



キネシン分子モーターの仕組み

早稲田大学理工学部物理学科 川口憲治, 上村想太郎, 石渡信一

Kinesin motors are mechano-enzymes that hydrolyze ATP to generate force and directional movement along a microtubule. Nucleotide-dependent conformational changes of the head and neck region of kinesin have been shown by cryoelectron microscopy and spectroscopic techniques. Single molecule analysis supports key predictions of the hand-over-hand model for motility of dimeric conventional kinesin, whereas the discovery of a processive one-headed kinesin strongly supports the biased Brownian ratchet model. In this short review, we summarize the present status of research on the mechanism of kinesin motility.

kinesin / microtubule / unbinding force measurements / hand-over-hand model / biased Brownian ratchet model

1. はじめに

キネシンは、ダイニンに続く微小管系の第2のモータータンパク質として約15年前にイカの神経軸索で見出された¹⁾。細胞内で小胞や細胞内小器官の輸送を行い、順行性（神経体からシナプス末端へ向かう）の軸索流や、細胞分裂時の中心体の分離と紡錘体の形成にも重要な役割を担っている。ゲノム解析の結果、キネシンは10種のサブファミリーに分類され（キネシン様タンパク質, KRP）、ヒトやマウスでは45種類が同定されている。最初にイカから精製された天然のキネシン（従来型キネシン, conventional kinesin とよぶ）は一般に神経軸索にあって小胞輸送を担い、340個のアミノ酸からなる相同な2つの球状頭部をもつ（図1）。キネシン分子モーターは、この2つの頭部が微小管との結合・解離を交互に繰り返しつつ微小管のプラス端（重合端）側に向かって“歩く”リニアモーターであるといわれている。そこにはATP加水分解と共役した巧妙な仕組みが存在する。

キネシンの特徴は、たった1分子でも微小管から解離することなく長距離（1 μm 程度）かつ長時間（1秒程度）にわたって運動を持続するというプロセス性（逐次前進性）にある。このことと、分子量が小さく安定なことから、キネシンはミオシンやダイニンに比べて研究しやすく、最近の研究の進展には目覚ましいものがある。原子間力顕微鏡（AFM）や光ピンセットによる1

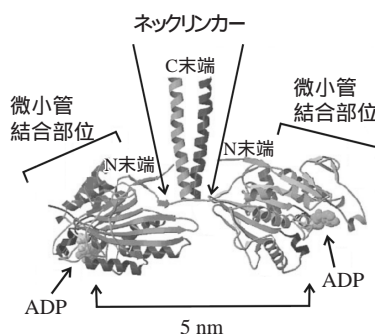


図1 従来型キネシンの立体構造¹²⁾

ホモダイマーのN末端側にある2つの頭部は、それぞれ同じ微小管結合部位とATP/ADP結合部位をもつ。両方の頭部にADPを結合している状態では頭部の間隔は約5 nmである。

分子操作・計測、電子顕微鏡構造解析や光学顕微鏡による1分子イメージングなどの生物物理学的手法、それに加えて、特定のアミノ酸を置換した変異体を調製できる遺伝子工学的手法を用いた多くの研究成果が報告されている。ここでは、これまでに明らかになった実験事実とキネシンの歩く仕組みを中心に解説し、我々の研究成果を交えてまとめるとともに、未解明な部分や今後解明すべき興味ある問題について述べる。

