

論文の内容の要旨

論文題目 Structural analysis of Kinesin Superfamily Protein KIF5C

和訳 キネシンスーパーファミリータンパク質 KIF5C の構造生物学的解析

指導教員 廣川信隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 井上茂之

背景と目的

キネシンスーパーファミリータンパク質 (KIFs) は、細胞内で微小管をレールとして膜小器官やタンパク質複合体などのカーゴを能動的に必要な部位まで輸送するモータータンパクであるが、特異的カーゴの認識・結合・脱着機構には不明な点が多い。

カーゴを運んでいない KIF は、その tail が自身のモーターを阻害する auto-inhibition 機構によりエネルギーの消費を抑えることが報告されている。その本質はヌクレオチド交換の阻害とされ、この阻害には KIF の tail 領域中でよく保存されている“IAK”領域が必須であることが生化学的にわかっているが、その構造的分子機構は未解明のままである。またヌクレオチド交換の中間状態である無ヌクレオチド状態の KIF の構造は未だに明らかになっていない。

本研究は、神経細胞内に特異的に分布する KIF5C を対象にし、この auto-inhibition による“休止状態”の立体構造を X 線結晶解析にて解明することにより、auto-inhibition の原子レベルでの機構を明らかにすることを目的とした。

方法

・KIF5C コンストラクトの作製, 発現, 精製

tail 領域コンストラクト T1 (772-956aa), T2 (816-956aa), T3 (772-926aa), T4 (816-926aa), モ

ーター領域コンストラクト M1 (1-332aa), M2 (1-372aa) を大腸菌 BL21 (DE3) を用いて発現させた。精製は固定化金属アフィニティクロマトグラフィ (IMAC) と陽イオン交換クロマトグラフィを組み合わせて行った。

•動的光散乱

M1-T3 複合体の結晶化を目的とし、その結晶化能を推定するため M1 と T3 のモル比を M1:T3 = 2:1, 1:1, 1:2 と変化させた M1-T3 混合溶液を準備し、その粒径分布の測定を動的光散乱にて行った。

•結晶化, X 線回折データ収集および構造決定

蒸気拡散法で M1-T3 混合溶液の結晶化を試みた。結晶化条件の決定は sparse matrix 法で行った。

X 線回折データ収集は PF-AR NW12A (Photon Factory) のシンクロトンビーム光源で行った。位相は分子置換法により決定し、精密化を行い、分子モデルを構築した。

さらに M1 との結合能および ATPase 活性阻害能をもつ tail ペプチド P1 との M1-P1 複合体を結晶化し、M1-T3 と同様に X 線回折データ収集と構造決定を行った。

結果

•KIF5C コンストラクトの精製条件の最適化

T3 は IMAC 後、陽イオン交換クロマトグラフィを行い、階段状の NaCl 濃度勾配で 5 つの UV 吸光度のピークが観察され、吸光度が最大となるピークで目的タンパクが分離よく高純度で得られた。

M1 は陽イオン交換にて NaCl の直線状勾配で高純度の分離が達成できた。

•動的光散乱を用いた結晶化能評価

M1 と T3 をモル比 2:1 および 1:1 で混合した場合、多分散度 %Pd はそれぞれ 36.3 %, 38.7 % であった。いずれも単一ピークではあるが %Pd が 30 % 以上と高く、結晶化に不適であると予想された。1:2 のモル比で混合した場合は %Pd が 23.1 % と小幅単一のピークが得られ結晶化に適すると判断した。またこのモル比では溶液中の分子の粒径が約 18 nm → 15.1 nm と他のモル比で混合したものよりも小さくなっていることもわかった。

•結晶化, X 線回折データ収集および構造決定

M1-T3 混合溶液からモル比 1:2, 2M 硫酸アンモニウム, 0.1M クエン酸ナトリウム pH5.5, という結晶化条件で結晶が得られた。X 線回折の結果、空間群 $P2_12_12_1$ (斜方晶系), 格子定数 $a = 71.4 \text{ \AA}$, $b = 71.7 \text{ \AA}$, $c = 181.0 \text{ \AA}$, 分解能 $50\text{-}2.97 \text{ \AA}$, $R_{\text{sym}} = 0.072$, $I/\sigma = 13.0$, Completeness = 95.2 %, Redundancy = 7.2 であった。

