

Title	一分子計測法により明らかになったモータータンパク質キネシンの二足歩行の仕組み(ナノバイオダイナミクス,研究会報告)
Author(s)	富重, 道雄
Citation	物性研究 (2006), 85(5): 624-629
Issue Date	2006-02-20
URL	http://hdl.handle.net/2433/110403
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

一分子計測法により明らかになった モータータンパク質キネシンの二足歩行の仕組み

東京大学大学院・工学系研究科・物理工学専攻

富重 道雄

キネシンは微小管の上を移動することにより細胞内での物質輸送に関わるモータータンパク質である。一分子で連続的に運動することができるため、歩く分子モーターとも呼ばれる。キネシンは微小管結合能を有するモータードメインを2つ持ち、またモータードメインから伸びるネックリンカーと呼ばれる短い部位が ATP 加水分解に伴って構造変化をすることが知られている。このネックリンカーの構造変化をベースにした2足歩行モデルが提案され、一分子計測法を用いた研究によって、このモデルを支持する結果が得られつつある。

分子モーターとは、ATP の加水分解によって得られるエネルギーを力学的な仕事に変換するタンパク質の総称である。分子モーターは、それ自身で特定の機能を果たすことができるという点で、分子サイズの機械（分子機械）と呼ぶこともできる。だが我々の身近に存在するマクロな機械と比較すると、分子機械はさまざまな面で異なる特徴を持っている。最大の違いは、分子モーターはサイズが 10 nm 程度と非常に小さく、構造の安定性や機能発現において、熱揺らぎの影響を大きく受けるという点にある。それに対して我々の身近にある機械は構造が固くて機能する際の揺らぎが少ないため、分子モーターの構造や動作原理はマクロな機械とは全く異なると考えられている。

分子モーターの一種であるキネシンは、細胞内での微小管に沿った物質輸送に関わるモータータンパク質である。細胞内では微小管と呼ばれる細胞骨格が核近傍から細胞周辺へ向けて放射状に伸びており、細胞の形態維持やオルガネラの配置に関与している。キネシンは、この微小管上を、ATP の加水分解によって得られるエネルギーを利用して移動する。微小管は極性を持つ（プラス端とマイナス端）が、キネシンは微小管のプラス端方向にのみ移動するという性質を持つ。またキネシンは一分子でも微小管から離れることなく 1 μm 以上の距離を連続的に運動することができるという非常に特異な性質も持っている。後述するように一分子のキネシンは微小管に対する結合部位を2つ持っているため、キネシンはこの2つの結合部位を交互に動かしながら微小管上を歩くようにして運動するのではないかと考えられてきた。大きさが 10 nm 程度しかないキネシンがいかにして2本足で歩くのであろうか？もしその2足歩行の仕組みが解明されれば、マクロな機械との違いが明らかになり、さらにはナノマシンを設計する際の指針としても活用することができるだろう。

ではキネシンの動作機構を明らかにするにはどのような手法が有効なのであろうか？分子モーターの研究は近年目覚ましい進展を遂げているが、それには構造生物学と一分子計測技術および遺伝子工学技術の3つの研究手法の発展によるところが大きい。一般的にタンパク質は構造を変化させることによって、さまざまな機能を発現している。そのため、各状態における詳細な構造を知ることがタンパク質の機能を理解するためには必須である。これまでに構造生物学の手法を用いてキネシンのさまざまな状態における構造が明らかにされ、ATP加水分解のエネルギーがどのような構造変化を引き起こすのかが明らかになりつつある。一方、タンパク質は構造変化を通して固有の機能を発現しており、その機能発現を物理化学的に計測することもまた必須である。一分子計測技術を用いることにより、分子モーターの運動特性（ステップサイズや運動速度、力発生）を直接測定することができるようになり、機能を定量的に議論することができるようになった。さらに、遺伝子工学技術を用いて、改変分子モーターを人工的に作成することができるようになった。この技術と一分子計測技術を組み合わせることによって、構造生物学によって明らかにされた分子モーターの構造の中で、どのパーツがどのような機能特性に必要なのかと言った、構造と機能を関連づける研究も進められるようになった。本稿では、一分子計測技術によって明らかにされつつあるキネシンの動作原理について、我々の研究成果を中心に記述することにする。