Molecular Mechanism of Kinesin Motor

Kenji KAWAGUCHI, Sotaro UEMURA and Shin'ichi ISHIWATA

Department of Physics, School of Science & Engineering, Waseda University

2. キネシンの歩行メカニズム

2.1 Hand-over-hand モデル

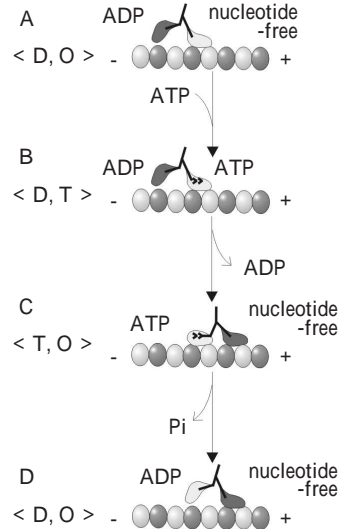
研究初期の重要な生化学上の発見は、キネシンに結合したADPの解離を微小管との結合が促進するというものであった。精製したキネシンはその両方の頭部にADPを結合している。ADPの結合はキネシンの構造を安定化し、解離速度は非常に遅い(キネシンはヌクレオチドがないと変性しやすいが、微小管に結合すると安定化する)。ところがそこに微小管を加えると、結合していたADPの半分が解離した。さらにATPを加えると、もう半分のADPが解離した。この結果の解釈は、一方の頭部が微小管に結合するとADPを解離し、その頭部にATPが結合することによってもう一方のADP結合頭部が微小管に結合できるようになり、ADPの解離が起こるといものである。このことから、微小管に結合した頭部にATPが結合すると、キネシンは次の一步を踏み出すための構造変化を起こす、という描像が生まれた²⁾³⁾。

双頭構造をもつ従来型キネシンはプロセスであり、微小管から解離するまでに8 nm ステップを1秒間に100回以上繰り返す⁴⁾。8 nmは α , β サブユニットから成るチューブリンヘテロダイマー(微小管の構成単位)のサイズに対応する。また、従来型キネシンはタイトカップリング型モーターであり、8 nm ステップは1回のATP加水分解を伴う。では、ATPase サイクルのどの段階でステップを生じるのだろうか? ATP結合時か、それとも加水分解した後か?あるいは前頭部が結合する瞬間にステップが生じるのだろうか? ATP結合に伴ってネックリンカーと呼ばれる部分が構造変化を起こすことがわかっているが(2~4節で詳述)、これにはエネルギー変化がほとんど伴わないといわれている。したがって、少なくともATP結合時ではないと推測される。モーターのステップとATPase サイクルの各段階との対応づけは確定していない。最近西山ら⁵⁾によって8 nm ステップが2つの4 nm ステップからなっていることが示されたこともあり、この問題は今後キネシンの歩行メカニズムを解明する上での鍵である。

キネシンのプロセス性を説明するために以前から提案されているのが、hand-over-hand モデルである⁶⁾⁸⁾。図2-1に、現在知られているこのモデルの大筋を示した。

- (A) ADP結合状態で精製されたキネシンの一方の頭部は、微小管に結合すると直ちにADPを解離してヌクレオチドなし状態で結合する。もう一方の頭部はADPを結合したまま解離状態にある。
- (B) 微小管と結合している頭部にATPが結合するとその頭部内のネックリンカードメインが構造変化を

1. Hand-over-hand モデル



2. Biased Brownian ラチェットモデル

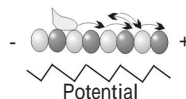


図2 1. さまざまな実験結果にもとづいて提案されている、hand-over-hand モデル

キネシンがそれぞれのヌクレオチド状態で構造変化を起こし、単頭、双頭結合を繰り返す。O: ヌクレオチドなし(nucleotide-free), D, T, Pi はそれぞれADP, ATP, 無機リン酸を表している。

2. Biased Brownian ラチェットモデルの概念図

単頭キネシンと微小管との相互作用ポテンシャルとしてノコギリ歯状のものを仮定。ATP加水分解とブラウン運動を巧みに利用しつつ一方に進む様子を表す。

起こしてプラス端方向に固定される(結合頭部の2重矢印)。

- (C) その結果、解離頭部は前方に移動し、微小管の結合部位に結合できるようになり、ADPを放出してヌクレオチドなし状態で結合する。つまり、この瞬間に双頭結合になる。
- (D) 後頭部に結合したATPは加水分解され、リン酸が放出されるとネックリンカードメインはまたもとの状態に戻り、後頭部は微小管から解離する(リン酸が放出される前に解離するのか、放出後に解離するのかは不明)。

このように、キネシンでは、ATP/ADPの結合部位にある硬いらせん構造をとったリン酸感受性ループと、ATPが結合すると固定されるネックリンカードメインとの間にアロステリック制御が働くと考えられる。

