

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 森 徹平

キネシンは、ATP を加水分解しながら細胞内の微小管上を一方向に連続移動し、物質輸送に寄与するモータータンパク質である。最近の研究により、キネシンは 2 つの頭部を交互に踏み出して 2 足歩行することが明らかになった。しかし、ATP 加水分解により得られるエネルギー（化学反応）がどのように 2 足歩行運動（力学運動）に変換されるのか、という点については理解が進んでいない。具体的には、2 つの頭部が加水分解に伴う微小管への結合・解離のタイミングを協調させて、(i)後ろ頭部を先に解離させ、(ii)浮いた頭部を前方へ結合させる、という仕組みは明らかになっていない。本論文は、このような 2 頭部間協調の仕組みを理解することを目標とし、1 分子 FRET 法という蛍光観察手法を用いて「生きた」キネシンの構造状態を詳細に解析した結果をまとめたものである。

本論文は、以下の 6 章から構成され、英文で書かれている。

第 1 章では、キネシンについて明らかになっている事実および未解決問題をまとめた上で、本研究の概要が述べられている。

第 2 章では、研究に用いた実験試料の調製法および、全反射顕微鏡や 1 分子 FRET 観察などの測定技術の原理・方法が説明されている。

第 3 章では、キネシンの ATP 結合待ち状態の構造解析結果について述べられている。2 頭部間協調の仕組みを理解する上で、ATP が結合する前の構造が片・両頭部結合状態のどちらであるかを明確に区別することは根本的かつ重要な課題である。そこで申請者は、1 分子 FRET 法を用いて ATP 結合待ち状態の構造を直接検出することを試みた。まず、2 つの頭部の特定の場所に一つずつ蛍光色素を結合させ、それらの間の FRET 効率を測定することにより片・両頭部結合状態を検出する方法を確立した。続いて、この方法を用いて微小管上を連続運動するキネシンの構造状態を観察したところ、飽和 ATP 濃度存在下ではほぼ両頭部結合状態にあるのに対し、低濃度 ATP 存在下（ATP 結合が律速）では片頭部結合状態をとる時間が長いことが見いだされた。さらに、片頭部結合状態から両頭部結合状態への遷移は、ATP 結合によってトリガーされており、具体的には、微小管に結合している頭部のネックリンカーが ATP 結合に伴い頭部に「ドッキング」することで、浮いた頭部が前方に移動させられ次のステップに進む、ということが明らかにされた。

第 4 章では、ATP 結合待ち状態での片頭部結合構造がいかにして維持されるのか、その仕組みが議論されている。申請者はこれを説明するために、「キネシン頭部が ADP を放出して微小管に強く結合するためには、ネックリンカーが後ろを向く必要がある」という仮説を立てた。これを元に「ATP 結合待ち状態では、微小管に固く結合する頭部のネックリンカーは後ろを向くので浮いた頭部は後方に位置して前方へのアクセスが阻害される一方、浮いた頭部が後方の微小管にアクセスしてもネックリンカーが前に引っ張られるので ADP 放出および微小管への結合が禁止される」というモデルを考えた。このモデルを実験的に検証するために、ネックリンカー部位をポリグリシン挿入により伸長させた変異体の構造状態を 1 分子 FRET 法により観察した。その結果、

ヌクレオチドがほとんど存在しない条件ではネックリンカー伸長変異体は両頭部結合構造をとり、しかもこの状態で2つ頭部のネックリンカーが共に後ろを向いていることが分かった。これらの結果は、前述のモデルを強く支持するものである。続いて、ネックリンカー伸長変異体の ATP 加水分解速度と運動特性を調べたところ、加水分解速度は野生型とほぼ変わらないのに対し、運動速度は低下することが分かった。これらの結果から、ATP 加水分解エネルギーを効率よく 2 足歩行運動に変換するためには、ATP 結合待ち状態で片頭部結合を維持することが必要であり、これが可能となるようにネックリンカーの長さは十分に短く設計されている、ということが明らかにされた。

第5章では、キネシンの運動方向性を決める上でネックリンカーが果たす役割が議論されている。そのために、ATP 結合は正常に起こるが加水分解が遅い変異体(203 番目のアルギニン残基をリジンに置換)の構造状態を詳細に解析した。まず、単頭の変異体キネシンの構造状態を観察したところ、ATP 存在下でも微小管に固く結合したまま解離することができず、又ネックリンカーがドッキング状態を安定にとれないことが見出された。続いて、野生型よりも 10 倍以上遅い速度で連続運動する変異体頭部と野生型頭部からなるヘテロダイマーの構造状態を観察した。すると、このヘテロダイマーの運動中には、野生型頭部が変異体頭部を追い越して前方に結合するステップは極めて短時間に起きるものの、後ろに位置した変異体頭部が微小管から解離するのに時間がかかる、ということが分かった。これらの結果から、ネックリンカーのドッキングは、従来考えられてきたように浮いた頭部を前方へ移動させる役割というよりも、むしろ後ろ頭部の加水分解やそれに続く微小管からの解離に重要な役割を担っている、ということが示唆された。

第6章では、本研究で得られた成果をもとにキネシンの 2 頭部間協調のモデルが提案されている。

以上のように、申請者は 1 分子 FRET 法を用いてキネシンの構造状態を詳細に解析することにより、キネシンが ATP 加水分解のエネルギーを効率的に使うことで 2 つの頭部を交互に動かすための具体的な仕組みを実験的に実証することに成功した。これは、キネシンの運動機構の理解に大きく貢献するとどまらず、タンパク質内部で複数ドメインにおける加水分解反応を互いに協調させて効率よく方向性を持つ運動を生み出す、という生命のエネルギー変換メカニズムの本質に迫るものであり、その学術的価値は高い。よって本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認められる。