精密化, モデル構築の結果 ($R\text{-factor} = 0.25$, $R_{\text{free}} = 0.32$), 単位格子中に二分子のモーターが認められた。一方は nucleotide binding pocket 中に ADP のみが存在し (Mg は存在しない), もう一方は (Mg-ADP 過剰にも関わらず) 無ヌクレオチド状態であることがわかり, ヌクレオチド交換における詳細な構造変化が明らかになっている KIF1A と比較すると, $\alpha 3$ ヘリックスの C 末端側が pocket から大きく隔てられた状態にあることがわかった。

tail の電子密度は観察されなかったため, より結晶化が容易と思われた M1-P1 複合体を構造解析した結果, 一方のモーターの $\alpha 3$ ヘリックスの N 末端側に P1 とされる密度が出現しており, さらに nucleotide binding pocket 内は ADP の密度は見られず, 無ヌクレオチド状態であった。また in silico で KIF5C-微小管複合体の原子モデルを作成したが, KIF5C, 微小管双方の結合面が完全にかみ合う構造を呈しており strong binding 状態の可能性が高いことがわかった。

考察

•DLS による多分散度の測定による結晶化能の推定

DLS で単分散とされたタンパク質溶液の約 80%が結晶化したという報告がある。

M1-T3 の混合溶液ではモル比 1:2 の混合で %Pd の劇的な改善と粒径の減少が見られた。このモル比で立体構造の均一化が生じたと考えられ, KIF5C の auto-inhibition における M1 と T3 との結合に際し一分子の M1 に二分子の T3 が関与して安定した複合体を形成していると推測できる。今回は tail の立体構造が明らかになっておらず, モーター領域と tail 領域間の相互作用の詳細も構造的に示されていないため, 今後 T3 単体および M1-T3 複合体の構造解析を追加することにより, 立体構造変化の存在を明らかにできると思われる。

•KIF5C の auto-inhibition の分子機構

KIF5C の tail による auto-inhibition は, モーター領域の ADP/ATP 交換過程が阻害される結果生じることが生化学的に示されている。

今回得られた構造では tail の構造は明らかになっていないが, モーターの構造を KIF1A の ADP 放出前と比較すると $\alpha 3$ ヘリックスが 15° 程度 pocket から離れる方向に回転し, ADP 放出後との比較でも $7\text{-}8^\circ$ 程度の回転が認められた。またヌクレオチドを pocket 内に安定化する役割を持つ Mg^{2+} -stabilizer の結合も完全に切れ, その結果 pocket は大きく“開”状態に固定されたままであり, 加えてその内部は無ヌクレオチド状態であった。

また in silico での微小管とのドッキングによる結合面の様子から, 今回の構造は strong binding 状態である可能性が高いこともわかった。

M1-P1 複合体では上記の構造変化に加え, モーターの $\alpha 3$ ヘリックス N 末端側に tail ペプチドと思われる密度が新たに認められたことから, これらの構造変化は tail との混合によって引き起こされたことが示唆され, その場合自身の tail が $\alpha 3$ ヘリックスの回転, 変形や Mg^{2+} -stabilizer の解離を誘導, 維持していると予想される。この状態ではヌクレオチドは自由

に pocket 内に入り出すことができるが、 $\alpha 3$ ヘリックスが大きく開き、 Mg^{2+} -stabilizer の結合が切れているために pocket を閉じる事ができず、ATP を pocket 内にとどめておくことができない。その結果 ATP 加水分解のサイクルが進まない。これが KIF5C の自身の tail によるモーターの ADP/ATP 交換過程の阻害の分子機構、すなわち auto-inhibition のメカニズムの本質だと推測することができる。

結論

本研究では重要な KIFs の一つである KIF5C に関して、無ヌクレオチド状態の構造を初めて明らかにし、auto-inhibition のメカニズムについて新しいモデルを示した。

M1 と T3 の混合溶液から結晶を得ることができた。この結晶の X 線回折データを分子置換法で解析し、tail の構造は観察されなかったが、モーターの nucleotide binding pocket 内が無ヌクレオチド状態であること、 $\alpha 3$ ヘリックスが nucleotide binding pocket から離れる方向に大きく回転していること、さらに Mg^{2+} -stabilizer の結合も完全に切れていることがわかり、pocket は“開”状態に固定されたままであることが判明した。また in silico での微小管とのドッキングから結合面が完全にかみ合っている様子が明らかになり、今回の構造は strong binding 状態である可能性が高いことも示唆された。さらに M1 結合能および ATPase 活性阻害能をもつ tail ペプチド P1 と M1 複合体の結晶化より、M1 の $\alpha 3$ ヘリックス N 末端側に P1 が嵌り、これが一連の構造変化を引き起こしているという可能性を示した。

これらの結果から pocket は ATP が入ってきてもそれを捕獲できずに無ヌクレオチド状態が維持され、それ以上 ATP 加水分解サイクルの反応を進めることができないことが推測され、auto-inhibition の新しいモデルを提唱できた。

今まで無ヌクレオチド状態のモーターの構造はその不安定性のため明らかになっていなかったが、今回の結果からこれらの構造変化を誘導しているのが自身の tail であると考えられる。これが KIF5C の tail による ADP/ATP 交換過程の阻害、すなわち auto-inhibition の中心的分子機構である可能性が示唆された。

(3954 字)