2.2 キネシンのプロセッシブ性とメカノケミカルサイクル

分子モーターがプロセッシブであるためには高い duty ratio (1回のATP加水分解サイクルに占める結合時間の割合) が必須であるという考え方がある(図3)。双頭構造をもつ分子モーターがプロセッシブであるためには、それぞれの頭部の duty ratio は少なくとも0.5以上でなければならない。0.5以下だと双頭ともに解離してしまう瞬間が生じると考えるのである。一方、筋肉を構成する非プロセッシブなミオシンIIでは、duty ratio は0.01 ~ 0.1であり、したがってアクチンフィラメントに滑り運動を引き起こすためには10 ~ 100個の頭部が必要だというわけである(注: ミオシンIIの duty ratio については異論がある⁹⁾)。

2.3 破断力測定による結合様式の決定

キネシンのヌクレオチド結合部位はヌクレチドなし状態と、ATP、ADP・Pi、ADP結合の、少なくとも4つのヌクレオチド状態をとるはずである。この4つのヌクレオチド状態と、強結合・弱結合状態、および解離状態を区別したキネシンのメカノケミカルサイクルに関するモデルが上記のhand-over-handモデルであり、これを立証するためにはキネシンの2つの頭部がどのヌクレオチド状態で単頭結合なのか、あるいは双頭結合なのか、またこの2状態間の転移はいつどのように行われるのかを決定する必要がある。双頭キネシン・微小管複合体のクライオ電子顕微鏡による画像解析は決定的でなく、ヌクレオチドなし状態とAMP-PNP(非分解性のATPアナログ)存在下の両方で単頭結合が優位に観察されるという報告⁹⁾と双頭結合が優位であるという報告¹⁰⁾の両方がある。しかし、これらの結果は、微小管(チューブリン)よりもモル比で過剰なキネシン分子を加

えた条件下で得られたものであり、隣接して結合することによってキネシン(あるいはチューブリン)の構造が歪んでいる可能性が指摘されている¹⁰⁾。

我々は最近、微小管に結合している1分子のキネシンの力学特性をそれぞれのヌクレオチド状態で調べ、単頭結合か双頭結合か、あるいは単頭結合であっても強結合か弱結合かの結合様式に関する直接的な証拠を得た^{11), 12)}。1分子の従来型キネシンが吸着したポリスチレンビーズを光ピンセットで捕捉・操作し、微小管に結合させた上で、微小管に平行にプラス端、あるいはマイナス端方向に負荷を加える。この結果の破断曲線や、破断直前の変位・負荷関係を解析することによって、キネシン・微小管複合体1分子結合の破断力と複合体の弾性率を求めた(図4)。AMP-PNP存在下(<T, O>に対応)での破断力と弾性率は、ともに、ヌクレオチドなし状態(実験条件からみて<D, O>に対応)あるいはAMP-PNPとADPとの共存状態(<D, T>に対応)で得られた値の2倍となった。この結果は、AMP-PNP存在下ではキネシンは双頭結合であり、あとの2状態では単頭結合であるということを強く示唆している。

また、破断力の大きさは、ヌクレオチド状態によらずプラス端よりもマイナス端方向に負荷をかけたときのほうが約1.4倍大きかった。このように、キネシン・微小管結合は負荷を加えることで不安定化し、しかもそれが負荷の向きに関して非対称になっている。そこで、双頭結合状態では双頭ブリッジを通じての内部応力が存在すると仮定すると、プラス端側に負荷を受ける後ろの結合頭部が比較的不安定で、解離しやすい傾向にあると推測できる。

2.4 ネックリンカーの構造変化の検出

キネシンと微小管の結合状態を捉えたクライオ電子顕微鏡解析もキネシン頭部の動きについて有力なヒントを与えた⁹⁾。ヌクレオチドなし状態で結合頭部のマイナス端側に位置していた解離頭部が、AMP-PNPを加えると結合頭部のプラス端側へと移動しており、結合頭部のネックリンカーと呼ばれる部分が大きく構造変化しているように見えた。この結果は、ネックリンカーのC末端部を金コロイドでラベルしたキネシンモノマーにAMP-PNPが結合すると、期待通りに金コロイドの位置が頭部内を移動したことで最近確かめられた¹³⁾。それによると、微小管に結合した頭部のネックリンカーは、ヌクレオチドなし状態、あるいはADP結合状態では動きやすい状態にあるが、ATPが結合すると微小管のプラス端方向に向かって振れ、結合頭部の表面に固定される。この動きを利用して解離頭部は前方のチューブリン分子の結合部位に近づき、結合できるようになると考え

