

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 凌 霄

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的に移動し、物質輸送に関わ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足歩行運動をしていることが明らかになったが、このような運動を行うためには2つの頭部（別々の分子）間での協調性が必要である。2頭部間の協調性には頭部をつなぐネックリンカー部位への負荷が重要であると考えられてきたが、その具体的な仕組みはまだわかっていない。申請者は、ネックリンカーと頭部との相互作用がATP加水分解の促進に必要であり、前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られて相互作用できないために、ATP加水分解やそれに続く微小管からの解離が阻害されるという仮説を立てた。本論文はこの仮説を検証し、ネックリンカーがキネシン頭部のATP加水分解を制御する構造基盤を明らかにすることを目標とし、様々なネックリンカー変異体について生化学的測定や詳細な構造解析を行った結果をまとめたものである。

本論文は、以下の8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、各種生化学測定や1分子観察さらにはクライオ電子顕微鏡法などの観測技術の原理・方法が説明されている。

第3章～第5章では、ネックリンカーがキネシン頭部の加水分解に与える影響を明らかにするために、この部位を欠失させたり一部を別のアミノ酸に置換した変異体のATP加水分解活性を測定した結果について述べられている。まずネックリンカーを完全に欠失させたところ酵素活性はほとんど失われた。続いてネックリンカー上の様々な部位をアラニンに置換したところ、325番目のイソロイシン(I325)を置換したときのみ酵素活性が大きく低下した。さらにI325残基を様々な別のアミノ酸に置換したところ、側鎖の形が小さいあるいは親水的なアミノ酸では酵素活性が大きく低下した。以上の結果から、キネシン頭部のATP加水分解にはネックリンカー部位が必要不可欠であり、特にI325側鎖とキネシン頭部との相補的な疎水性相互作用が最も重要であることが明らかになった。

第6章では、ネックリンカー変異体における律速過程を明らかにするために、ATP加水分解サイクルの各ステップの速度を測定した結果について述べられている。5章で大きな活性の低下を示したI325G変異体について計測したところ、キネシンが微小管に結合する過程やADP解離の過程、お

よび ATP 結合過程の時定数は野生型とほぼ同じであったが、ATP 加水分解に伴う微小管からの解離速度は野生型に比べて 10 倍以上も低下した。よって I325 の置換によって ATP の加水分解以降の過程が律速となって活性が低下し、微小管から解離しにくくなることが明らかになった。

第 7 章では、ネックリンカーが頭部の加水分解反応を制御している構造基盤を明らかにするために行われた詳細な構造解析の結果について述べられている。I325 と頭部の相互作用が ATP 加水分解過程に重要であると示唆されたが、I325 と相互作用する頭部の疎水ポケットは ATP 活性部位とはキネシンの頭部を挟んで反対側に位置しており直接相互作用できない。そこで申請者は ATP 結合に伴う頭部の回転を介して疎水ポケットと ATP 結合部位の間でアロステリックな情報のやり取りが起きているというモデルを考えた。このモデルを確かめるために I325G 変異体の ATP 結合状態の頭部の構造をクライオ電子顕微鏡法を用いて高分解能で観察を行った。その結果 I325G 変異体は飽和 AMPPNP 存在下で、頭部の回転が途中までしか進行していない新たな中間状態をとっていることがわかった。この結果は前述のモデルを支持するものであり、I325 側鎖が頭部の疎水ポケットを埋めることで ATP 結合に伴う頭部の回転状態を安定化することにより、反対側にある ATP 活性部位での加水分解過程を促進するという構造モデルが示唆された。

8 章では、本研究で得られた成果をもとにキネシン頭部での加水分解がネックリンカーによって制御される構造モデルが提案され、キネシン 2 頭部間の協調性の説明がされている。

以上のように、申請者はネックリンカー部位に着目した様々な変異体を作製し、それらがキネシンの加水分解活性や構造変化に与える影響を詳細に調べることによって、キネシンが ATP 加水分解のエネルギーを効率的に使う 2 つの頭部を交互に動かすための具体的な構造基盤を明らかに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にとどまらず、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のある運動を生み出す、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。