縮することを試みた。

微小管モーター蛋白質の特徴としてAMP-PNPやinorganic triphosphateの添加により微小管と安定に結合する性質が知られており、微小管モーター蛋白質の精製の第一段階としてこの性質を用いて他の蛋白質と分離する方法が広く行われている。第四章でKatC蛋白質も同様の性質をもつことが示されたので、以下のような操作を行った。BY-2細胞の抽出液に重合チューブリンとAMP-PNP及びsodium triphosphateとを加えて超遠心し、その沈殿を10 mMのATPを含む溶液に懸濁して再び超遠心を行い、その上清を集めた。Kat蛋白質は最初はチューブリンに結合して他の細胞内成分と分離されて沈殿画分に濃縮され、次にATPにより微小管から特異的に溶出されて上清に来ると期待される。それをウエスタンブロッティングに供したところ、抗KatB(5-249)蛋白質抗体及び抗KatC(207-754)蛋白質抗体の両方で同様に85 kD付近に単一のシグナルが検出された(Fig. 5-2、レーン1、4)。対照としてBY-2の抽出液の代わりにバッファーのみで同様の操作を行ったところシグナルは検出されなかった(Fig. 5-1、レーン2、6)。従って検出されたシグナルはBY-2由来の蛋白質によるものと判断された。そこでBY-2細胞中に存在するKatBあるいはKatC蛋白質と等価な蛋白質(以下KatB/Cと記す)を示すシグナルであると考えられた。

### 3. 考察

本章ではタバコ培養細胞BY-2中に、抗KatB(5-249)蛋白質抗体及び抗Kat

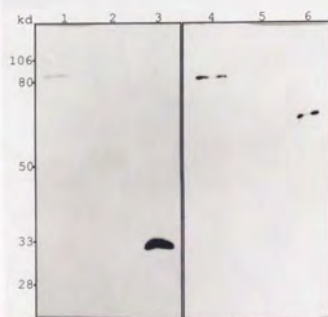


Fig.5-2 タバコ培養細胞BY-2からのK a t B/C蛋白質の検出

BY-2細胞抽出液中の微小管モーター蛋白質画分(レーン1、4)、対照のためにチューブリンのみからATPで抽出した画分(レーン2、5)、精製したK a t B(5-249)蛋白質(レーン3)、精製したK a t C(207-754)蛋白質(レーン6)をSDS-PAGEに供し、そのウエスタンブロットを抗K a t B(5-249)蛋白質抗体(レーン1～3)及び抗K a t C(207-754)蛋白質抗体で染色した。



C(207-754)蛋白質抗体の両方で認識されるような約85 kDの因子が存在することを示した。この分子量からもこの因子がK a t B (84 kD) あるいはK a t C (85 kD) 蛋白質と等価なものであることが支持される。シロイヌナズナ及びB Y-2の全蛋白質からはそのような因子の存在を示すシグナルは検出されず、K a t 蛋白質の濃縮を行った場合にのみシグナルが検出されたが、それはこの因子の存在量が少ないためと考えられた。また、その際に行った濃縮法は微小管モーター蛋白質の性質に基づく方法であるので、この因子は微小管モーター蛋白質としての機能を有している可能性が高い。以上により、この因子はK a t BあるいはK a t C蛋白質と等価なキネシン様微小管モーター蛋白質であると判断され、K a t B/C蛋白質と呼ぶことにした。K a t B/C蛋白質は脱分化した植物培養細胞で存在が検出された最初の微小管モーター蛋白質であり、植物でもキネシン様蛋白質が花粉管の伸長といったような特殊に分化した細胞の機能のみならず、細胞分裂など増殖細胞一般に見られる機能に関与していることが示唆される。

## 第六章 細胞周期に伴うK a t B/C蛋白質量変化の観察。

第五章で、タバコ培養細胞BY-2中にK a t B/C蛋白質が存在することを示した。BY-2は脱分化した増殖能のみを有する細胞であるので、K a t B/C蛋白質は細胞周期の進行に関与した役割を担っていることが予想される。ショウジョウバエ、酵母、動物細胞等では、キネシン関連蛋白質が紡錘体の形成や染色体の分配に関与していることが知られており、K a t B/C蛋白質が同様の機能を持っているとしたら興味深い。そこで本章では、細胞内での機能を推定するために、BY-2細胞の同調培養系を用いて細胞周期とK a t B/C蛋白質量との関係について調べた。

### 1. 材料と方法

#### タバコ培養細胞BY-2

東京大学理学部植物学教室長田敏行博士より分与された。

#### BY-2細胞の培養

Linsmaier and Skoogの培地<sup>60)</sup>にsucroseを3%、2,4-Dを0.2 mg/l、myoinositolを100 mg/l、K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>を200 mg/l加えた培地95 mlを300 mlの三角フラスコに入れ、それに細胞を移し、27℃で振盪培養した。

#### BY-2細胞の同調

7日目の培養液10 mlをアフィディコリンを5 μg/ml含む新しい培地95 mlに移し、24時間振盪した。その培養液中の細胞をガラスフィルター(17G2)を用いて1 literの培地で洗い、10 mlの培地に懸濁して新しい95 mlの培地に移し、振盪培養を行った。



