

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 16 年度博士課程進学
氏名 牧野 司
指導教員名 田之倉 優

論文題目

キネシンモーターの運動機構に関する構造と機能の解析

細胞内の「動き」は様々なタイプの分子モーターと呼ばれるタンパク質が ATP などの化学エネルギーを力学的な運動に変換することで起こる。分子モーターの中でもキネシンと呼ばれるファミリーは細胞内物質輸送や分裂細胞における染色体の分離の制御を行っており、神経疾患やガンの発症とも深く関わりがある。キネシンの運動や構造について様々な研究が進んでいるが、その運動の詳細なメカニズムは未だ不明である。

キネシンは細胞の骨格を形成する微小管に沿って一方向に運動する。微小管にはプラス端とマイナス端という極性があるが、最初に発見されたキネシン-1 を含め多くのキネシンは微小管をプラス端方向に進む。しかし、キネシン-14 サブファミリーに属するショウジョウバエ由来の *ncd* (non-claret disjunctional 遺伝子産物) は、微小管上をマイナス端方向に進む。このためキネシンの運動の方向性を決めている要因解明の端緒として注目されている。

ncd はテールドメイン、ストークドメイン、モータードメインと呼ばれる三つの領域から構成され、多くのキネシンと同じく二量体構造をとる。*ncd* のモータードメインはプラス端方向に進むキネシンのものと立体構造が非常に類似していることから、*ncd* のマイナス端方向への運動特性は、モータードメインに直結しているストークドメインの構造的特性に起因するものではないかと推測される。*ncd* からストークドメインを欠失させると二量体を形成しなくなり、運動活性が失われると報告されている。このことから *ncd* の二量体形成部位はストークドメイン内に存在し、この二量体構造の形成は *ncd* の運動活性に必須の条件であると推測される。一部解明された結晶構造ではストークドメインのモータードメインに近接する部位はコイルドコイル構造を形成していたが、ストークドメインの大部分の立体構造は明らかにされていない。

そこで、本研究ではまず *ncd* のストークドメインの構造的特性を調べ、次にその特性が *ncd* の運動とどのような相関があるのかを明らかにすることを目的とした。

1. ncd ストークドメインの構造的特性の解析

我々の研究室では以前 ncd の二量体形成領域を決定するために、ストークドメイン約 150 アミノ酸の中のフレームの異なる一連の 46 残基のポリペプチド鎖を化学合成し二量体形成能を調べたが、いずれも二量体を形成しなかった。しかし、完全長の ncd は確かに二量体化するのであるから、二量体化に必要な何らかの条件が見落とされているはずであると考えられる。

私はストークの二量体化にはより長いポリペプチド鎖が必要であるのではないかと考えた。そこで大腸菌によるストークドメインの調製系を構築し、円偏光二色性 (CD) スペクトル測定と超遠心分析を行ったところ、確かにコイルドコイルを形成し二量体化することが確かめられた。より詳細に領域ごとの構造的特性を調べるために、ストークドメインの N 末端および C 末端を任意の鎖長欠損させた一連のポリペプチド断片を調製し (図 1)、その二次構造および会合状態を比較した。その結果、T275-N314 の領域を欠損した断片はコイルドコイルを形成しなかったことから、この領域が二量体形成に不可欠な部位であることが示唆された。しかし、この領域に相当する化学合成ポリペプチド鎖は単独では二量体化しなかったことから、二量体形成は隣接する領域との協調的な作用によって達成されることが示唆された。また、ストークドメイン C 末端のモータードメインに近接する 10 残基程度の領域 (ネック領域と呼ばれる) はモータードメインを欠損させた断片ではコイルドコイルを形成しないことが明らかになった。しかし、既報の X 線結晶構造では、ネック領域がモータードメインと接触し、コイルドコイルを形成している。したがってネック領域の構造形成はモータードメインとの相互作用によって達成されることが示唆された。また、コイルドコイル形成能が高い断片について、様々な濃度で CD スペクトルを測定し、そのヘリックス含量を調べたところ、濃度依存的に顕著なヘリックス含量変化が見られ、低濃度域でも一定量のヘリックスが形成されていた。さらに興味深いことに、多くのストークド

