

論文の内容の要旨

モータータンパク質キネシンの 運動方向を決定する機構の解明

A study of determinants of direction of kinesins

氏名 山岸 雅彦

研究の背景と目的

モータータンパク質とは ATP を加水分解し、真核細胞内で細胞骨格と協働して、様々な機能を果たすタンパク質の総称である。キネシンはモータータンパク質の 1 種であり、真核細胞内で微小管上を運動し、物質輸送や細胞分裂などの様々な機能を果たす。キネシンはキネシンスーパーファミリーを形成しており、配列比較により 14 のサブファミリー (kinesin-1~ -14) に分類される。サブファミリーのうちほとんどのキネシン (kinesin-1~ -12) は微小管上をプラス端方向へ運動するが、kinesin-14 サブファミリーに属するキネシンは微小管上をマイナス端方向へ運動する。

運動方向が異なる kinesin-1 と kinesin-14 は、その運動活性を担う部位 (motor core) の 3 次元構造はほとんど同一であるが、motor core から突き出た neck 部位はそれぞれ特徴的な構造を持つ。これまでに、この neck 部位の特徴的な構造が、それぞれの運動方向の違いの原因となり得るという推定がなされてきた。そこで、kinesin-1 と kinesin-14 の motor core と neck 部位を入れ替えたキメラキネシンを用いて、neck 部位と運動方向性との関係について一連の研究が行われてきた。これらの研究では、Kinesin-1 の motor core にマイナスキネシン kinesin-14 の neck 部位をつなげたキメラキネシンは、微小管のマイナス端方向へ運動し、kinesin-14 の motor core にプラスキネシン kinesin-1 の neck 部位をつなげたキメラキネシンは、微小管のプラス端方向へ運動をした。これらの結果から、キネシンの運動方向は neck 部位により決定されることが示唆された。更に、この neck 部位がヌクレオチド状態に応じて kinesin-1 では微小管のプラス端

方向に傾き、kinesin-14 ではマイナス端方向へ傾くようにそれぞれ構造変化することで、二量体のもう一方のモータードメイン、またはカーゴをそれぞれの構造変化した方向へ移動させ、方向性のある運動を実現しているというモデル (power-stroke モデル) が支持されるようになった。

しかしながら、この neck 部位の方向性のある構造変化により、キネシンの運動方向が決定されることを実証する知見はいまだ乏しく、キネシンの運動方向を決定する分子機構の研究は、未解明な点が多く残っている。特に、kinesin-14 に関しては研究が不足している。本研究では、kinesin-14 の微小管のマイナス端方向への運動の分子メカニズム (第 1 章) 及び、キネシン全般において共通の構造を持つ motor core による方向性のある運動がどのようにして実現されているかを調べた (第 2 章)。

第 1 章: kinesin-14 の運動方向を決定する分子機構の解明

キメラキネシンを用いた先行研究では、kinesin-1 の motor core と kinesin-14 の neck 部位からなるキメラキネシンが微小管上をマイナス端方向へ運動したことから、kinesin-14 の neck 部位がマイナス端方向への運動方向を決定していると考えられた。しかしながら、実際にはこのキメラキネシンは、kinesin-14 の neck 部位のみではなく C 末部位も同時に置換しており、kinesin-14 の neck 部位のみが微小管のマイナス端方向への運動方向を決定する部位であるかについては議論の余地がある。

本研究では、改めて網羅的に単量体キメラキネシンを作製し、その運動方向を調べることで、マイナス端方向への運動方向決定部位の同定を行った (図 1A)。その結果、kinesin-1 の motor core と kinesin-14 の neck 部位および kinesin-1 の C 末部位からなるキメラキネシン (nKk) は、微小管のプラス端方向へ運動し (図 1B)、C 末部位を kinesin-14 に置換したキメラキネシン (nKn) は、微小管のマイナス端方向へ運動した (図 1B)。このことは、微小管のマイナス端方向へ運動するには kinesin-14 の neck 部位のみならず kinesin-14 の C 末部位も必要であることを示しており、マイナス端方向への運動方向決定部位の新たな特定に成功した。次に、この C 末部位のうち、マイナス端方向への運動に重要な残基の特定のため、C 末部位に変異を加えてゆくことによる運動方向の変化を調べたところ、kinesin-14 の C 末部位のうち、motor core とのつなぎ目の 5 残基だけの変異で、運動方向性を逆転することができ、微小管のマイナス端方向への運動にはこの 5 残基が重要であることが本研究で明らかになった。更に、この C 末部位の 5 残基と neck 部位の 2 残基によるマイナス端方向への運動の分子メカニズムの構造的な知見を得るために、共同研究者の協力の下、各ヌクレオチド状態のキメラキネシンの結晶構造およびクライオ EM 像を得、構造解析を行った。その結果、ADP 状態において、neck 部位が微小管のプラス端方向に安定化していること、そして、ATP 状態においては、neck 部位 2 残基と C 末部位 5 残基が kinesin-14 bundle を形成することにより、neck 部位をマイナス端方向に安定化していることがわかった。以上のことから、マイナスキネシン kinesin-14 は、ATP サイクルにおいて、neck

