

## 論文内容の要旨

### 論文題目

「Single molecule FRET observation of motor protein kinesin  
(一分子 FRET 法を用いた分子モーターキネシンの二足歩行メカニズムの研究)」

氏名 森 徹平

キネシンは、ATP を加水分解しながら細胞内の微小管上を一方向に連続移動し、物質の輸送に寄与するモータータンパク質である。最近の研究により、キネシンはヒトが歩くように2足歩行運動をしていることが明らかになった(ハンドオーバーハンドモデル)。しかし、ATP 加水分解より得られる化学エネルギーがいかにしてこのような精緻な2足歩行に変換されているのか、その仕組みについては理解が進んでいない。本研究は、1分子 FRET 法とよばれる蛍光観察手法を用いて「機能中の」キネシンの構造状態を詳細に解析することで、その2足歩行運動メカニズムの理解を目指した。

### 1. ATP 結合待ちの構造状態解析

キネシンの運動を説明するモデルとしてハンドオーバーハンドモデルが広く受け入れられているが、運動中に現れる遷移構造やATP加水分解との対応関係は不明瞭であった。中でもATP結合待ちの構造状態は、2つ頭部が協調する仕組みを理解する上で重要とされ、両頭部結合状態説と片頭部結合状態説を巡って激しく議論されてきたが、両者は明確に区別されていなかった。

そこで私は、1分子 FRET 法(Tomishige et al *NSMB* 2006)を用いてATP結合待ち状態の直接観察を試みた。まず、2つの頭部の特定箇所に蛍光色素を導入し、色素間の FRET 効率測定によって片・両頭部結合状態を区別する方法を確立した(図1)。続いて、この方法を用いて運動するキネシンを観察したところ、飽和ATP条件下ではほぼ両頭部結合状態にあるのに対し、低濃度ATP条件下(ATP結合が律速)では片頭部結合状態が長くなることを見出され、ATP結合待ちが片頭部結合状態であることが強く示唆された。さらに、片頭部結合状態にATPが結合すると、微小管に結合している頭部のネックリンカーが構造変化を起こして、浮いた頭部が後方から前方に移動することで次のステップが可能になることが示唆された。

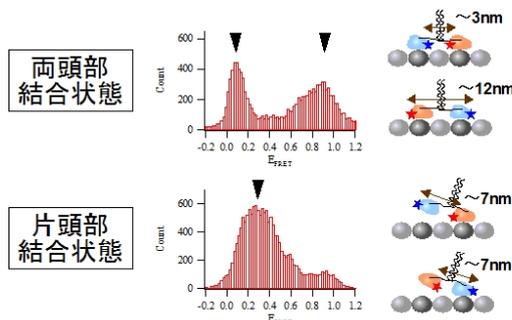


図1: 一方の頭部と前端と他方の頭部の後端の距離を1分子 FRET 法により計測することで、片・両頭部結合状態を区別できる

### 2. 浮いた頭部の再結合を防止する仕組み

キネシンが一定方向に運動するためには、ATP結合を待つ間(片頭部結合状態)に浮いた頭部が後方の微小管結合部位へ再結合してはならない。私はこの仕組みを説明するために、まず「ADP放出および微小管強結合状態へ遷移にはネックリンカーが後ろを向く必要がある」という作業仮説を立て

た。これに従うと、ATP 結合待ち状態では微小管に固く結合している頭部のネックリンカーは後ろを向くので浮いた頭部は後方に位置することになる。一方、浮いた頭部が後方の微小管結合部位に結合しようとしても、ネックリンカーが前に引っ張られるので微小管への結合が阻害される、というモデルが導かれる。

このモデルを実験的に検証するために、私は、ネックリンカー伸長変異体を作成した。ネックリンカーを伸長すると、内部負荷が低下するために、2つの頭部のネックリンカーは互いに自由な方向を向くことができると考えられる。よって、浮いた頭部が後方の微小管結合部位にアクセスした時にネックリンカーは容易に後ろを向くことができることになり、片頭部結合状態の維持が困難になると予想できる。実際に観察を行ったところ、挿入するグリシンの数を増やすにつれ片頭部結合をとる時間（割合）が減少し、7つまで増やしたところでほぼ両頭部結合にとどまることが見出された(図2)。又、この時2つの頭部のネックリンカーは共に後ろを向いていた。これらの結果は上述のモデルは支持するものである。

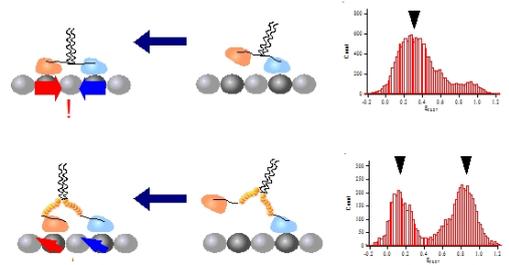


図 2: ネックリンカーを人工的に伸ばすと、ATP 待ち状態で片頭部結合を維持できなくなった

### 3. 両頭部結合状態における前後関係認識の仕組み

キネシンが一定方向に二足歩行するためには、1) ATP 結合が起こった後に浮いた頭部が前方へ移動して両頭部結合状態へ遷移し、2) 後ろ頭部が先に解離することが必要である。これらの仕組みを理解するためには、加水分解前後の遷移構造を詳しく調べる必要があるが、時間分解能の制約から非常に困難であった。