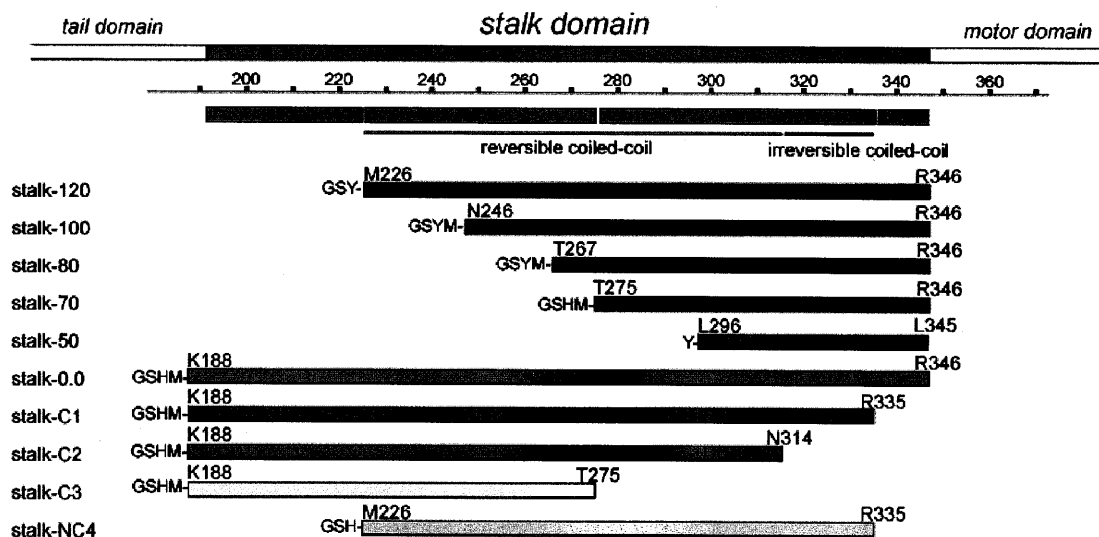


図 1. 本研究で用いた ncd ストークドメイン断片のコンストラクト

メイン断片は CD の熱変性測定において 3 状態遷移を示した。さまざまな温度における超遠心分析および複数回の熱変性測定の結果 (図 2) と合わせて考えると、20-30 °C で大部分のコイルドコイル構造が可逆的に変性し、60 °C で残りの部分が不可逆的に変性解離することが分かった。N 末端あるいは C 末端欠損断片の熱変性プロファイルの比較により、低温 (20-30 °C) で可逆変性する柔軟なコイルドコイル (可逆的コイルドコイル) 形成部位がストークドメインの大半を占める M226-N314 付近に存在し、高温 (約 60 °C) で不可逆変性する比較的強固なコイルドコイル (不可逆的コイルドコイル) 形成部位が C 末端近くの N314-R335 付近に存在することが明らかになった。

ncd の運動機構としてストークドメインがコイルドコイル構造を保ち、剛体としてミオシンのレバーアームのように振舞うというモデルが過去に提示されているが、このモデルに照らし合わせるとストークドメインの N 末端側の大部分が柔軟な構造をとることは、運動には不利であると考えられる。そこでストークドメインの柔軟性が ncd の運動活性にどのような影響をもたらすのかを調べるのが次なる課題であった。

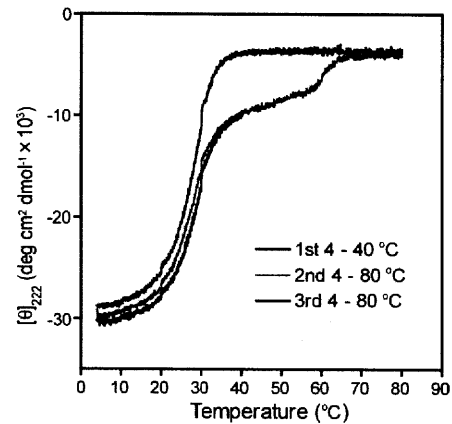


図 2. ncd ストークドメイン断片の CD 熱変性プロファイル

2. ncd のコイルドコイル構造補強変異体の運動解析

私はストークの柔軟性を失わせた ncd 変異体の運動を観察することにより、ストーク領域の柔軟性の意義を明らかにできると考えた。コイルドコイル形成するポリペプチド鎖では α -g の 7 残基周期の (α , d) 位に疎水性側鎖をもつアミノ酸が連続して存在し、これらが疎水相互作用面を形成することが知られている。しかし ncd のストークドメインにはコイルドコイル形成に不利になると考えられる親水性側鎖をもつアミノ酸が (α , d) 位に断続的に存在していた。これらの親水性残基を疎水性残基に置換した変異を導入することで柔軟性を失わせることができると考えた。