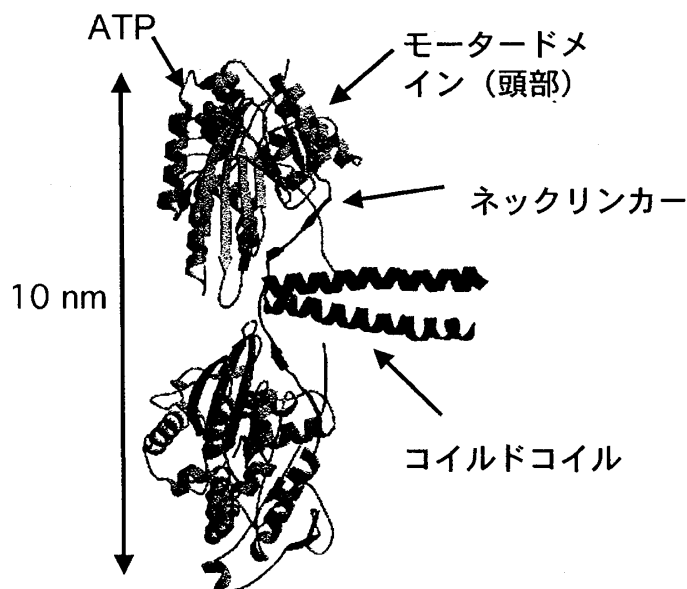


図1. キネシンの結晶構造 (Kozielski et al. 1997)。キネシンは2量体を形成し、ATPを結合し加水分解するモータードメイン（頭部）を2つ持つ。この頭部が微小管との結合能も有する。2つの頭部はコイルドコイルで束ねられている。頭部とコイルドコイルの間には、ネックリンカーと呼ばれる15アミノ酸残基程度の部位が存在する。この部位がATP加水分解に伴って構造変化すると考えられている (Rice et al., 1999)。

まず、キネシンの動作原理についてこれまでに明らかにされてきたことを、構造生物学の成果を中心に簡単にまとめてみよう。図1に示すように、キネシンは二量体を形成しており、ATP 結合能および微小管結合能を持つモータードメイン(頭部)を2つ持っている(Kozielski et al. 1997)。このモータードメインとコイルドコイルの間にはネックリンカーと呼ばれる部位が存在する。このネックリンカーが ATP 加水分解に伴って構造変化することが Rice らによって示された(Rice et al., 1999)。それによると、頭部に ATP が結合した状態では、ネックリンカーは頭部にくっついてβシート構造をとっている(ドッキング状態)が、ATP が加水分解されて ADP 状態もしくは ATP の無い状態になると、ネックリンカーは頭部から外れてランダムな構造をとるようになるのである。一方、頭部の微小管に対する親和性も、ATP 加水分解に伴って変化することが知られている。頭部に ATP が結合した状態もしくは ATP が無い状態では微小管に固く結合し、ADP 状態になると微小管に対する親和性が大きく低下する。つまり、ATP の加水分解に伴って、ネックリンカーの構造と微小管に対する親和性が変化するのである。その詳しい仕組みについては、各状態の結晶構造を比較することによって、構造レベルでの説明がなされている(Kikkawa et al. 2001, Nitta et al. 2004)。

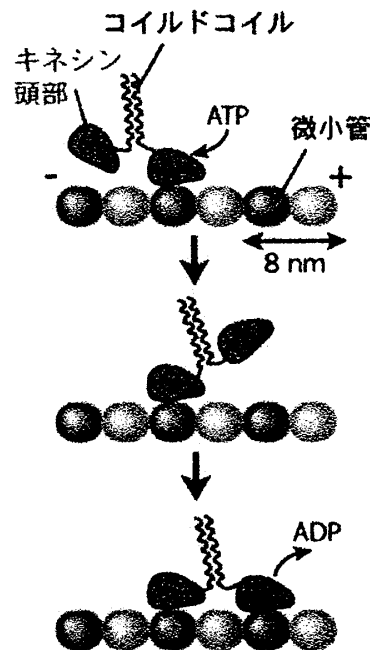


図2. キネシンの微小管上の運動を説明するための2足歩行モデル。微小管に結合している方の頭部に ATP が結合すると、その頭部にネックリンカーがドッキングし、それによってもう一方の頭部 (ADP 状態にある) が微小管のプラス方向に投げ飛ばされる。そうすると、投げ飛ばされた方の頭部は微小管に結合できるようになり、その頭部から ADP が解離する。これを繰り返しながら歩くように移動するというモデルである。

