

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 清水 洋輔

本論文は、微小管系モータータンパク質であるキネシンおよびダイニンについて、その構造学的な研究から運動機能への関与について明らかにすることを目的としたものである。本論文は第一章『序論』、第二章『Unc104 のコイルドコイル領域の二量化解析』、第三章『ダイニンストークヘッドの NMR 帰属とリガンド結合』、第四章『総括』の全 4 章からなる。

第一章では、キネシンとダイニンおよび微小管の系について述べている。細胞質中において、キネシンやダイニンは微小管をレールとし、カーゴ輸送や細胞分裂の進行に関与する。鞭毛や繊毛において、「9+2 構造」を形成している微小管上に配置されたダイニンは、波打ち運動に必須である。このように、キネシンおよびダイニンは細胞機能に重要な役割を担っている。しかしキネシンについては、その詳細な運動メカニズムは未だ明らかではない。ダイニンについては分子構造が解明されておらず、運動機構についても謎が多い。本論文におけるキネシンおよびダイニンの構造学的研究は、モータータンパク質に対する理解のためのみならず、細胞機能への重要な知見を与えるためにも極めて意義深く、研究対象として非常に興味深いことが説明されている。

第二章では、キネシンの一種である Unc104 について述べている。キネシン・スーパーファミリーに属する多くの構成員は、ストーク領域のコイルドコイル形成による二量体化により、運動性を発揮することが知られている。しかし Unc104 およびそれと相同の KIF1A は、溶液中で単量体との報告がある。本研究では Unc104 の二量体化能に着目し、その検証により Unc104 の運動機構についての考察を行っている。この実験のために、ストーク領域についてコイルドコイル形成の可能性が高い箇所をプログラムにより予測し、その位置の配列を含むペプチドセグメントを 20 種類以上合成し精製している。CD スペクトルおよび超遠心分析により、ストーク領域のペプチドが α -ヘリカル・コイルドコイルを形成していることが強く示唆される結果を得ている。また網羅的な CD 強度の濃度依存性測定・温度依存性測定により、コイルドコイルの形成・維持に重要な最短の領域を同定し、その解離定数が 5 μ M であることを明らかにしている。この値はヒトキネシンの対応ペプチドセグメントのもの (62 nM) に比べ 2 桁大きく、それゆえ Unc104 の二量体化能は比較的低いといえる。しかし本研究により、Unc104 が微小管上への集合などにより局所的に高濃度となることで 5 μ M を達成して二量体化しうることが提示され、Unc104 の運動機構が他のキネシンと同様に二量体化によるものであると示唆されている。また Unc104 の運動性がモータータンパク質の濃度で制御されているという、類例のないユニークなモデルが提唱されている。

第三章では、ダイニンの微小管結合部位であるダイニンストークヘッド (DSH) について述べている。ダイニンは酵素部位であるヘッドの ATPase サイクルの進行に応じ、微小管

結合能を可逆的に変化させていると考えられているが、ヘッドと DSH は離れており、酵素反応の情報伝達の機構は明らかではない。本研究では DSH の NMR 解析および相互作用解析により、微小管への結合機構に対する考察を行っている。マウス DSH サンプルについて、大腸菌による発現系を用いた大量発現および精製に成功し、微小管との共沈実験により正しく折り畳まれているであろうことを確認している。この DSH サンプルはガラス表面や空気との接触により劣化を起し、また測定時の濃度を 0.13 mM 程度までしか高められないという困難な性質を持っていたが、条件検討を重ねることで有効な NMR シグナルを取得し、主鎖連鎖帰属と 2 次構造予測に初めて成功している。それにより、塩基性残基に富む 2 つの領域が α -ヘリックスを形成していることを明らかにし、これらの箇所が塩基性残基を溶媒側に露出されることで、pI の低い微小管との結合に関与すると推測している。また、微小管上のダイニン結合部位と考えられている β -チューブリン α -ヘリックス 12 について、この配列を含むペプチド 2 つを化学合成し、より α -ヘリックス性の高いペプチドのみが DSH と結合しうることを報告し、この箇所がダイニン結合部位であろうことを直接的に示している。

第四章では総括を述べ、Unc104 については運動機構の解明に向けて、DSH については今後進むであろう完全な構造解析へ向けて、今後の展望を述べている。

以上のように、本研究で得られた知見は学術的に意義深く、大きく貢献するもの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。