

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 矢島潤一郎

本論文「キネシンスーパーファミリーに属する分子モーターの processivity に関する研究: The Processivity of Molecular Motors in Kinesin Superfamily」は、独自に新たな 1 分子運動計測系を開発し、細胞内で微小管上を運動するモータータンパク質のメカニズムについて検討を加えたものである。この研究から得られた知見は、モータータンパク質の運動機構における寄与のみならず、他の研究領域にも応用しうる有用な測定系を確立したものととして注目される。

本論文の内容は、以下のようにまとめられる。

まず、新たな 1 分子レベルでの機能解析のためのイメージング技術を開発した。従来の GFP をプローブとして利用する 1 分子イメージング法では、GFP の光強度が弱く退色が速いため長時間の計測ができず、また、エバネッセンス顕微鏡や超高感度カメラも必要であるという問題点があった。本研究では、アクチン結合タンパク質のゲルゾリンを目的のタンパク質に遺伝子としてつなぎ、融合タンパク質として発現させた。ゲルゾリンとアクチンの 1 対 1 結合を利用して、多数のローダミンファロイジン分子でラベルした 1 本のアクチンフィラメントをプローブとして用いることで、光強度を全体として非常に強くし、長時間の計測を可能とした。空間的・時間的分解能について考察した結果、キネシン等のモータータンパク質の運動を観察し、run length(processivity), dwell time, velocity などの計測を行うのに十分な要件を満たしていた。

この計測系を用いて、キネシン分子の微小管からの解離状態を検証するため、ATP 加水分解の 4 つ遷移状態、すなわち K (ヌクレオチドのない状態、rigor)、K · ATP、K · ADP、K · ADP.Pi でのキネシン分子の微小管との相互作用時間 (結合寿命) を計測した。結合寿命は、1 分子のキネシンが微小管に結合してから遊離するまでの時間を直接観察に基づき算出した。計測の結果、キネシン分子が ATP の非加水分解アナログである AMPPNP(2mM)状態、溶液中の ATP、ADP を消費する apyrase を加えた rigor 状態では、ともに結合寿命は 300 秒以上であり、それに対し、ADP(2mM)、ADP.Pi(2 mM

ADP + 20 mM Pi)状態ではそれぞれ 0.8 秒程度であった。このことから、キネシンは微小管と安定結合している状態と、相対的に、不安定結合状態の 2 つに大きく分類できた。

次に、ATP 存在下でのキネシン分子の運動を観察し、processivity の指標としてキネシン 1 分子が微小管に結合してから遊離するまでに動いた距離(run length)とその相互作用時間 (dwell time)を ATP 濃度の関数として計測した。計測の結果、run length は、1  $\mu$ M から 2 mM の広範囲にわたる ATP 濃度でほぼ一定値(380 nm)をとり、dwell time は ATP 濃度の上昇とともに非常に短くなった。これらの結果から、キネシンが微小管から遊離する確率は、rigor 状態以外のステップ中の各ヌクレオチド状態に、ある一定の遊離確率が存在すると示唆された。そこで rigor 状態以外での遊離の可能性を検討するために、高濃度の ATP の存在する溶液に ADP を加え、同様に ADP 濃度の関数として processivity を調べた結果、添加した ADP 濃度の上昇とともに run length は減少した。このことは、キネシン分子は K $\cdot$ ADP で微小管から遊離することを示している。

さらに、同じ計測技術を用いて、本論文では、キネシンスーパーファミリーの一員で、キネシンとは微小管上を反対方向に運動するモーター分子の ncd 分子についても同様な計測を行い、ncd 分子はキネシンとは異なり processive な運動を行わないことを、直接 1 分子の挙動を観察して明らかにした。さらに、ncd の場合には ADP  $\cdot$  Pi 状態における微小管への結合寿命が非常に短く、ここに non-processive であることの原因があることを示し、ncd の歩行モデルについての考察を加えている。

本研究において、無負荷な状態でモータータンパク質の 1 分子の運動を長時間連続的に観察する系を開発したことにより、各ヌクレオチド状態での 1 分子のキネシンの微小管との相互作用の時間と距離をはじめて直接観察し、詳細に解析することが可能となった。この系で得られた結果から、キネシン分子が効率よく微小管上を一方向に移動するためには、2 つのヘッド間で 2 つの結合状態を交互に出現させ、結合状態の非対称性を調整する機構が必要であることが示唆された。

以上のように、矢島潤一郎君の学位申請論文は、新たな 1 分子計測系の開発を行い、モータータンパク質の運動機構を明らかにしたもので、細胞生物学および生物物理学の分野における意義は大きい。新たな系の開発は、種々の分子の挙動を可視化して調べる手段として卓越しており、今後の応用・発展が大いに見込まれる価値の高いものである。従って、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。