これらの結果をベースにして、図2に示すようなキネシンの歩行モデルが提案されている (Vale and Milligan, 2000)。片方の頭部が微小管に結合し、もう一方の頭部が微小管から離れている状態 (片足を上げた状態) を考える。微小管に結合している方の頭部に ATP が結合すると、その頭部のネックリンカーが構造変化を起こして頭部に結合しドッキング状態になる。その動きによって、もう一方の頭部は微小管のプラス方向に振られ、飛ばされた方の頭部は前方の微小管結合部位に結合することができるようになる (両足をついた状態)。その後、後方の頭部が ATP を加水分解して ADP 状態になると微小管から解離し、再び最初の片足を上げた状態に戻る。この一連の動きを繰り返すことによって二本足 (頭部) を交互に動かし、まさに微小管上を歩くようにして移動するというモデルである

このモデルはまだ証明されてはいないが、このモデルを支持する証拠が一分子計測を用いた研究によって得られつつある。このモデルのポイントの一つは、ネックリンカーの構造変化がキネシンの連続的歩行に必須であるという点である。我々は、ネックリンカーの構造変化を阻害すると、キネシンの連続的運動能が阻害されることを示した (Tomishige and Vale, 2000)。具体的には、キネシンのネックリンカーを頭部にクロスリンクすることにより構造変化できないようにした。遺伝子組み換え技術を用いて、2つのシステイン残基をネックリンカーと頭部に一つずつ導入し、酸化処理をすることによりシステイン残基の間でジスルフィド結合を形成させた。クロスリンクする前後の連続的運動能を一分子蛍光観察法 (図3)

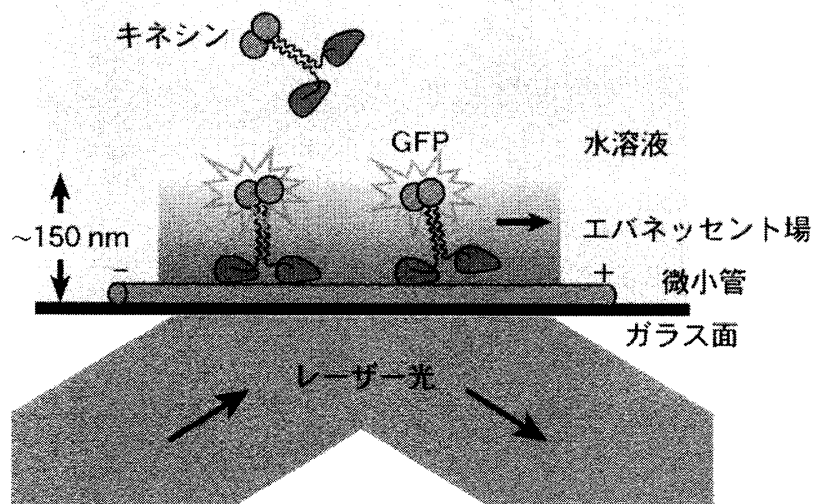


図3. 全反射蛍光顕微鏡を用いた、キネシン一分子の運動の観察。ガラス表面に張り付けた微小管上を、蛍光色素で標識したキネシンが運動している様子を観察する方法である。全反射顕微鏡を用いると、全反射面付近の蛍光色素のみを選択的に励起することができる。そうすることにより、溶液中からのバックグラウンドを大幅に減らして、蛍光色素一分子を S/N よく観察することができるようになる。

を用いて調べたところ、ネックリンカーをクロスリンクする前は連続的に一方向に運動していたキネシンが、クロスリンクさせた後（酸化処理後）は、運動の方向性を失い、微小管の上を一次元拡散運動するようになった。この結果は、ネックリンカーの構造変化がキネシンの運動の方向性と連続的運動能の両方に必須の働きをしていることを示すものである。我々は現在、より直接的にネックリンカーの構造変化と連続的運動能の関連を明らかにするために、蛍光共鳴エネルギー移動法を用いて運動中のキネシンのネックリンカーの構造変化を検出することを試みている (Tomishige et al. 2004)。