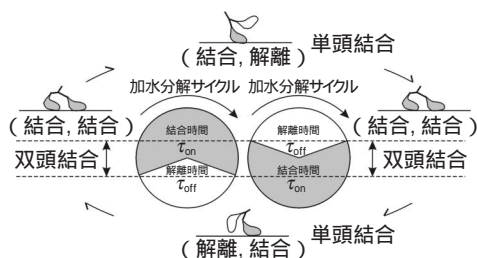


図3 プロセッシブモーター

双頭構造をもつ分子モーターがプロセッシブに運動するためには、各頭部の duty ratio (結合時間の割合) は少なくとも0.5以上であることが必要。この図は、ATP加水分解サイクルにおける2つの頭部の結合・解離のサイクルの位相が互いに180度ずれているという点で、頭部間の協調性を示している。

キネシン分子モーターの仕組み

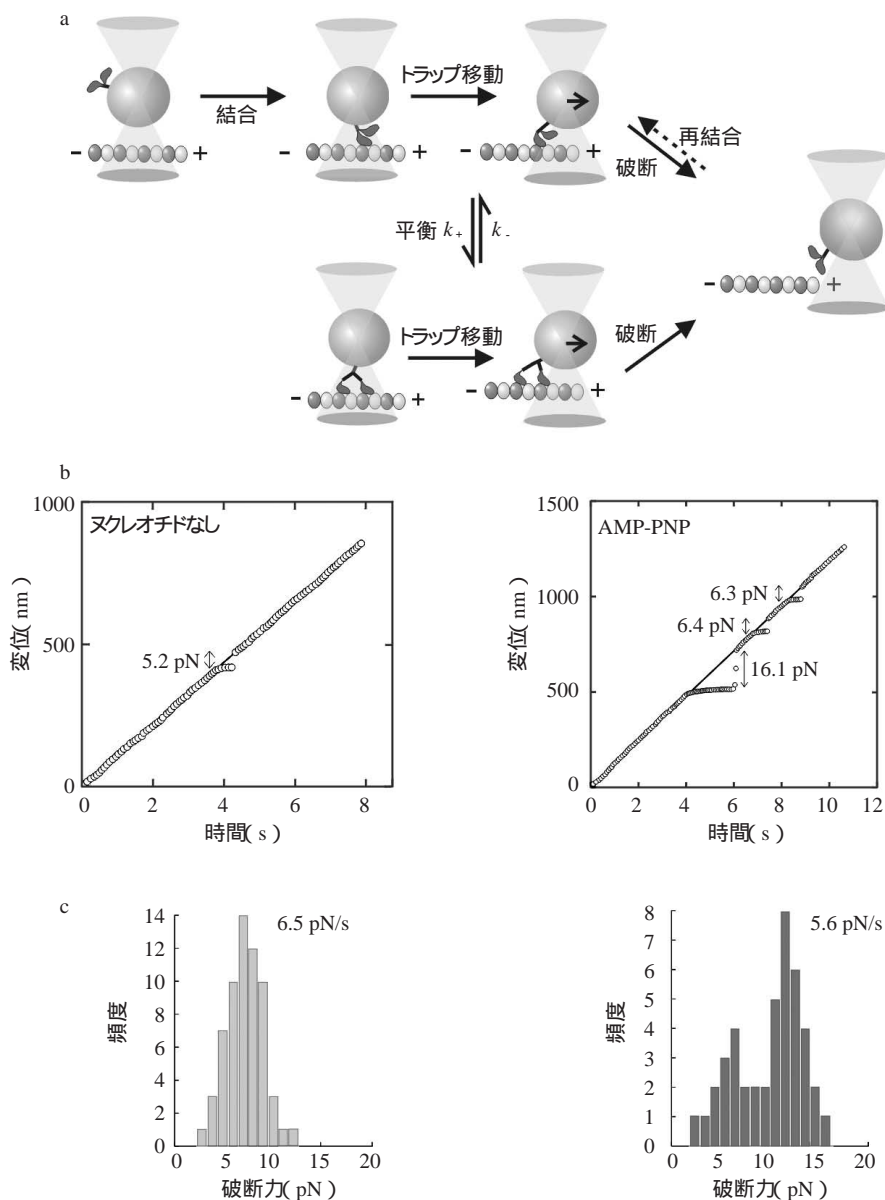


図4 光ピンセット法による1分子キネシンの運動・力学測定

(a) キネシン1分子を吸着した直径1 μm のビーズを、ローダミンで蛍光標識した微小管上へと光ピンセットを用いて移動し、相互作用させる。さらに捕捉中心を移動することによって、キネシン・微小管結合に負荷を加えると、結合が破断する。この測定は繰り返し行うことができる。(b) 光ピンセットの捕捉中心(実線)とビーズ中心(丸印)の距離から、キネシンに加わる負荷を計算することができ、破断の際の負荷(破断力)の大きさから結合状態(強・弱、単頭・双頭)を特定することができる。また弾性率を見積もることもできる¹⁰⁾。特にAMP-PNP状態では、一度破断が起こった後も、微小管に沿って捕捉中心を動かし続けると、再結合・再破断が繰り返し起こる(図a参照)。(c) ヌクレオチドなし状態(左)と、AMP-PNP状態(右)での破断力分布(数字は負荷上昇速度)。

る。このように、せいぜい15 nmしか離れていない2つの頭部¹⁴⁾がどのようにして8 nmのステップを踏めるのかという前々からの疑問が、ネックリンカーの構造変化で説明できるようになった。

それでは単に双頭構造であればプロセッシブになるかという、そうではない。キネシン様モータータンパク質であるncdは双頭構造をもつにもかかわらず非プロセッシブであり、連続して2回ステップすることさえできないからである¹⁵⁾。従来型キネシンが高いプロセッシブ性をもつ秘密は、少なくとも一方の頭部が常に微小管に結合しつづけていることにある。すなわち、単にduty ratio が0.5以上であるというだけでなく、結合している頭部はもう一方の頭部が次の結合部位に結合するまでは離れない、という特別な仕組み(双頭間の協調性)が存在することになる。

