

論文の内容の要旨

論文題目

「分子モーターキネシンの ATP 加水分解反応を制御する仕組み」

氏名 凌 霄

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）。キネシンがこのような2つの頭部を交互に踏み出して進むためには2つの頭部（別々の分子）間での協調性が欠かせないが、その仕組みについては理解が進んでいない。私は頭部間をつなぐネックリンカーと呼ばれる部位に着目し、それぞれのネックリンカーにかかる負荷を介して2つの頭部が ATP 加水分解のサイクルを制御し合い、連続的に運動できるというモデルを考えた。本研究では、ネックリンカーに関する様々な変異体を作成し、生化学分析や1分子蛍光観察に加えクライオ電子顕微鏡法などの様々な手法を用いて、ネックリンカー部位がキネシン頭部の ATP 加水分解反応を制御する構造基盤を明らかにすることで、キネシンの協調的な2足歩行運動メカニズムの理解を目指した。

1. キネシンの ATP 加水分解反応に対するネックリンカー変異の影響

ネックリンカーとはキネシン二量体の2つの頭部をつなぐ部位であり ATP 加水分解反応に伴って頭部に強く docking する。この構造変化によって浮いたもう一方の頭部を進行方向へ投げ出す（パワーストロック）ことがキネシンの連続的な運動に重要であると考えられてきた（Rice, Nature, 1999）。キネシンが hand-over-hand モデルで連続的に運動するためには、両頭部結合状態において後頭部が微小管から解離するまで前頭部が先に解離してはいけない仕組み（front head gating）が必要である。私は作業仮説として、ネックリンカーの頭部への docking は頭部の ATP 加水分解に必要であると考えた（図1）。この仮説が正しいとすれば、両頭部結合状態では前頭部のネックリンカーは後へピンと引っ張られているため、docking が妨げられて加水分解が進まずに解離できない。一方、後頭部ではネックリンカーが前へ引っ張られるため docking が容易に起こり正常に解離できる。よって、上記の front head gating の仕組みを説明できる。

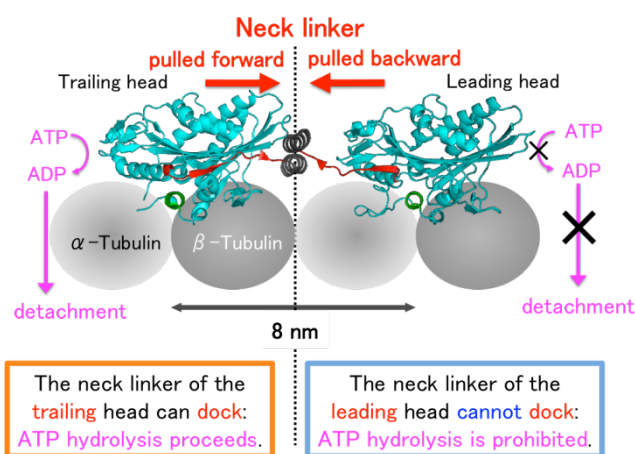


図1. ネックリンカーによる加水分解の制御を表すモデル

この仮説を検証するために、まずはネックリンカーの欠失変異体を作成してその ATP 加水分解活性を測定したところ、ネックリンカーを完全に欠失させると酵素活性はほとんど失われた。つまり ATP 加水分解のためにはネックリンカー部位が必要不可欠であることが確かめられた。続いてネックリンカー上のどのアミノ酸が加水分解に寄与しているかを詳しく調べるために、様々なアラニン置換変異体を作成し活性の測定を行った。その結果 325 番目のイソロイシン (I325) を置換した変異体は他のどの変異体よりも酵素活性が著しく低下した (図 2)。つまり、キネシン頭部の ATP の加水分解の制御には I325 が最も大きく寄与していることがわかった。

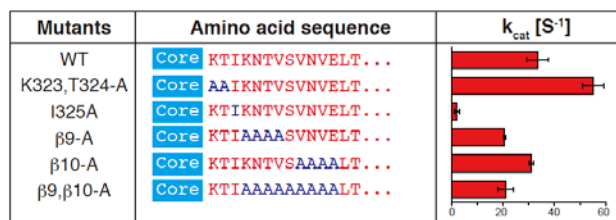


図 2. アラニン置換変異体の ATPase 活性測定

2. ネックリンカーの疎水アミノ酸の ATP 加水分解制御における役割

I325 残基がどのように加水分解反応に寄与しているのかを調べるために ATP 結合前後のキネシンの結晶構造を比べたところ、ATP 結合状態では頭部にできた疎水的な隙間を埋めるように I325 の側鎖が結合していた。過去には、この結合がネックリンカーの docking あるいは ATP 結合状態の頭部全体の構造を安定化しているというモデルも提案された (Vale and Milligan, Science, 2000) が実験的に確かめられたことはなかった。そこでこの考えを確かめるために I325 を他のアミノ酸に置換した変異体を作成した。