そこで私は、加水分解反応ステップが遅い R203K 変異体 (Klumpp et al *JBC* 2003) の運動を解析することで、加水分解前後の遷移構造状態に対する知見を得ることを試みた。まず単頭 R203K の構造状態を調べたところ、ATP 存在下でも微小管に固く結合し、ネックリンカーは後向きのみであった。続いて、野生型ホモダイマーよりも 10 倍程遅い速度で連続運動する R203K/WT ヘテロダイマー (Thoresen et al *Biochemistry* 2008) の運動を観察した。このヘテロダイマーが飽和 ATP 存在下で

運動する様子を 1 分子 FRET 法により観察したところ、律速段階は R203K 頭部が後ろで野生型が前にある両頭部結合状態であり、野生型頭部が R203K 頭部を追い越す遷移ステップは正常に起きていることが分かった(図3)。又この律速段階において、R203K 頭部の解離を待つ野生型頭部のネックリンカーは後ろを向いていた。これらの結果は、ネックリンカーの構造変化は、浮いた頭部の前方移動に寄与するというよりは、加水分解およびそれに続く微小管からの解離に必要であることを示唆するものである。さらにこの示唆を元に、両頭部結合状態では前頭部のネックリンカーは後ろに引

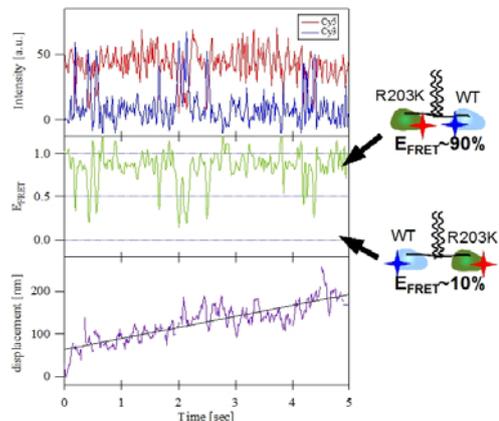


図 3: R203K/WT ヘテロダイマーが運動中には、R203K 頭部が後ろで野生型が前にいる両頭部結合状態にとどまる時間が長かった

張られて前に向くことができないために加水分解および解離が抑制される、というモデルを提案した。

本研究の成果を以下にまとめる。

- 1-1) 富重らによって開発された 1 分子 FRET 法によるキネシンの構造検出手法を発展させて、頭部結合状態を区別する方法を確立し、ATP 結合待ち状態が片頭部結合構造であることを示した。
- 1-2) ATP が結合すると、微小管に結合した頭部のネックリンカーが前を向いて浮いた頭部は前方に移動し、次のステップが可能になることが示唆された。

(Mori T, Vale RD, Tomishige M *Nature* 2007)

- 2) ネックリンカーを人工的に伸ばすと、ATP なし条件下で片足結合状態が維持できなくなった。又この時、微小管に結合する 2 つの頭部のネックリンカーは共に後ろを向いた。

(Makino T, Mori T et al 投稿準備中)

- 3) ATP 加水分解が遅い変異体の構造状態を観察したところ、ネックリンカーのドッキングは浮いた頭部の移動に必須ではなく、むしろ後ろ頭部を解離させるために必要であることが示唆された。

(Mori T et al 投稿予定)

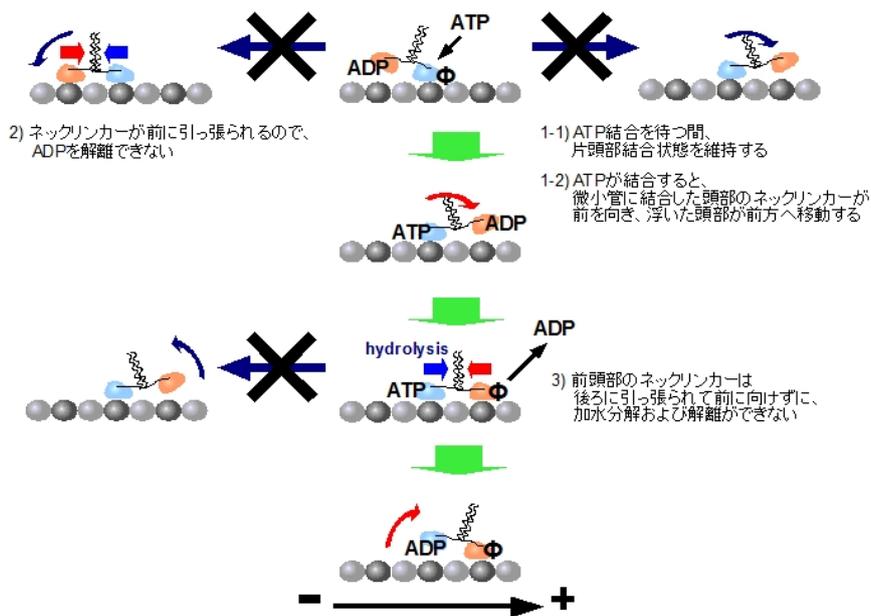


図 4: キネシンの協調的 2 足歩行メカニズムのモデル