

## X線溶液小角散乱による植物(イネ)キネシンのエネルギー変換に伴う構造変化の解析 山田正文、田中啓子、久保優子、梅津のぞみ、丸田晋策 (創価大・工・生命情報工学)

我々は、イネゲノム上にコードされるキネシンの中から植物特有のものを見だし、その性質と構造そして生理的な役割を明らかにすることを試みている。今までの研究により マウス従来型キネシンのモータードメインに相同性が高い 6 つのイネキネシンをコードするプラスミドから、確立している方法により 5 つのキネシン(K16, N14, O12, L05, D04) のモータードメインを発現させることに成功した。そして生化学的な方法により特徴づけを行った結果、これらのキネシンはマウス従来型キネシンと異なる特徴的な性質を持つことが明らかになった。特に K16 は極めて興味深い性質を示した<sup>1)</sup>。従来型のキネシンは活性部位に ADP が安定に結合しており、その ADP を取り除いた構造は非常に不安定で変性しやすいことがわかっている。これに対して、イネキネシン K16 では活性部位から ADP を取り除いても極めて安定な状態を維持していることが明らかになった<sup>2)</sup>。さらに ADP が結合した K16 モータードメインの結晶化及びその構造解析に成功した。その基本的な構造は動物種の従来型キネシンと類似していたが、おもしろいことに機能部位での局所的な構造が明らかに異なっていた。その中で最も特徴的な構造は、エネルギー変換に重要であると考えられているネックリンカーと呼ばれる領域が、他のキネシンには見られない方向に向いている事であった。これらの構造の違いが、イネキネシン K16 の特徴的な性質を反映しており、キネシンのエネルギー変換機構を考える上で大変重要な知見であると考えられる。しかしながら、結晶構造からは ATP 加水分解に伴う溶液中の本来の構造変化を明らかにすることはできない。

そこでイネキネシン K16 の構造が生理的溶液条件において ATP 加水分解サイクルに伴ってどのように構造変化するかを明らかにすることを目的として、キネシンの加水分解サイクルの異なる中間体を示す数種類の K16 キネシン・ATP アナログ複合体を形成させ X 線溶液小角散乱法を用いてモータードメインの構造変化を解析した。そして、動物種の従来型キネシンにおいても同様の解析を行いイネキネシンの結果と比較を行った。

**イネキネシン-GFP 融合蛋白の調製** エネルギー変換に伴うキネシンの構造変化をより効果的に X 線溶液散乱法で解析できるようにするために、ATP 加水分解に伴い大きく構造が変化することが示唆されているイネキネシンのネックリンカーと呼ばれる領域の C 末端側に蛍光蛋白として知られている筒状の構造をもつ GFP を連結したキネシン-GFP 融合蛋白を調製した。キネシン-GFP 融合蛋白をコードする cDNA を調製して、申請者がマウスキネシンにおいて確立した方法に従い、イネキネシンのモータードメインをコードする DNA を発現ベクターにサブクローニングして大腸菌を用いて発現させた。

**X 線溶液小角散乱測定** エネルギー変換の異なる中間体を反映するキネシン-GFP・各種ヌクレオチド複合体の X 線溶液小角散乱を測定して、慣性半径、Pr 関数等を比較してネックリンカー領域がどのように構造変化しているか解析を行った。

nucleotide-free K16-GFP の慣性半径は約 42 Å であった。これに対して ATP 存在下では慣性半径は 39 Å に減少した。また ADP 存在下でも 38 Å の小さい値を示した。このように nucleotide ではイネキネシン-GFP 融合タンパクはコンパクトな構造を取ることが示された。この結果は結晶構造にみられる特徴的なネックリンカーのコンホメーションを反映していると思われる。Nucleotide 非存在下ではネックリンカーは従来型キネシンの ADP 結合した構造に見られるような docking 状態あり、nucleotide 存在下では結晶構造に見られるようにネックリンカーが docking していない特徴的な構造をしていると考えられる。

- 1) "Preparation and characterization of a novel rice plant specific kinesin" Umeki, N., Mitsui, T., Umezu, N., Kondo, K., & **Maruta, S.** (2006) **J. Biochem.** **139**, 645-654.
- 2) "Conformational change of the loop L5 in rice kinesin motor domain induced by nucleotide binding" Umeki, N., Mitsui, T., Kondo, K., & **Maruta, S.** (2006) **J. Biochem.** **139**, 857-864.