まず ATP 加水分解活性を調べたところ、疎水性のアミノ酸については側鎖が小さくなるにつれて活性は低下していった。それに対して親水性のアミノ酸では側鎖の形に関わらずほとんど活性を示さなかった。次にこれらの変異体のネックリンカーが正常に docking できるかを 1 mM AMPPNP 存在下で一分子 FRET 法 (Tomishige et al *NSMB* 2006) を用いて調べた。その結果、疎水性アミノ酸では側鎖が小さくなるにつれて docking 状態をとる頻度は下がり、親水性アミノ酸ではほぼ undock 状態をとっていた。よって、I325 の疎水的でかつ大きな側鎖は、キネシン頭部での加水分解とネックリンカーの安定的な docking の両方に必須であることがわかった。さらにネックリンカーの docking の頻度は ATPase 活性と強く相関しており (図 3)、I325 が頭部の疎水ポケットを塞ぐことで加水分解反応を促進させるというモデルを支持するものである。

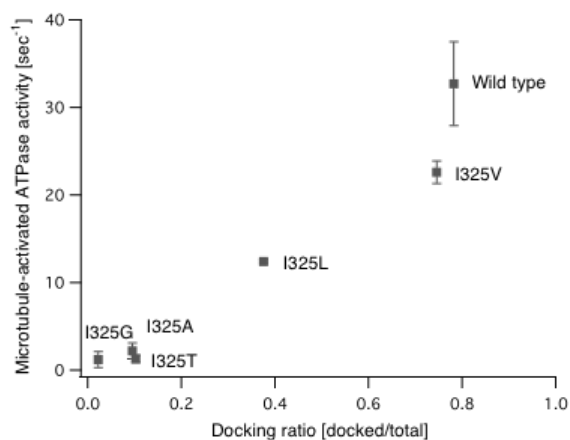


図 3. I325 変異体のネックリンカーの docking 頻度と加水分解速度の関係

3. クライオ電子顕微鏡法による ATP 加水分解反応を制御する構造基盤の研究

上記の結果より I325 の側鎖が頭部の疎水ポケットを埋めることで加水分解反応を促進することが示唆された。しかし疎水ポケットと ATP 結合部位はキネシン頭部を挟んで反対側に位置しているため、直接作用することは出来ない。これを説明するために、私は ATP 結合に伴う頭部の回転を介して疎水ポケットと ATP 結合部位の間でアロステリックな情報のやり取りが起きているというモデルを考えた (図 4)。

微小管のマイナス端方向から見たとき ATP の結合に伴い頭部全体が反時計回りに回転し、ATP 結合部位は閉じて反対側では疎水ポケットが開く。このとき I325 がこのポケットを塞がなければ、疎水性の側鎖が溶液中に露出し不安定な状態になるため、頭部は逆向きに回転して元へ戻ろうとする。一方、I325 が疎水ポケットを塞いだ場合は頭部の回転が安定化されて加水分解が進むというモデルである。このモデルが正しいとすれば I325 を側鎖が最も小さい G (グリシン) に置換してしまう (I325G) とヌクレオチドが結合しても頭部が回転した状態を安定に取れないことが予想される。そこで、I325G 変異体が微小管上でどのような構造状態をとっているのかをクライオ電子顕微鏡法を用いて詳細に調べることにした。なおこの実験に関しては東京大学医学系研究科の吉川研究室との共同研究である。

野生型キネシンでは ATP 結合状態をとると知られている AMPPNP 存在下で観察したところ、ヌクレオチドは結合しているがネックリンカーは docking していない構造であった。しかし頭部全体としては、回転前の apo 状態とも回転後の ATP-like 状態とも異なる新たな構造であった。最近当研究室ではキネシンの詳細な結晶構造解析からキネシンは微小管上で ATP 加水分解に伴って構造変化を起こすが、そのときキネシン内部では大きく 3 つのドメインに分かれてそれが一塊として構造変化していることが明らかになった (Makino 2011)。そこで、I325G の結果をドメインごとに細かく見て行くと前側 (ドメイン F) は apo 状態によく合っており、後ろ側 (ドメイン R) は ATP-like 状態により合っていた (図 5)。つまりドメインごとに異なるヌクレオチド状態の構造をとっていた。この結果は、頭部は ATP 結合に伴って一気に回転するのではなく、ドメインごとに順番に構造変化していくこと示唆しており、I325G ではその構造変化が途中で止まってしまったと