ウエスタンブロッティングに供するサンプルの調製

第五章で行った微小管モーター蛋白質の濃縮と同様に行った。サンプリングしたBY-2細胞0.6gを1×PEMバッファー(100mM Pipes (pH 6.9)、1mM EGTA、1mM  $MgSO_4$ )で1回洗ってから1.5mlチューブ中で溶液(7.5mM DTT、15  $\mu$ g/ml leupeptin、15  $\mu$ g/ml pepstatinA、15  $\mu$ g/ml aprotinin、15  $\mu$ g/ml tosyl arginine methyl ester hydrochloride in 1.5×PEM) 0.6mlに懸濁して超音波破碎し、14000rpm、5分間(4°C)遠心し、その上清を次に100000g、30分間(4°C)遠心し、その上清を800 $\mu$ l集めた。それにGTPを1mM、taxolを20 $\mu$ M、tubulin (taxol、GTP存在下で重合させたもの)を1mg/ml、AMP PNPを2.5mM、sodium tripolyphosphateを2.5mMになるように加えて900 $\mu$ lにして混ぜ、氷中に30分間おいた。次にそれをsucrose cushion (20% sucrose、1mM GTP、20 $\mu$ M taxol、5mM DTT、2.5mM AMP PNP in PEM) 800 $\mu$ lに重層し、100000g、30分間(4°C)遠心した。得られる沈殿をATP溶出バッファー(1mM GTP、20 $\mu$ M taxol、5mM DTT、10mM ATP、20mM  $MgSO_4$ 、100mM NaCl in PEM) 40 $\mu$ lに溶かし、氷中に1時間おいた。それを100000g、30分間(4°C)遠心し、上清を10 $\mu$ lづつSDS-PAGEに供した。

ウエスタンブロッティングのシグナルの強度の測定

デントメーター(島津CS-930)を用いた。

## 2. 結果

BY-2細胞の培養をDNAポリメラーゼ $\alpha$ の阻害剤であるアフィディコリンを用い

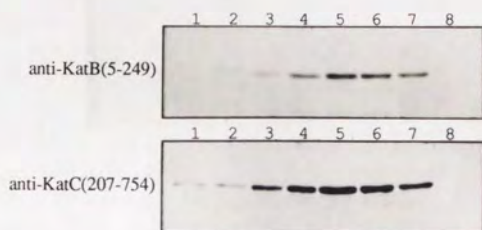
て細胞周期のG 1 期とS 期との間で止め、次に培養液からアフィディコリンを除くことにより同調的に細胞周期を進行させた。そして文献(6)に従い、細胞周期の各時期の細胞としてアフィディコリンを除いてから1 時間後(S 期に相当)、3 時間後、5 時間後(G 2 期に相当)、7 時間後、9 時間後(M 期に相当)、1 0.5 時間後、1 2.5 時間後(G 1 期に相当)の培養液から細胞をサンプリングした。その際の9 時間後の細胞を顕微鏡で観察したところM 期に属するものが6 0 %以上存在し、同調が達成されていることが確認された。そして、各時期のK a t B/C蛋白質の量を、各々のサンプルから調製した微小管モーター蛋白質画分をブロッティングして抗K a t B(5-249)蛋白質抗体及び抗K a t C(207-754)蛋白質抗体を用いて調べた。その結果をFig. 6-1に示す。これによると、時間の経過にともない検出されるシグナルの強度が増加して9 時間後に最大になり、その後減少していくのが両方の抗体でともに観察された。抗K a t C(207-754)蛋白質抗体で検出されたシグナル強度の上昇は、1 時間後に比べて9 時間後で約2 6 倍と測定された。すなわち、K a t B/C蛋白質はM 期を中心にして検出量が増加すると判断された。

### 3. 考察

本章では、K a t B/C蛋白質量の細胞周期の進行に伴う変化について調べた。実験結果はK a t B/C蛋白質量がM 期に増加することを明確に示している。M 期に相当する9 時間後以外でもK a t B/C蛋白質は検出されたが、本実験で達成された同調の程度は6 0 ~ 7 0 %に留まっていること、特にG 1 期とした1 2.5 時間後では実際にはM 期の細胞が相当量残っていることを考慮すると、K a t B/C蛋白質はM 期細胞に特異的に検出されるものであると考えることが可能である。ただし、本実験でのK a t B/C蛋白質の検出は、細胞内容物のうち微小管モーター蛋白質の性質を持つ画分から行っているため、検出量が細胞内に存在する全K a t B/C蛋白質量を反



A.



B.

