

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 磯島 広

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二足歩行運動 (Hand-over-hand) することがわかったが、このような運動を行うためには2つの頭部間での協調性が必要である。2頭部間の協調には頭部をつなぐネックリンカーが重要だと考えられているが、その具体的な仕組みは未だわかっていない。キネシンが一方向性を生み出す仕組みとして現在広く受け入れられているのは、ネックリンカーが ATP 結合によって構造変化することで前方へのバイアスを生み出すという「ネックリンカードッキングモデル」であるが、いくつかの問題点が報告されている。一方、最近我々の研究室により、浮いた頭部は拡散運動により前後の結合サイトへアクセスできるが後方への結合が阻害されるために前方へのみ選択的に結合できるという、「結合バイアスモデル」が提唱された。申請者は、本論文の第一部で、ネックリンカードッキングあるいは結合バイアスどちらが前方へのステップの仕組みとして寄与するのかを検証することを目的とし、ドッキング依存的なステップと結合バイアスによるステップを交互に繰り返す変異体 (タンデムキネシン) を作成し、一分子レベルで運動を観察した。さらに第二部では、野生型キネシンの浮いた頭部が前方に移動する様子を直接計測するために、暗視野顕微鏡を用いた高時間分解能での測定を行なった。

本論文は、以下の8章から構成され、和文で書かれている。

第1章では、キネシンについてわか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、生化学測定や一分子蛍光観察、さらには暗視野顕微鏡観察などの計測技術の原理・手法が説明されている。

第3章～第5章 (第一部) では、タンデムキネシンを作成し一分子蛍光観察を行なった結果が述べられている。タンデムキネシンは ATP 存在下で一方向性の連続的な運動を示し、運動速度は野生型キネシンの4分の1程度であった。さらにステップ検出を行なったところ、どちらの頭部も 16 nm ステップを示したことから、タンデムキネシンは Hand-over-hand で運動することが確かめられた。これらの結果は、ネックリンカードッキング非依存的なメカニズムでも前方へのステップは可能であること、すなわち、ドッキングは前方へのステップには必須でないことを直接示すものである。さらに、一分子 FRET 法で、運動しているタンデムキネシンの頭部の位置関係を検出したところ、ドッキング依存的なステップは遅く、一方で結合バイアスによるステップは野生型キネシンのステ

ップと同程度に速かった。これらの結果は、野生型キネシンは結合バイアスを主に用いていることを示唆するものである。

第6章～第7章（第二部）では、浮いた頭部の揺らぎを直接観察するために高時間分解能で計測した結果が述べられている。全反射型暗視野顕微鏡を用いて金コロイドの散乱光を S/N 良く検出することで時間分解能 55  $\mu$ s かつ位置精度 $\sim$ 1.3 nm を実現した。この系を用いて金コロイド標識したキネシン頭部の ATP 存在下の動きを観察したところ、運動方向には 16 nm の離散的なステップが見られ、一方、運動と垂直な方向には 16 nm ステップ直前に揺らぎの一時的な増大が見られた

（Unbound 状態）。ATP 濃度を下げると揺らぎの増大する時間も長くなったことから、ATP 待ちは片方の頭部が浮いた状態であるという過去の知見と一致する。また、Unbound 状態の揺らぎの分布を調べたところ結合サイトに対して常に右側で広い範囲揺らいでいた。この結果は、キネシンの構造を反映している。さらに、金コロイドの揺らぎは前後の結合サイトにアクセスできるほど広い分布を示しており、結合バイアスモデルを支持している。

第8章では、本研究で得られた結果をもとに、浮いた頭部が広い範囲揺らぎながらも前方に選択的にステップする構造モデルが提案され、キネシンの歩行メカニズムの説明がされている。

以上のように、申請者は、ネックリンカードッキングは前方へのステップの仕組みとして必須でないことを実験的に明らかにし、さらに、頭部が前方にステップする様子を 55 $\mu$ s の分解能で直接計測することに成功し、浮いた頭部は結合サイトの右側で広い範囲揺らぐことを示した。これらの結果は、キネシンは揺らぎを無理矢理制御するのではなく、揺らぎを巧みに利用しながら一方向性を生み出すという分子モーター特有の機構を持っていることを示している。これはキネシンの運動機構の理解に貢献するにとどまらず、タンパク質が方向性のないブラウン運動から方向性ある運動を効率よく生み出すという生命のエネルギー変換機構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。