2.5 Biased Brownian ラチェットモデル

hand-over-hand モデルがキネシン分子自身の構造変化を中心に提案されたモデルであるのに対し、ブラウン運動(熱揺らぎ)や相互作用ポテンシャルの非対称性が中心的な役割を果たしていると主張するのが、biased Brownian ラチェットモデルである¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。このモデルでは、キネシンと微小管の分子間相互作用ポテンシャルはノコギリ歯状になっていて、熱揺らぎによってポテンシャルの山を越えるか、ATPの加水分解に伴ってポテンシャルが変形するかによってキネシンが一方に移動できるようになると考える(図2-2)。最近、このモデルを支持するような実験データが、単頭キネシン様モータータンパク質のKIF1Aで報告されている¹⁹⁾。単頭のKIF1Aが解離せずに平均1 μmも微小管のプラス端方向に移動するのである。

どのような仕組みで、単頭KIF1Aは微小管から解離することなく一方に移動できるのだろうか? 微小管と結合しているKIF1Aの触媒部位の構造を、ADP状態とAMP-PNP状態とで電子顕微鏡解析し、X線結晶解析で得られた構造をあてはめて解析すると、ADP状態の触媒部位の長軸(頭部は楕円形をしている)はAMP-PNP状態のそれよりも20度ほど時計回りに傾いていた。つまり、AMP-PNP状態のほうが、KIF1Aの触媒部位が微小管のプラス端方向、つまり歩行する方向に向いているとみることができる²⁰⁾。その上、KIF1Aはキネシンと同様の微小管結合部位とリシンに富むループ(K-ループ)をもっていて、このループがチューブリンのグルタミン酸に富むC末端部と結合する。つまりKIF1Aは単頭内部に2つのチューブリン結合部位をもっていて、これを利用して解離することなく運動することがわかってきた²⁰⁾。事実、このループを削除した

り変異させたりするとプロセッシブ性が減少した。さらに、従来型キネシンの単頭部分(そのままでは非プロセッシブ)のK-ループをリシン6個分だけのばすと、KIF1Aと同様にプロセッシブにすることができた。