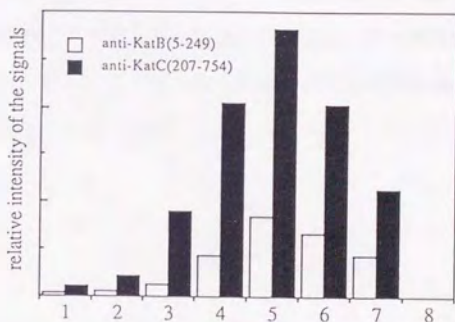


Fig.6-1 タバコ培養細胞B Y-2における細胞周期に依存したK a t B/C蛋白質量の変動

Aでは、培養液からアフィディコリンを除去後1時間（レーン1）、3時間（レーン2）、5時間（レーン3）、7時間（レーン4）、9時間（レーン5）、10.5時間（レーン6）、12.5時間（レーン7）、の細胞から調製した微小管モーター蛋白質画分及びチューブリンのみからA T Pによって抽出した画分（レーン8）のウエスタンブロットを抗K a t B(5-249)蛋白質抗体（レーン1～3）及び抗K a t C(207-754)蛋白質抗体で染色した。BではAで検出したシグナルの強度を示した。

映していない可能性もある。すなわち、細胞内に不活性型の（微小管モーター蛋白質の性質を失っている）K a t B/C蛋白質が存在する場合、そのような蛋白質は検出されないおそれがある。したがって細胞周期に伴うK a t B/C蛋白質の検出量の変化が細胞内に存在する全K a t B/C蛋白質量の変化を示しているのか、それとも蛋白質合成後の制御によって活性型蛋白質と不活性型蛋白質の割合が変化していることを示しているのかは不明である。しかし、いずれにしても「微小管モーター蛋白質の性質を有するK a t B/C蛋白質」の量がM期に増加していると結論することができ、M期に特異的な細胞機能に関与していることが示唆される。

ショウジョウバエ、動物細胞、酵母等ではキネシン様蛋白質が紡錘体の形成や染色体の娘細胞への分配に関与していることが知られている。また、植物細胞では、植物に特有な細胞質分裂の装置である隔膜形成体において、細胞板の材料を含む小胞の輸送や隔膜形成体を構成する微小管の転位に微小管モーター蛋白質が関与していることが予想されている。K a t B/C蛋白質が関与する可能性があるM期の細胞機能の一例としてそれらを挙げることができる。



## 第七章 総合討論

本論文では、シロイヌナズナのゲノム上からキネシン関連遺伝子と考えられる配列を5種類見出し、それらの配列に対応するcDNAをクローン化した。そのうちの4種類の塩基配列の決定したところ、いずれもC末端側領域にキネシン重鎖のモータードメインと相同と考えられるアミノ酸配列を有するポリペプチドがコードされていた。これらの遺伝子は、キネシン関連遺伝子であると判断され、*k a t A*、*k a t B*、*k a t C*、*k a t D*と命名した。*K a t C*蛋白質に関しては、そのモータードメインに相当する領域を含むポリペプチドが実際にキネシン様の活性を示すことを示した。以上の結果は、高等植物に微小管モーター蛋白質遺伝子が存在することを最初に証明したものである。また、高等植物として最小のゲノム構成を有すると考えられているシロイヌナズナから複数のキネシン関連遺伝子が見出されたことは、酵母やショウジョウバエで知られているのと同様に、植物にもキネシン関連遺伝子ファミリーが存在することを意味する。このことから、キネシンモーター蛋白質が様々な細胞機能に対応して別々の蛋白質に分化している現象が、真核生物一般において見られることが想像され、キネシンの重要性を示している。

植物細胞には微小管を基礎とした様々な運動系が存在することが知られていたにもかかわらず、それを駆動する因子の実体に関する知見はごく最近までなかった。本論文の結果によって、それらの現象を微小管モーター蛋白質の機能と結び付けて議論することをより確かなものとすることができよう。例えば、植物特有の細胞質分裂装置である隔膜形成体には、細胞板の材料を含む小胞を細胞板形成位置に輸送する機構が存在する。その輸送にキネシン型のモーター蛋白質が関与していることが予想されているが、キネシン様の微小管モーター蛋白質*K a t*が植物に存在することが示されたことにより、*K a t*蛋白質を含む一群のモーター蛋白質のいずれかがその輸送を駆動しているということが、より強く確信される。また、今まで機能が不明であった微小

管構造に関しても、モーター蛋白質と関連させて機能を推定することが可能である。例えば、前期前微小管束が分子レベルで果たしている機能は不明であるが、この微小管の間に小胞が存在している<sup>62)</sup>ことや、それが存在していた位置の細胞壁が後に肥厚している<sup>63)</sup>ことなどが観察されている。キネシン様蛋白質の存在が示されたことにより、前期前微小管束の微小管は分裂面の位置を示す物質を含む小胞を輸送する機能を持ち、その輸送をキネシン様蛋白質が担っているという議論が可能となる。

続いて、タバコ培養細胞中にK a t BあるいはK a t Cに相当する蛋白質が存在することを示し、K a t B/C蛋白質と命名した。この蛋白質はATP感受性の微小管結合能を有する蛋白質の画分から見出され、微小管モーター蛋白質に特徴的な性質を持っていることを意味している。また細胞周期に関しては、M期細胞において強く検出され、M期特異的な機能に関与していることが示唆された。このことより、K a t B/C蛋白質は細胞分裂装置の構成要素であるという予想が可能である。