部位を微小管のプラス端方向からマイナス端方向へ構造変化させ、**power-stroke** を行っていると考えられる。本研究により、マイナスキネシン **kinesin-14** の微小管のマイナス端方向への運動方向を決定する部位の特定、および、その運動方向決定部位を含む **C** 末部位が関わる、微小管マイナス端方向への **power-stroke** の分子機構が明らかとなった。

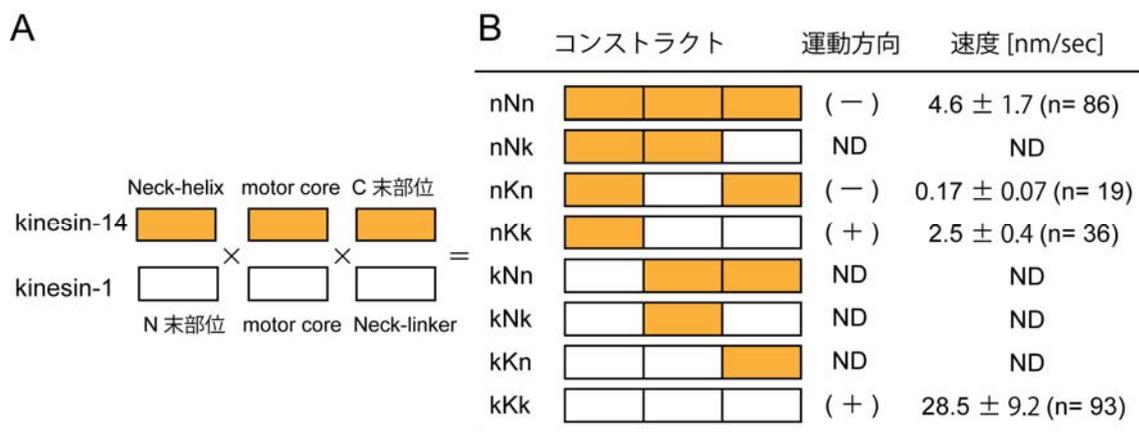


図 2. キメラキネシンの網羅的作製と運動観察

- (A) Kinesin-1, kinesin-14 をそれぞれ、3 つ部位に分け、それぞれの組み合わせにより 8 種類のキメラキネシンを作製した。
 (B) 8 種類のキメラキネシンの運動方向と運動速度を観察した。速度は平均値±SD, ND はデータなし、n は観察した微小管数を示す。

第 2 章: キネシンモーターコアの運動方向性の実証

微小管上をプラス端方向に運動する **kinesin-1** に代表されるプラスキネシンもマイナス端方向に運動するマイナスキネシン **kinesin-14** も、**neck** 部位を除いた **motor core** のアミノ酸配列や 3 次元構造は相同性が高く、**motor core** が運動活性を担うことから、全てのキネシンに共通する運動メカニズムの存在が示唆される。

本研究では、**motor core** 自体の運動方向性について調べた。キネシンは、**motor core** から突き出た構造の **neck** 部位を持ち、それとは異なる末端の部位も **motor core** の外側に存在している。この **neck** 部位ではない末端側でガラス面にキネシンを固定することで、**neck** 部位を支点とした、**neck** の構造変化を介さない単量体キネシンの運動方向を調べた (図 2A)。