次に、キネシンが本当に2つの頭部を交互に動かしながら運動しているのかどうかを検証するために、キネシンの片方の頭部に蛍光色素を一つつけて、その蛍光色素の運動をナノメートルの精度で計測した (Yildiz et al. 2004)。もし、先程述べた2足歩行モデル (hand-over-hand モデル) が正しいとすると、片方の頭部に付けた蛍光色素は、16 nm と 0 nm のステップを交互に取りながら移動すると予想される。もし、異なる歩き方、例えば、尺取り虫のように片方の頭部が常に前方になるように足を動かしている (inchworm モデル) とすると、8 nm のステップのみが観察されるはずである。遺伝子組み換え技術を用いてキネシンの片方の頭部にのみ一つ蛍光色素をつけて、キネシンが運動する際の片方の頭部の動きを観察したところ、蛍光色素は16 nm のステップを取りながら移動していた。この結果は、2つの頭部を交互に動かしながら歩いているというモデルを支持するものである。

キネシンはおよそ 10 種類のサブファミリーからなる。2足歩行モデルはこれらのキネシンにすべてに共通する仕組みなのであろうか？キネシンの中には単頭で安定に存在する KIF1/Unc104 ファミリーと呼ばれる単頭型キネシンが存在する。この単頭型キネシンは、*in vitro* では微小管上でバイアスのかかった一次元ブラウン運動を行うことが示されている (Okada and Hirokawa, 1999)。果たして細胞内でも一次元ブラウン運動を用いて輸送を行っているのだろうか？我々は、KIF1/Unc104 キネシンも、濃度を上げることにより二量体を形成することができることを示した。また、二量体を形成すると、一方向に連続的に運動することを示した (Tomishige et al. 2002)。さらに、KIF1/Unc104 キネシンは、PIP₂ と呼ばれるリン脂質に特異的に結合し、輸送小胞膜上での PIP₂ 濃度の局所をコントロールすることによって、小胞輸送の効率が大きく変化することを示した (Klopfenstein et al. 2002)。これらの結果は、KIF1/Unc104 キネシンにおいては、二量体形成が輸送のコントロールの手段として用いられている可能性を示唆するものである。つまり、普段は不活性型の構造 (単頭構造) をとっているが、必要に応じて二量体が誘導され、輸送が開始・停止されるという考え方である。

以上のように、一分子計測法を用いることにより、キネシンの歩行の仕組みが明らかになりつつある。歩行の鍵となるのは、ATP の加水分解に伴うネックリンカーの構造変化と、

それに伴う2つの頭部の交換である。分子モーターの働きには、構造変化が大きな鍵を握っているのである。したがって、構造と機能を詳しく調べ、それらの間の相関を一分子計測法を用いて明らかにすることが、分子モーターの仕組みを理解するための早道であろう。

参考文献

- 1) Kozielski, F. et al. The Crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, **91**: 985-994, 1997.
- 2) Rice, S. et al. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*, **402**: 778-784, 1999.
- 3) Kikkawa, M. et al. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature*, **411**: 439-445, 2001.
- 4) Nitta, R., Kikkawa, M., Okada, Y. and Hirokawa, N. KIF1A alternately uses two loops to bind microtubule. *Science*, **305**: 678-683, 2004.
- 5) Vale, R. D. and Milligan, R. A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, **288**: 88-95, 2000.
- 6) Tomishige, M. and Vale, R. D. Controlling kinesin by reversible disulfide cross-linking: identifying the motility-producing conformational change. *J. Cell Biol.*, **151**: 1081-1092, 2000.
- 7) Tomishige, M., Stuurman, N, and Vale, R. D. Testing kinesin walking models using single molecule FRET analysis, *Biophys. J.* **86**, 527a (2004).
- 8) Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R. D., and Selvin, P. R. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, **303**: 676-678, 2004.
- 9) Okada, Y. and Hirokawa, N. A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science*, **283**: 1152-1157, 1999.
- 10) Tomishige, M., Klopfenstein, D. R., and Vale, R. D. Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. *Science*, **297**: 2263-2267, 2002.
- 11). D. R. Klopfenstein, M. Tomishige, N. Stuurman, and R. D. Vale. Role of Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate Organization in Membrane Transport by the Unc104 Kinesin Motor. *Cell*. **109**: 347-358 (2002).