細胞分裂における微小管依存型の運動現象として、分裂後期に見られる染色体の紡錘体極方向への移動が挙げられる。この運動は動原体で起こる微小管の脱重合によって駆動されることがin vitroの実験によって報告された<sup>64)</sup>が、抗体染色によって細胞質ダイニンが動物細胞の紡錘体と動原体に存在することが示され<sup>65) 66)</sup>、微小管モーター蛋白質が染色体の分配に深く関与していることが指摘された。酵母では、染色体DNAのセントロメア配列に結合して動原体微小管との相互作用を仲介する蛋白質複合体がマイナス端方向への微小管モーター活性を有することが示された<sup>67)</sup>。キネシン型の微小管モーター蛋白質の動原体との関与を示す報告もある。HeLa細胞で見出されたCENP-E蛋白質は、キネシンのモータードメインと相同と思われるアミノ酸配列を有し、前中期染色体の動原体及び後期の紡錘体中央部分に局在していた。また、細胞周期のG 2期に蛋白質が出現し、細胞分裂の終了とともに消失することが示された<sup>68)</sup>。動原体には微小管に対して逆方向の運動能を有する2種類のモーター蛋白質が存在し、リン酸化を介した制御系によってそれらのスイッチングが起こるとい



う報告があり<sup>6,9)</sup>、動原体は複数のモーターから構成された複雑な機能を有していることがわかる。

キネシン様蛋白質は動原体以外の構造にも関与している。アフリカツメガエルの *Eg5* 遺伝子産物は紡錘体微小管に、特に紡錘体極付近に局在していることが報告された<sup>7,1)</sup>。また動物細胞から、逆向きに並列する微小管同士を架橋して互いの微小管を滑らせるように動かす機能を有するキネシン様蛋白質が発見され、分裂後期の紡錘体の伸長に関与していることが示唆された<sup>7,2)</sup>。分裂酵母の *cut7* 産物は、スピンドルポールボディー及び分裂後期B期の紡錘体中央部分に局在することが示された<sup>3,1)</sup>。

紡錘体の形成過程にもキネシン様蛋白質が関与していることが知られている。分裂酵母の *cut7* 及びカビの *bimC* の変異株では、スピンドルポールボディーが分裂して二極性の紡錘体が形成される過程が阻害される<sup>2,8), 2,9)</sup>。また、酵母の *CIN8* 及び *KIP1* 遺伝子産物も二極性紡錘体の形成及び形態維持に必須であることが示され、それらが2つの極を分離させる方向に力を及ぼしていると判断された。更に、その際に別のキネシン関連遺伝子である *KAR3* 産物が逆向きの力を及ぼしていることが示唆された<sup>7,3)</sup>。

このように、微小管モーター蛋白質、特にキネシン様蛋白質が染色体の娘細胞への分配過程に深く関与していることが動物細胞や酵母等の研究から知られている。そこで、*KatB/C* 蛋白質も植物細胞中で同様の機能を持っていることが想像される。

また植物細胞には、明確な中心体構造が存在しないことを始め、紡錘体の形成過程等動物や下等真核生物には見られない独特の細胞分裂機構が存在する。細胞質分裂装置である隔膜形成体も植物独自の構造体である。*KatB/C* 蛋白質がそのような機構に関与している可能性もある。*Kat* 蛋白質のN末端側配列に既知の他のキネシン関連蛋白質のいずれにも類似の配列が存在しないことは、*KatB/C* 蛋白質が植物独自のキネシン様モーター蛋白質であることを支持する。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導を頂きました東京大学応用微生物研究所教授高橋秀夫先生に深く感謝申し上げます。

日々の研究遂行において、様々な御指導を頂きました東京大学応用微生物研究所助教授河村富士夫先生、同助手吉川博文先生、同助手田中寛先生に深く感謝申し上げます。

本研究におけるシロイヌナズナのcDNAのクローン化を始め、植物分子生物学一般にわたり御指導を頂きました理化学研究所主任研究員篠崎一雄先生、植物分子生物学研究室篠崎和子先生ならびに研究室の方々に深く感謝申し上げます。

植物培養細胞の同調培養や蛍光抗体染色等の実験法を丁寧に御指導頂きました東京大学理学部教授長田敏行先生、同講師馳澤盛一郎先生に深く感謝申し上げます。

アミノ酸配列の二次構造予測に際して御指導を頂きました蛋白工学研究所西川建先生に深く感謝申し上げます。

シロイヌナズナのDNAを分与して頂きました東京大学遺伝子実験施設米田好文先生に深く感謝申し上げます。

抗血清の調製に際して御指導を頂きました東京大学応用微生物研究所助手八巻寛先生に深く感謝申し上げます。

抗体の精製その他の実験の御指導を頂きました東京大学応用微生物研究所助手松山伸一先生に深く感謝申し上げます。

タバコ培養細胞BY-2を分与して頂きました日本たばこ産業たばこ中央研究所の方々に深く感謝申し上げます。

共同実験者として、様々な御助力、御討論を頂きました中谷公彦氏に深く感謝申し上げます。

平素より快適な実験環境を整えてくださいました東京大学応用微生物研究所大久保節子氏、大橋幸男氏に深く感謝申し上げます。

日常の研究生活において様々な御指導、御助言、御協力を頂きました千葉桜拓博士、権名哲生博士、戸澤譲博士、青木秀代氏、増田進氏、畚野信剛氏、杉本圭則氏、平岡宏敏氏、鄭相民氏、朝井計氏、川西徹氏、高柳裕子氏、福田康広氏、李仁義博士、柿沼伸二氏に深く感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を支えてくれた家族、友人達に心より感謝申し上げます。