その結果、プラスキネシンにおいて、**C** 末側にある **neck** 部位 (**neck-linker**) ではない **N** 末端でガラス面に固定した **kinesin-1** は、微小管のプラス端方向への運動を示した (図 2B)。更に、**C** 末部位が **docking** しないことが第 1 章で明らかとなっているキメラキネシンも、微小管のプラス端方向へ運動した。これらの結果は、プラス端方向への運動には **C** 末側 **neck** 部位 (**neck-linker**) の構造変化が直接には運動に必要がないことを示唆すると共に、**kinesin-1** の **motor core** 自体がプラス端方向へ運動することを示唆している。次に、マイナスキネシンにおいて、**N** 末側の **neck** 部位 (**neck-helix**) ではない **C** 末端でガラス面に固定した **kinesin-14** は、従来報告されていた

kinesin-14 の運動方向とは反対方向である微小管のプラス端方向へ運動することが明らかになった (図 2B)。更に、N 末側の neck 部位 (neck-helix) が機能 (kinesin-14 bundle 形成) できない変異体の N 末端固定の条件でも、微小管のプラス端方向へ運動した (図 2B)。これらの結果から、kinesin-14 の motor core 自体も、プラスキネシン同様、プラス端方向へ運動する性質があることが示唆された。N 末側の neck 部位 (neck-helix) が構造変化 (kinesin-14 bundle 形成) し、その変化が伝達されるときのみ、motor core の微小管のプラス端方向への運動を打ち消し、第 1 章で示したように微小管のマイナス端方向へ運動すると考えられる。さらに、キネシンの motor core 自体のプラス端方向への運動性を、他のキネシン (kinesin5 Cin8, kinesin-10 Kid, kinesin-14 Kar3) を用いて、motor core 自体はプラスモーターであるかを検証した (図 2B)。また、N/C 末端固定におけるそれぞれの運動速度の比較から、neck 部位の構造変化は微小管のプラス端方向への運動速度を促進する役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、neck 部位の構造変化による power-stroke とは異なる、キネシンに共通する motor core 自体のプラス端方向への運動メカニズムの一端を解明することができた。

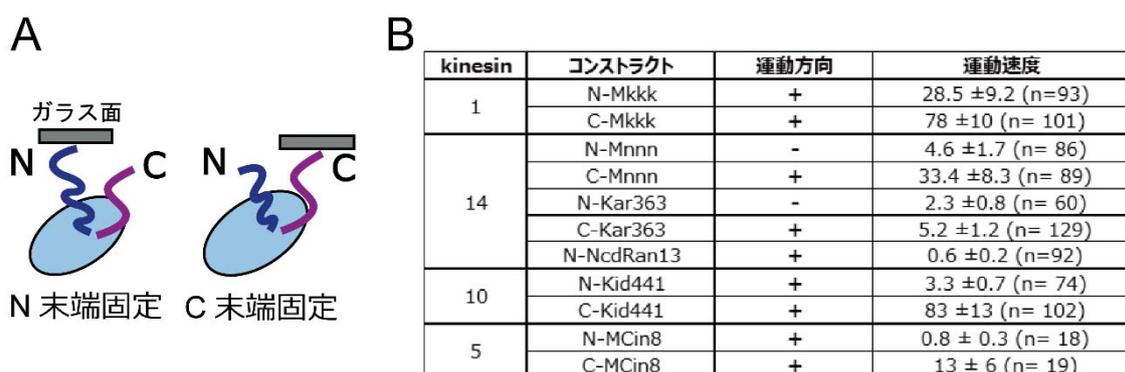


図 2. N/C 末端固定運動観察とキネシンの運動方向・速度

- (A) 単量体キネシンを、N 末端側または C 末端側でガラス面に固定し運動観察を行うことで、neck 部位を介さない運動を観察した。
 (B) 観察したキネシンの種類とその運動方向および運動速度。速度は平均値 ± SD。n は観察した微小管数を示す。

総括

本研究では、モータータンパク質キネシンの最大の特徴の一つである方向性を伴った運動について、全てのキネシンにおいて、その構造の相同性が高い motor core 自体の微小管のプラス端方向への運動性が共通して存在していることを明らかとした。そして、motor core の共通するプラス端方向への運動性に加えて、neck 部位の power-stroke は、プラスキネシンではプラス端方向への運動の促進を、マイナスキネシンではプラス端方向への運動性を打ち消してマイナス端方向への運動を実現していることを構造的な知見を含めて明らかにすることができた。