

## 論文内容の要旨

### 論文題目

# The motility mechanism of the single-headed kinesin motor, KIF1A. 単頭型キネシンモーターKIF1A の運動機構

氏名：岡田康志

従来型のキネシンは、一本の微小管上を連続的に 100 ステップ以上運動することが出来る。この性質は、細胞内で小胞などの積荷を輸送するために重要だとされている。これまでに、キネシンの 2 量体構造が連続的な運動を行うために必須であることが示されてきた。この結果を説明する運動機構として、2つのモータードメインを交互に用いるという二足歩行モデルが提唱されている。常に一方のモータードメインが微小管に結合したまま前進するので、微小管から解離することなく連続的に運動を行うというモデルである。

私たちは、新しいキネシン KIF1A を発見し、それが単量体のままで高い運動活性を示すことを示した。この結果は、従来の二足歩行モデルとは異なる新しい運動機構を示唆している。そこで私たちは、単量体キネシン KIF1A の 1 分子が微小管上を連続的に運動できるか否かを検討した。

そのために、まず、蛍光顕微鏡を改良することにより、蛍光色素 1 分子で標識したキネシン 1 分子の運動を実時間で観察・測定できる実験系を構築した。この実験系を用いることで、単量体の KIF1A 分子 1 個ずつが微小管上を連続的に運動する様子を直接的に示すことが出来た。運動の連続性は、平均  $6.1 \pm 0.8$  秒であった。さらに、ATP 加水分解の速度と反応産物の ADP 放出の速度を測定することで、加水分解反応の連続性を生化学的に測定した。ATP 加水分解速度と ADP 放出速度の比は KIF1A で約 690 となり、KIF1A が微小管と 1 回結合すると、平均 690 回の ATP 加水分解反応を行うことが示された。ATP 加水分解速度を用いて換算すると、KIF1A の微小管への結合時間は、平均 6.3 秒となる。この結果は、1 分子運動アッセイの結果とよく一致しており、独立な 2 つの測定系によって、単量体キネシン KIF1A が微小管上を連続的に運動できることが示された。また、1 分子運動アッセイの結果、単量体の KIF1A の動きは確率的で、大きく揺動しながら平均的にはプラス端方向へと進むことが判った。この特徴は、バイアスのあるブラウン運動とよく合致していた。同じ条件で、二量体の従来型キネシンは、すでに報告されていた通りに直線的な動きを示す。この動きの特徴の違いは、運動機構の違いを反映していると考えられる。

次に、単量体のままで連続的に運動する機構を検討した。KIF1A と微小管の結合は、塩強度に敏感であることから、静電相互作用の寄与が示唆された。微小管の表面は強くマイナスに帯電しているため、キネシン表面のプラス荷電がよい候補となる。KIF1A および KIF1A と近縁のキネシンでは、従来型キネシンや 2 量体型キネシンとは異なり、ループ 12 にリジンが 5~6 個並んだ特徴的な配列が挿入されて長くなっている。このリジン 6 個からなるペプチドを合成したところ、 $K_i=80$  nM という強力な拮抗阻害を示した。

この結果をさらに確認するために、ループ 12 の変異体を作成した。KIF1A のループ 12 を他のキネシンのループ 12 と入れ替えることで、リジンの数を 6 個(KIF1A)、4 個(KIF1C)、2 個(KIF4)、1 個(従来型キネシン KIF5C)と変化させた変異体を作成し、微小管との結合を測定した。ループ 12 の変異体では、強結合状態(アポ状態および ATP 結合状態)での微小管との結合は変化しないが、弱結合状態(ADP 結合状態)での微小管との結合はリジンの数に応じて変化した。結合の自由エネルギー変化に換算すると、リジン 1 残基あたり  $0.25 k_B T$  ずつ結合が強くなった。この結果は、ループ 12 のリジンが、弱結合状態での微小管との静電相互作用に寄与していることを示している。

これらの変異体の微小管上での運動を測定すると、弱結合状態での微小管との結合の強さ( $K_d^w$ )と、運動の連続性( $\tau_{mec}$ )の間には  $\tau_{mec} \propto 1/K_d^w$  という関係にあることが示された。このことは、弱結合状態で微小管から外れる速度定数( $k_{off}$ )が、運動の連続性を決める主要な因子であると示唆している。

逆に、単量体では連続的な運動活性を示さない従来型キネシンのループ 12(リジン 1 個)を KIF1A のループ 12(リジン 6 個)と入れ替えた変異体を作成した。KIF1A の変異体の結果と同様に、強結合状態での微小管との結合は変化せず、弱結合状態での微小管との結合が強くなり、連続的な運動活性を示すようになった。

以上の結果は、弱結合状態での微小管との結合が、単量体型キネシンの連続的な運動の重要な中間状態であることを示唆する。そこで、弱結合状態での KIF1A の微小管との結合を 1 分子運動アッセイの系で直接観察した。すると、弱結合状態の KIF1A は、確かに微小管と結合はしているものの、微小管上で静止しているのではなく、微小管に沿った 1 次元ブラウン運動をしていることが判った。同じ実験条件で強結合状態での微小管との結合を観察すると、KIF1A は微小管上で静止していた。

このように静止状態と 1 次元ブラウン運動を繰り返すことでバイアスのあるブラウン運動を生成する運動モデルとして、フラッシュ・ラチェットモデルが知られている。そこで、酵素反応速度および 1 分子運動アッセイの結果から得られたパラメータの値を用いて定量的なモデルを作成した。こうして得られたモデルは、ATP 濃度を変化させた条件および ADP を添加した条件での 1 分子運動アッセイの結果とも定量的によく一致し、単量体型キネシンがフラッシュ・ラチェット型のブラウン運動モーターという運動機構で動いていることが強く示唆された。