## 参考文献

1. Gibbons, I. R. (1963). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 1002-1010.
2. Vale, R. D., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. (1985). *Cell* 42, 39-50.
3. Vallee, R. B., Wall, J. S., Paschal, B. M. and Shpetner, H. S. (1988). *Nature* 332, 561-563.
4. Shpetner, H. S. and Vallee, R. B. (1989). *Cell* 59, 421-432.
5. Vale, R. D., Schnapp, B. J., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. (1985). *Cell* 40, 449-454.
6. Vallee, R. B. and Shpetner, H. S. (1990). *Annu. Rev. Biochem.* 59, 909-932.
7. Lasck, R. J. and Brady, S. T. (1985). *Nature* 316, 645-647.
8. Vale, R. D., Schnapp, B. J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. (1985). *Cell* 43, 623-632.
9. Kuznetsov, S. A. and Gelfand, V. I. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8530-8534.
10. Scholey, J. M., Porter, M. E., Grissom, P. M. and McIntosh, J. R. (1985). *Nature* 318, 483-486.
11. Saxton, W. M., Porter, M. E., Cohn, S. A., Scholey, J. M., Raff, E. C. and McIntosh, J. R. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1109-1113.
12. Murofusi, H., Ikai, A., Okuhara, K., Kotani, S., Aizawa, H. (1988). *J. Biol. Chem.* 263, 12744-12750.
13. Dabora, S. L. and Sheetz, M. P. (1988). *Cell Motil. Cytoskel.* 10, 482-495.
14. Hering, G. and Borisy, G. G. (1988). *J. Cell Biol.* 107, 673.
15. Wagner, M. C., Pfister, K. K., Bloom, G. S. and Brady, S. T. (1989). *Cell Motil. Cytoskel.* 12, 195-215.
16. Kuznetsov, S. A., Vaisberg, E. A., Shanina, N. A., Magretova, N. N., Chernyak, V. Y. and Gelfand, V. I. (1988). *EMBO J.* 7, 353-356.
17. Bloom, G. S., Wagner, M. C., Pfister, K. K. and Brady, S. T. (1988). *Biochemistry* 27, 3409-3416.
18. Amos, L. A. (1987). *J. Cell Sci.* 87, 105-111.
19. Hirokawa, N., Pfister, K. K., Yorifuji, H., Wagner, M. C., Brady, S. T. and Bloom, G. S. (1989). *Cell* 56, 867-878.
20. Scholey, J. M., Heuser, J., Yang, J. T. and Goldstein, L. S. B. (1989). *Nature*, 338, 355-357.
21. Ingold, A. L., Cohn, S. A. and Scholey, J. M. (1988). *J. Cell Biol.* 107, 2657-2667.
22. Kuznetsov, S. A., Vaisberg, Y. A., Rothwell, S. W., Murphy, D. B. and Gelfand, V. I. (1989). *J. Biol. Chem.* 264,

23. Yang, J. T., Saxton, W. M. and Goldstein, L. S. B. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1864-1868.
24. Yang, J. T., Laymon, R. A. and Goldstein, L. S. B. (1989). *Cell* 56, 879-889.
25. Schroer, T. A., Schnapp, B. J., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. (1988). *J. Cell Biol.* 107, 1785-1792.
26. Pfister, K. K., Wagner, M. C., Stenoi, D. L., Brady, S. T. and Bloom, G. S. (1989). *J. Cell Biol.* 108, 1453-1463.
27. Brady, S. T., Pfister, K. K. and Bloom, G. S. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1061-1065.
28. Enos, A. P. and Morris, N. R. (1990). *Cell* 60, 1019-1027.
29. Hagan, I. and Yanagida, M. (1990). *Nature* 347, 563-566.
30. Hagan, I. and Yanagida, M. (1992). *Nature* 356, 74-76.
31. Meluh, P. B. and Rose, M. D. (1990). *Cell* 60, 1029-1041.
32. Hoyt, M. A., He, L., Loo, K. K. and Saunders, W. S. (1992). *J. Cell Biol.* 118, 109-120.
33. Roof, D. M., Meluh, P. B. and Rose, M. D. (1992). *J. Cell Biol.* 118, 95-108.
34. Endow, S. A. and Hatsumi, M. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4424-4427.
35. Endow, S. A., Henikoff, S. and Soler-Niedziela, L. (1990). *Nature* 345, 81-83.
36. McDonald, H. B. and Goldstein, L. S. B. (1990). *Cell* 61, 991-1000.
37. Zhang, P., Knowles, B. A., Goldstein, L. S. B. and Hawley, R. S. (1990). *Cell* 62, 1053-1062.
38. Saxton, W. M., Hicks, J., Goldstein, L. S. B. and Raff, E. C. (1991). *Cell* 64, 1093-1102.
39. Otsuka, A. J., Jeyaprasath, A., Garcia-Anoveros, J., Tang, L. Z., Fisk, G., Hartshorne, T., Franco, R. and Born, T. (1991). *Neuron* 6, 113-122.
40. Hall, D. H. and Hedgecock, E. M. (1991). *Cell* 65, 837-847.
41. McDonald, H. B., Stewart, R. J. and Goldstein, L. S. B. (1990). *Cell* 63, 1159-1165.
42. Walker, R. A., Salmon, E. D. and Endow, S. A. (1990). *Nature* 347, 780-782.
43. Fosket, D. E. and Morejohn, L. C. (1992). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 201-240.
44. Hasegawa, S., Marc, J. and Palevitz, B. A. (1991). *Cell Motil. Cytoskel.* 18, 94-104.



