

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 牧野 司

本論文では、細胞分裂期にはたらくキネシン分子モーターである ncd の stalk 領域の構造的特性の解析と、その特性と運動機能との相関について解析を行い、その運動のメカニズムについて述べている。本論文は第一章の序論、第五章の総合考察を含む全 5 章からなる。

第一章の序論では、ATP 加水分解のエネルギーを力学的エネルギーに変換して微小管の上を一方向に運動するキネシンについて説明し、ショウジョウバエ由来 ncd が典型的なキネシンとは異なる、ユニークな運動特性を示すことを述べている。また、本研究の背景となるこれまでの先行研究から、その構造と機能に関しての問題点について説明している。その中で、ncd の二量体形成は分子の中間位置に存在する stalk 領域のコイルドコイル構造によって達成されると予想されていたが、典型的なキネシンであるキネシン-1 とは異なり、局所的にコイルドコイル形成をできる領域はなかったという報告を挙げ、より長い領域の構造的解析の必要を述べるとともに、上記の報告からわかる ncd の stalk 領域の「不安定な」構造的特徴がその運動性とどのように関わるのかという問題提起をしている。

第二章では ncd の約 160 アミノ酸残基からなる stalk 領域について様々な領域欠失ポリペプチド鎖を調製し、そのコイルドコイル形成能の解析について述べている。CD スペクトル解析と超遠心沈降速度法分析によってコイルドコイル二量体形成部位を特定し、ncd の stalk 領域のコイルドコイル形成は局所的には安定に形成されないが、隣接する領域間で協同的に形成されることを示している。その協同性により約 110 アミノ酸残基におよぶ領域において長いコイルドコイル構造が形成されていることを実証している。また、stalk 領域内の温度耐性の異なる二つの領域の存在を明らかにしており、それぞれが熱変性に対して、可逆的および不可逆的に変性することを示している。可逆的な変性を示す領域は C 末端側のおよそ 80 残基におよび、その長い領域が常温付近において協同的に変性することを示している。また不可逆的な変性を示す領域は N 末端側のおよそ 20 残基程度であり、その領域は 60℃ までの熱処理に耐えうる安定な構造を保持することを示している。その安定性について、一部明らかになっている ncd の結晶構造から水素結合や塩橋のネットワークによるものと考察を与えている。さらにこの安定な構造も隣接する領域の支援によってはじめて構造形成が可能であるということを示している。

第三章では ncd の stalk の「不安定」な構造特性とその運動機能との相関に

ついて述べている。ncd の stalk 領域にはコイルドコイル構造の両親媒性 heptad の a, d 位の疎水性コアが親水性残基によって分断され構造の不安定性を与えているという考察を行い、この a, d 位の親水性残基を疎水性に変換した ncd の stalk 領域安定化変異体を作成し、その運動機能を野生型と比較解析を行っている。その結果、上述の安定性のより低い可逆コイルドコイル形成領域の安定化は速度の低下をもたらすことが明らかになり、ncd の不安定性あるいは可逆性が運動機能に重要な意義を持つことを示した。

第四章では ncd の stalk 領域の不安定性や可逆性に着目し、その構造形成-解離が C 末端に存在するモータードメインのヌクレオチド状態によって制御されているという仮説を立て、その検証を行っている。その中で stalk 可逆コイルドコイル形成領域の N 末端に二種類の異なる蛍光タンパク質を融合させた ncd を設計し、その蛍光タンパク質間での FRET(蛍光共鳴エネルギー転移)効率の変化から可逆コイルドコイルの形成-解離を調べるという独自の検出系を用いている。その検出系を用い、温度変化測定によって 25-37°C の温度上昇において、FRET 効率が著しく低下することを示した。その転移は第二章で示した可逆コイルドコイルの解離を示すものであると考えられるが、モータードメインに ATP が結合している状態では、ヌクレオチドフリー状態に比べて、その転移温度が高温側にシフトしていることを明らかにした。このことからモータードメインのヌクレオチド状態に応じて、stalk 領域の安定性が変化していることを見出している。

第五章ではこれらの知見により、ncd の多分子での運動について考察し、ヌクレオチドフリー状態では他の分子によってもたらされる輸送微小管からの応力によって stalk 領域が解離し抵抗を緩和しているという合理的なモデルを提唱している。

以上のように本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。