KIF1Aの歩行運動は、その速度が大きく変動するという点でキネシンと異なる。さらに興味深いことに、KIF1Aの移動ステップは、ATPの加水分解と1:1に対応しなかった。無負荷のときでさえ、1ステップの間に数個のATPが分解した。これらのことは、KIF1Aの移動運動に、微小管に沿った拡散(ブラウン)運動が大きな役割を演じていることを示唆する。この点が、1ステップと1個のATP分解とが対応する(タイトカップリング)従来型キネシンと大きく異なる。ところで最近喜多村らによって、ミオシンIIの単頭酵素断片(S1)が1個のATP分解に対して5.5 nmのステップを1~5回行うこと(ルースカップリング)を示す結果が得られた²¹⁾。したがって、ミオシンの運動は確率的な分子機構によることが示唆されている。つまり、分子モーターは自らの構造変化だけでなくブラウン運動を巧みに利用して方向性運動を生み出しているというのがこのモデルの本質である。

3. キネシンの運動方向性の決定

キネシンは微小管のプラス端方向に歩行運動するが、同じキネシンファミリーでもncdやKer3、それに細胞質ダイニンがマイナス端方向に運動する。特にキネシンとncdではモーターコア(モータードメインのうちネックリンカーに相当する部位は含まない)のアミノ酸配列や立体構造がほとんど同じであるにもかかわらず運動の方向性が異なる。事実、キネシンのモーターコアをncdのモーターコアと置換しても運動方向はプラス端方向であり、逆の組み合わせにしても、マイナス端方向へのncdの運動性は変わらなかった。

両者が構造の上で大きく異なる点は、二量体を形成するcoiled coil部分とモーターコアをつなぐドメイン(キネシンの場合はネックリンカーを含む)である。そのため、そのドメインの遺伝子改変による運動性の変化が研究され、ncdのモーターコアをキネシンのモーターコアに置換した上で、さらにcoiled coilをつなぐLoop L0のGly347とAsn348を削除した変異体がプラス端へと運動方向を変えることが示されている²²⁾。また、Endowと樋口により、ncdの同じドメインにある340番目のAspをLysに変えた変異体は、プラス端とマイナス端のどちらにも従来型ncdと同じ速さで運動することが見出された¹⁵⁾。ちなみに、キネシンのモーターコアはN末端側にありncdではC末端側にあるが、この違いは

方向性に関与していないとされている。

このように、運動方向性の研究も、この1, 2年で急速に進んでいる。ミオシンファミリーでも、従来型のミオシンIIやミオシンVがアクチンのB端（重合端）側へそれぞれ滑り運動と歩行運動するのに対し、最近発見されたミオシンVIは逆方向のP端側へと歩行運動する。運動方向性のメカニズムについても、立体構造による空間配置や負荷の影響など、今後多角的な研究が期待される。

4. おわりに

この数年の間に、分子モーターが1分子レベルでどのように働き、力を発生するかの具体的な描像が得られるようになった。モーターコアのヌクレオチド結合部位で始まる小さな構造変化が歩行運動へと増幅されていく。生化学、クライオ電子顕微鏡、1分子計測の結果はすべて、微小管に結合したキネシン頭部にATPが結合することによって構造変化が生じることを示している。この構造変化によって、解離しているほうの頭部が微小管に結合できるようになり、そのことが後方の結合頭部に対して微小管のプラス端方向への内部負荷を生み出す。

では、内部負荷がどのようなメカニズムで、方向性運動を引き起こす分子内協調性を生み出すのだろうか？最近、一定負荷を加えるとキネシンのATPase活性が下がるという報告がある²³⁾。また我々も、外部負荷がヌクレオチド結合性（酵素活性）を変化させるという証拠を得ている（上村、石渡；未発表）。このような性質こそ、化学力学酵素としての分子モーターの本質をつくものであろう。内部負荷による分子内協調性のメカニズムを明らかにするための鍵もここにある。

今後はさらに高時空間分解能で構造変化を捉える研究が盛んになるだろう。安藤らによって開発された高速AFMによるミオシンVのリアルタイム1分子挙動観測なども注目される²⁴⁾。キネシン歩行運動における構造変化の役割をさらに明確にするためには、各ヌクレオチド結合状態での結晶構造解析が必要になる。そしてまた、ステップ中の頭部の動きを直接観察することができれば、もっと詳細にキネシンの歩行運動メカニズム、つまりそこにおける化学・力学共役の内容を理解することができるだろう。その一方で、上で述べたように、必ずしもタンパク質の構造変化を必要としないBiased Brownian ラチェットモデルのほうが正しいようにみえる現象がある。ラチェットモデルを肯定的にし