45. Hasezawa, S. and Nagata, T. (1991). *Bot. Acta.* 104, 206-211.
46. Ledbetter, M. C. and Porter, K. R. (1963). *J. Cell Biol.* 19, 239-250.
47. Pickett-Heaps, J. D. and Northcote, D. H. (1966). *J. Cell Sci.* 1, 109-120.
48. Smirnova, E. A. and Bajer, A. S. (1992). *Cell Motil. Cytoskel.* 23, 1-7.
49. Hepler, P. K. and Jackson, W. T. (1968). *J. Cell Biol.* 38, 437-446.
50. Euteneuer, U. and McIntosh, R. (1980). *J. Cell Biol.* 87, 509-515.
51. Asada, T., Sonobe, S. and Shibaoka, H. (1991). *Nature* 350, 238-241.
52. Flanders, D. J., Rawlins, D. J., Shaw, P. J. and Lloyd, C. W. (1990). *J. Cell Biol.* 110, 1111-1122.
53. Meyerowitz, E. M. (1989). *Cell* 56, 263-269.
54. Joshi, C. P. (1987). *Nucleic Acids Res.* 15, 6643-6653.
55. Nishikawa, K. and Noguchi, T. (1991). *Meth. Enzymol.* 202, 31-44.
56. Williams, R. C. Jr. and Lee, J. C. (1982). *Meth. Enzymol.* 85, 376-385.
57. Vallee, R. B. (1986). *Meth. Enzymol.* 134, 89-104.
58. Wagner, M. C., Pfister, K. K., Brady, S. T. and Bloom, G. S. (1991). *Meth. Enzymol.* 196, 157-175.
59. Tiezzi, A., Moscatelli, A., Cai, G., Bartalesi, A. and Cresti, M. (1992). *Cell Motil. Cytoskel.* 21, 132-137.
60. Linsmaier, E. M. and Skoog, F. (1965). *Physiol. Plant.* 18, 100-127.
61. Nagata, T., Nemoto, Y. and Hasezawa, S. (1992). *International Rev. Cytol.* 132, 1-30.
62. Packard, M. and Stack, S. M. (1976). *J. Cell Sci.* 22, 403-411.
63. Mineyuki, Y. and Gunning, B. E. S. (1990). *J. Cell Sci.* 97, 527-537.
64. Koshland, D. E., Mitchison, T. J. and Kirschner, M. W. (1988). *Nature* 331, 499-504.
65. Pfarr, C. M., Coue, M., Grissom, P. M., Hays, T. S., Porter, M. E. and McIntosh, J. R. (1990). *Nature* 345, 263-265.
66. Steuer, E. R., Wordeman, L., Schroer, T. A. and Sheetz, M. P. (1990). 345, 266-268.
67. Hyman, A. A., Middleton, K., Centola, M., Mitchison, T. J. and Carbon, J. (1992). *Nature* 359, 533-536.
68. Yen, T. J., Li, G., Schaar, B. T., Szilak, I. and Cleveland, D. W. (1992). *Nature* 359, 536-539.

69. Hyman, A. A. and Mitchison, T. J. (1991). *Nature* 351, 206-211.
70. LeGuellec, R., Paris, J., Couturier, A., Roghi, C. and Philippe, M. (1991). *Molec. Cell. Biol.* 11, 3395-3398.
71. Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M. and Mitchison, T. J. (1992). *Nature* 359, 540-543.
72. Nislow, C., Lombillo, V. A., Kuriyama, R. and McIntosh, J. R. (1992). *Nature* 359, 543-547.
73. Saunders, W. S. and Hoyt, M. A. (1992). *Cell* 70, 451-458.