そこで、(α , d) 位に存在する親水性残基、H286、H293、N314、Q317、S331、R335 について疎水性のロイシン、バリン、イソロイシンのいずれかに置換した ncd 変異体を調製し *in vitro* で微小管滑り速度を野生型と比較した。その結果、不可逆的コイルドコイル形成部位に含まれる親水性アミノ酸残基を置換した変異体 N314I/Q317L では顕著な差は見られなかった。一方、柔軟な可逆的コイルドコイル形成部位に含まれる親水性残基の変異体 H286V/H293I では顕著な速度低下が観察された。このことからストークドメインの中の可逆的コイルドコイル形成部位の柔軟性が ncd 運動活性に重要な意味を持つことが示唆された。

ncd の由来生物であるショウジョウバエの至適生育温度は 22 度付近であり、これは可逆

的コイルドコイルが解離する温度とほぼ一致する。運動および ATP 加水分解のサイクルと同期してコイルドコイルの形成—解離が起こっているのか、あるいは一定の構造が保たれているのかを検証するため、2 種の蛍光タンパク質を用いた蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の実験を以下に行った。

3. ncd ストークドメイン N 末端の構造変化の解析

FRET とは、2 つの蛍光分子が存在するとき、一方の蛍光分子 (ドナー) の励起エネルギーがもう一方の分子 (アクセプター) に転移される現象であり、その結果エネルギーを転移された分子から蛍光が発せられる。ドナーとアクセプターの距離が近いほど、エネルギーの受け渡し (FRET 効率) が大きくなる。私は ncd ストークドメインの構造変化を FRET 効率の変化として捉えることを計画した (図 3)。ストークドメイン N 末端にシアン色蛍光タンパク質 CFP (ドナー) あるいは黄色蛍光タンパク質 YFP (アクセプター) を融合させた ncd を遺伝子工学的に調製し、各々に付加したアフィニティータグに親和性を有する二種類のアフィニティーカラムを用い、融合させた蛍光タンパク質の異なるヘテロな ncd を精製した。ncd の ADP 結合状態において CFP の励起波長を照射し蛍光スペクトルを測定した結果、YFP の蛍光の極大波長にピークが見られ、FRET 効率が高いことが分かった。これは ncd ストークドメイン N 末端同士が近接していることを意味し、コイルドコイル構造が形成されていることを示唆するものである。一方、微小管添加および AMP-PNP あるいは ATP 添加時にも顕著な FRET 効率の変化は観測されなかった。これらの結果から、ncd ストークドメイン N 末端のコイルドコイル構造は ATP 加水分解サイクルと同期して形成—解離しておらず、一定の構造を保っていることが分かった。

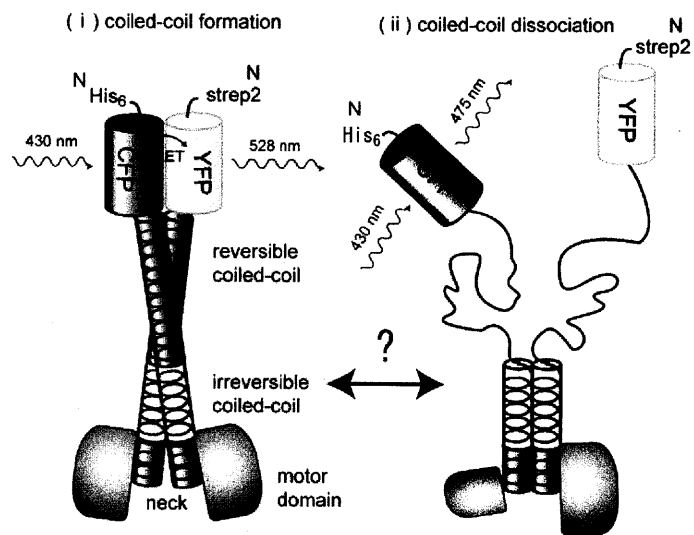


図 3. FRET によるストーク構造変化の検出

まとめ

本研究により結晶構造で見えないストークドメインの領域が柔軟な構造をとりうることを示唆された。またストークの柔軟性が ncd の運動に重要な要因であることが明らかになり、ncd の運動機構がこれまでに提唱されている単純なレバーアーム様の運動モデルには当てはまらない可能性が示唆された。本研究の進展により、微小管をマイナス端方向に進むキネシンの運動の詳細な解明が期待される。