る否定的にしる実証するためには、どのような実験を組めば良いだろうか。これこそ実験家にとって大きなチャレンジである。

草稿の段階で有益な助言を頂いた広瀬恵子さん（産総研・ジーンディスカバリーセンター）に感謝します。

文 献

- 1) Vale, R. D., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. (1985) *Cell* **42**, 39-50.
- 2) Hackney, D. D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6314-6318.
- 3) Hackney, D. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6865-6869.
- 4) Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J. and Block, S. M. (1993) *Nature* **365**, 721-727.
- 5) Nishiyama, M., Muto, E., Inoue, Y., Yanagida, T. and Higuchi, H. (2001) *Nature Cell Biol.* **3**, 425-428.
- 6) Vale, R. D. and Milligan, R. A. (2000) *Science* **288**, 88-95.
- 7) Schief, W. R. and Howard, J. (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 19-28.
- 8) Howard, J. (2001) *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc.
- 9) Hirose, K., Lowe, L., Alonso, M., Cross, R. A. and Amos, L. A. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 2063-2074.
- 10) Hoenger, A. *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* **297**, 1087-1103.
- 11) Kawaguchi, K. and Ishiwata, S. (2001) *Science* **291**, 667-669.
- 12) Uemura, S. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5977-5981.
- 13) Rice, S. *et al.* (1999) *Nature* **402**, 778-784.
- 14) Kozielski, F. *et al.* (1997) *Cell* **91**, 985-994.
- 15) Endow, S. A. and Higuchi, H. (2000) *Nature* **406**, 913-916.
- 16) Vale, R. D. and Oosawa, F. (1990) *Adv. Biophys.* **26**, 97-134.
- 17) Astumian, R. D. (1997) *Sci. Am.* **285**, 56-64.
- 18) 徳永万喜洋 (1997) ナノピコスペースのイメージング - 生物分子モーターのメカニズムを見る - (柳田敏雄、石渡信一編) 吉岡書店.
- 19) Okada, Y. and Hirokawa, N. (1999) *Science* **283**, 1152-1157.
- 20) Kikkawa, M. *et al.* (2001) *Nature* **411**, 439-445.
- 21) 喜多村和郎、岩根敦子、徳永万喜洋 (2000) 生物物理 **40**, 89-93.
- 22) Wade, R. H. and Kozielski, F. (2000) *Nature Struc. Biol.* **7**, 456-460.
- 23) Schnitzer, M. J., Visscher, K. and Block, S. M. (2000) *Nature Cell Biol.* **2**, 718-723.
- 24) Ando, T. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12468-12472.



川口憲治

川口憲治 (かわぐち けんじ)

全日本空輸機運航本部操縦士訓練生

1999 年早稲田大学大学院理工学研究科物理学及応用物理学専攻博士前期課程修了, 同年より現職

研究テーマ: キネシンの 1 分子顕微解析

連絡先: 〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1 早稲田大学理工学部物理学科

E-mail: ke.kawaguchi@ana.co.jp

上村想太郎 (うえむら そうたろう)

早稲田大学大学院理工学研究科生命理工学専攻博士後期課程在学中, 日本学術振興会特別研究員

研究テーマ: キネシンやミオシン V の 1 分子力学測定による機能解析

連絡先: 同上

E-mail: 601q5207@mn.waseda.ac.jp

石渡信一 (いしわた しんいち)

早稲田大学理工学部物理学科 教授

1974 年名古屋大学大学院理学研究科博士課程単位取得退学, 理博, MIT, ボストン生物医学研究所研究員,

79 年早稲田大学理工学部物理学科専任講師, 助教授を経て 86 年より現職. 「一分子から超分子システム, そ

して細胞へ - 生命の仕組みを解析し操作する」ことをうたい文句に, 分子モーターから超分子集合体, 筋収

縮・自励振動系から筋肉細胞 (集団) へと, 1 つ 1 つ階層を上りつつある. どこまで上り下り出来るか.

連絡先: 同上

E-mail: ishiwata@mn.waseda.ac.jp

<http://www.phys.waseda.ac.jp/bio/ishiwata/index.html>