## 論文の内容の要旨

農芸化学専攻  
平成二年度博士課程進学  
三井久幸  
指導教官 高橋秀夫

論文題目 高等植物におけるキネシン関連遺伝子ファミリーの研究  
Studies on the kinesin-related gene family of higher plants

キネシンは最初、イカ神経細胞内での小胞等の軸索輸送を駆動する因子として分離・精製された微小管モーター蛋白質である。その後類似の蛋白質が種々の生物・細胞で見出されている。これらは分子量110-140 kDの重鎖2個と60-80 kDの軽鎖2個とから構成される四量体として存在し、ATPに依存して微小管上でプラス端方向への運動を行う。キネシン重鎖にはN末端側に球状ドメイン（モータードメイン、頭部ドメイン）が存在し、そこに動力を発生する機能が備わっている。一方、C末端側「尾部」ドメインは軽鎖あるいは他の分子と相互作用する領域となっている。近年、キネシンのモータードメインと類似の配列を有する蛋白質が広範な真核生物の間で続々と報告され、キネシン・スーパーファミリーの存在が提唱された。それらの機能の欠損は細胞分裂時の紡錘体形成や染色体の分配、細胞融合といったような微小管に依存した細胞機能の異常を引き起こす。スーパーファミリーに属する蛋白質は、共通のモータードメインに各々特有の尾部ドメインが接続した構造を持っており、多様な現象に対して各々が役割分担して関与していることを物語っている。

一方、高等植物においては、微小管モーターに関する知見はほとんどないのが現状である。高等植物細胞では細胞周期の進行に伴う顕著な微小管の配向の変化が観察され、しかもその中には表層微小管・前期前微小管束・隔膜形成体といったような植物特有の構造も含まれている。これらの微小管構造は植物細胞の増殖・分化に直接関与していると考えられており、植物の形態形成の理解には微小管の動態と機能に関する研究が重要である。本論文は、植物細胞にもモーター蛋白質が関与した微小管機能が存在することを予想し、その解明の一步としてキネシン様モーター蛋白質の存在について論じたものである。

### 1. シロイヌナズナにおけるキネシン関連遺伝子ファミリーの同定

酵母、ショウジョウバエ等の既知のキネシン関連遺伝子間で高度に保存されている配列に基づいてプライマーを合成し、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。生じたDNA断片のうち適度な大きさと思われる0.8-1.1 kbのものをクローン化し、14種の別々のクローンを得た。それら

べてについて部分的に塩基配列を決定したところ、そのうちの5種類(A、B、C、D、Eと記す)がキネシン様の配列を有していた。次に、それら5種類のDNA断片をプローブとしてシロイヌナズナのゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション解析を行った。その結果、各々に対するシグナルが見出され、5種類のPCR産物がシロイヌナズナのゲノム由来であることが確認された。シロイヌナズナのゲノムサイズは他の高等植物に比べて著しく小さく、遺伝子の重複が少ないと考えられているので、これらは各々別個の役割を持った遺伝子である可能性が高く、そのような遺伝子によって構成されるファミリーが存在することが示された。

## 2. シロイヌナズナのキネシン関連遺伝子cDNAのクローニング

続いてシロイヌナズナ葉及び花からポリA<sup>+</sup>RNAを調製し、 $\lambda$ gt11をベクターとして葉及び花のcDNAライブラリーをそれぞれ作製した。そして先に得たPCR産物をプローブとしてスクリーニングを行い、5種類各々に対応するcDNAクローンを得た。そして各々について最長のクローンを選び(A: 2.9 kb、B: 2.7 kb、C: 2.8 kb、D: 3.2 kb、E: 3.5 kb)、プラスミドベクター上にサブクローニングし、そのうちA、B、C、Dの全塩基配列を決定した。その結果、Aには793残基(89 kD)、Bには745残基(84 kD)、Cには754残基(85 kD)、Dには987残基(110 kD)のポリペプチドがコードされていると予想された。以下に述べるようにこれらの遺伝子産物はキネシン重鎖と関連の深い配列を有していたので、それぞれの遺伝子を*katA*、*katB*、*katC*、*katD* (kinesin-related gene of *Arabidopsis thaliana*) と命名した。

## 3. Kat蛋白質のアミノ酸配列の解析

*kat*遺伝子産物(以下Kat蛋白質と記す)と既知の蛋白質とのアミノ酸配列を比較した。4種のKat蛋白質はいずれもC末端側にキネシン重鎖のモータードメインと類似の配列を有していた。ショウジョウバエのキネシン重鎖のアミノ酸残基11番から332番までの領域と配列が一致している割合は、KatA蛋白質で36%、KatB蛋白質で36%、KatC蛋白質で36%、KatD蛋白質で40%であった。特にATP結合部位や微小管結合部位等キネシン・スーパーファミリーに属する蛋白質の間で高く保存されている配列はKat蛋白質においても見出された。ただし、キネシン重鎖ではモータードメインがN末端側に位置するのに対し、Kat蛋白質ではいずれもC末端側に相当する配列が存在する点が特徴である。モータードメイン様の配列をC末端側に持つ既知の蛋白質として酵母のKAR3産物が挙げられるが、これとの類似度は更に高く45%前後のアミノ酸配列の一致が見られた。しかし、Kat蛋白質のN末端側領域に関しては既知の蛋白質の中に類似したものは見出されなかった。Kat蛋白質同士では、KatBとKatCとが全体で84%のアミノ酸配列の一致が見られたが、KatAとKatBとは59%にとどまり、KatDはC末端側領域以外で他の3個と類似の配列は見出されなかった。次にジョイント法によってKat蛋白質の二次構造予測を行った。その結果によると、KatA蛋白質のアミノ酸残基70番から428番、KatB蛋白質のアミノ酸残基36番から385番、K