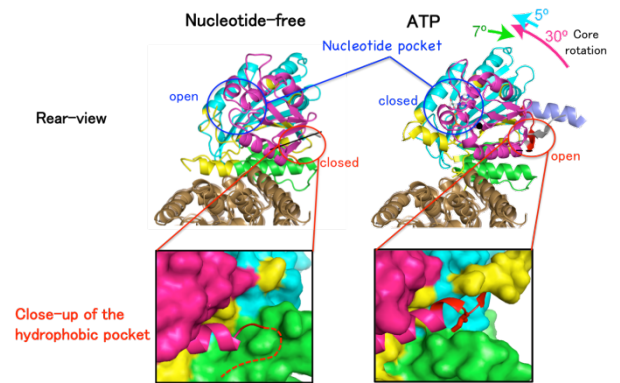


図 4. ATP 結合に伴う頭部の回転

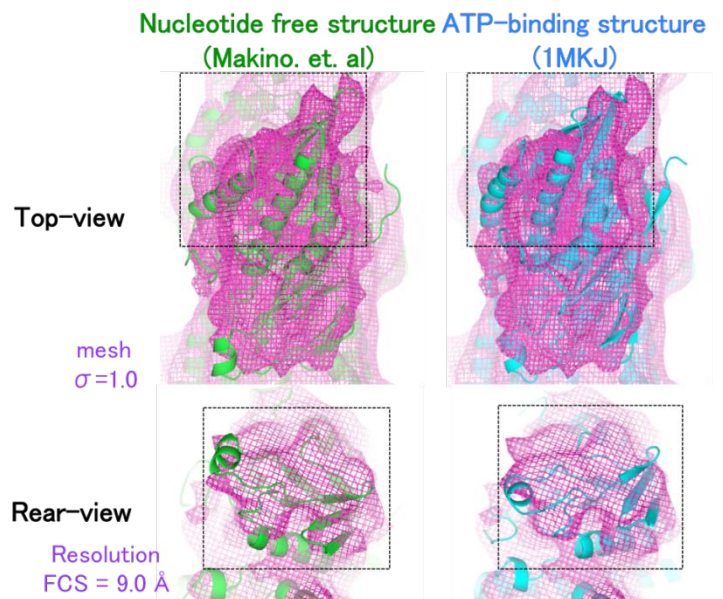


図 5. I325G 変異体の Cryo 電子顕微鏡による観察結果

考えられる。このドメインごとの連動した動きを考慮すると、I325Gの結果は以下のように説明できる。ATP結合によってまずドメインRが回転し、それに伴ってドメインFも回転するが、頭部の疎水性ポケットが開く(図6)。しかしI325をグリシンに置換しているため疎水ポケットを埋められず、ドメインRが回転後、ドメインFが回転前という反応の中間状態で停止してしまう。

以上、クライオ電子顕微鏡観察によってI325G変異体は、AMPPNP存在下でも頭部が回転した状態を安定的には取れないことがわかり、I325の疎水ポケットへの結合がキネシン頭部のドメイン間の連動を促進し加水分解反応を進めていることを示唆していた。これらの結果はキネシンのATP加水分解反応に関する新たな知見を与えるものである。

4. まとめと考察

上記の様々な実験結果を基に、キネシン頭部のATP加水分解反応におけるネックリンカーの役割を示すモデルをたてた(図6上)。まずは頭部からADPが解離して微小管上に結合する。続いて頭部へのATP結合に伴って最初にドメインRが時計回りに回転する。次にドメインFが回転して頭部の疎水ポケットが開く。このポケットをI325の側鎖が埋め、さらにネックリンカー全体がdockingすることで初めてドメインFの回転が安定化され、加水分解反応が進む。加水分解が終了してADP状態になると微小管から解離する。

さらにこのモデルを用いれば、キネシンダイマーの協調性に関する重要な未解決問題である”front head gating”の仕組みを説明することが出来る(図6下)。つまり両頭部結合状態では前頭部のネックリンカーは後へ引っ張られているためにI325が疎水ポケットを埋めることが出来ず、ATPの加水分解が進まずに微小管から解離しない。一方後頭部ではネックリンカーが容易にdockingできるため微小管解離がスムーズに起きる。これによって後頭部は選択的に解離し、キネシンは連続的に運動している。

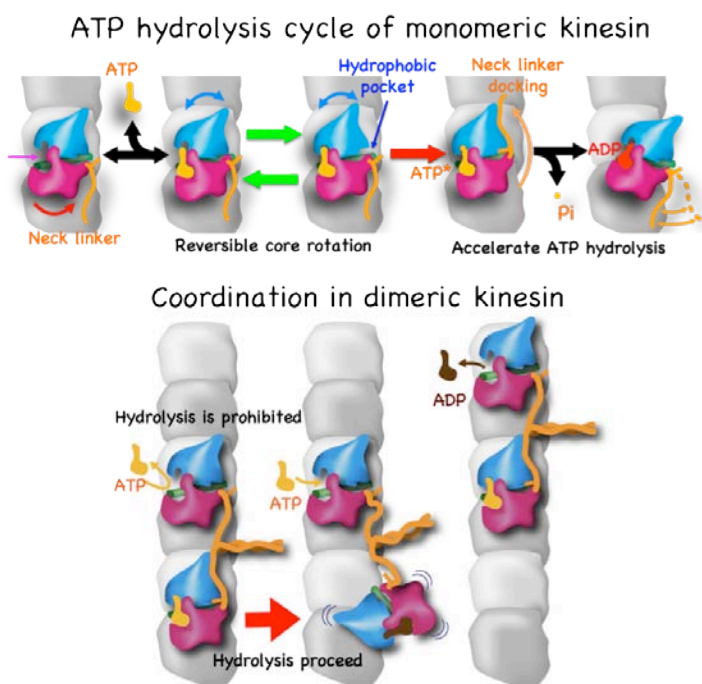


図6. モノマーのATP加水分解反応サイクルとダイマーのATP協調的な運動を説明するモデル