at C蛋白質のアミノ酸残基46番から393番の領域は $\alpha$ ヘリックスをとると判断された。しかもそれらの領域では疎水性アミノ酸が7残基ごとに並んでいることから、Kat A、Kat B、Kat C各蛋白質は中央部分がcoiled coilを形成して二量体になると予想された。これはキネシンにも見られる特徴的な構造である。一方、Kat D蛋白質では、中央部分で $\alpha$ ヘリックスをとる確率が他の三つに比べて低く、7残基ごとの疎水性アミノ酸の繰り返しも存在しなかった。以上、Kat蛋白質がキネシン重鎖のモータードメインと相同と考えられる配列を有し、しかもA、B、Cはキネシンに特徴的な二次構造をも有していることが判明した。

#### 4. Kat蛋白質の活性の検出

Kat C蛋白質のアミノ酸残基207番からC末端までをコードするDNA断片を発現ベクターに組み込み、大腸菌の系を用いて発現させ精製した。このポリペプチド(Kat C(207-754)蛋白質と記す)をウシの脳から精製したチューブリンと組合せた実験によって、キネシンに特有な微小管添加によるATPase活性の上昇、及びATPのアナログである5'-adenylylimidodiphosphate (AMP PNP) 添加によって誘起される微小管との安定な結合の検出を試みた。その結果、Kat C(207-754)蛋白質は室温でチューブリン非存在下では $0.8 \text{ nmol/min/mg}$ 、重合させたチューブリン $1 \text{ mg/ml}$ 存在下では $2.5 \text{ nmol/min/mg}$ のATPase活性を示し、3倍以上の活性の上昇を確認できた。また、Kat C(207-754)蛋白質をAMP PNP  $2.5 \text{ mM}$ 存在下で重合チューブリンと混ぜて室温におき、次に超遠心によりチューブリンを溶液中から分離したところ、Kat C(207-754)蛋白質がチューブリンと共に沈殿に移行することが確認された。更にその沈殿物をATPを $10 \text{ mM}$ 含む溶液に懸濁し再び超遠心を行ったところ、Kat C(207-754)蛋白質がチューブリンから離れて溶液中にとどまりチューブリンのみ沈殿することが観察された。

#### 5. 植物細胞からのKat蛋白質の検出

Kat B蛋白質のアミノ酸残基5番から249番をコードするDNA断片を発現ベクターに組み込み、大腸菌の系を用いて発現させ精製した。得られたポリペプチド(Kat B(5-249)蛋白質と記す)と上記のKat C(207-754)蛋白質とをそれぞれウサギに免疫し抗血清を得た。そして抗原蛋白質を固定した樹脂を用いてKat B(5-249)蛋白質及びKat C(207-754)蛋白質に特異的な抗体を調製した。Kat B蛋白質とKat C蛋白質とはアミノ酸配列が全体にわたって高度に保存されているので、抗Kat B(5-249)抗体は両蛋白質のN末端側領域を認識し、抗Kat C(207-754)抗体は両蛋白質の中央部からC末端に至る領域を認識するものと考えられた。それらの抗体を用いてシロイヌナズナ全抽出物及びタバコ培養細胞BY-2の全抽出物に対しウエスタンブロッティングを行ったところ、明確なシグナルは検出されなかった。そこでBY-2の抽出液に重合チューブリンとAMP PNPとを加えて超遠心し、その沈殿を $10 \text{ mM}$ のATPを含む溶液に懸濁して再び超遠心を行い、上清を集めた。この画分には微小管モーター活性を持つ蛋白質が濃縮されていると期待される。それをウエスタンブロッティングに供したところ、両方の抗体で同様に $85 \text{ kD}$ 付近に単一のシグ

ナルが検出された。これはBY-2細胞中に存在するKatBあるいはKatC蛋白質の等価物 (KatB/Cと記す) を示すと判断した。

#### 6. 細胞周期に伴うKatB/C蛋白質量変化の観察

BY-2細胞をアフィディコリンを用いて同調的に培養し、細胞周期の各時期の細胞から上記の方法で微小管モーター蛋白質画分を調製しウエスタンブロッティングに供した。すると両抗体ともM期で特に強いシグナルが検出され、その強度はS期に比べ約2.6倍の上昇と測定された。この現象がKatB/C蛋白質のどのような制御に基づくものであるかは不明であるが、KatB/C蛋白質が紡錘体の形成・染色体の分配・細胞質分裂といったM期に特異的な細胞機能に関与していることが示唆された。

#### まとめ

本研究ではシロイヌナズナのゲノム上にキネシン関連遺伝子ファミリーが存在することを示した。更にKatC蛋白質については、モータードメインに相当する領域を含むポリペプチドが実際にキネシン様の活性を有することを示した。ただし、Kat蛋白質のN末端「尾部」領域には既知の蛋白質と類似の配列は見出されず、Kat蛋白質はキネシン・スーパーファミリーの中でも新規な範疇に属する可能性がある。また、KatB/C蛋白質が植物培養細胞において微小管モーター活性を有する形で存在し、その検出量が細胞分裂期に上昇することを示した。



