

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 新谷 大和

キネシンは細胞内輸送に関わっているモータータンパク質であり、ATP を加水分解しながら微小管上を一方向に連続的に運動する。キネシンは二つの頭部を交互に前に動かすことで、二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つの頭部間での協調性が必要である。協調性には2頭部を繋ぐネックリンカーの向きや張力が重要であることは知られているが、それらが具体的に運動中のどのステップを制御し協調性を生み出すのかは分かっていなかった。申請者は本論文で、蛍光性 ATP と一分子 FRET を用いた手法やネックリンカーの向きを固定したキネシンの生化学測定から、ネックリンカーの向きや張力が ATP 加水分解サイクルのどのステップを制御するかを明らかにした。さらに金ナノロッドの暗視野観察で運動中のキネシン頭部の構造変化を観察し、ネックリンカーが加水分解を制御する仕組みの構造基盤を示した。

本論文は、以下の7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整、一分子 FRET 測定法、生化学測定さらに暗視野顕微鏡観察などの観測技術の原理・方法が説明されている。特に本研究で開発された金ナノロッドの重心位置と角度の同時決定の手法について詳しく説明されている。

第3章では、蛍光性 ATP のキネシン頭部への結合解離の一分子 FRET 観察結果が述べられている。野生型キネシンの蛍光性 ATP 結合解離観察により、キネシンの2つの頭部は交互にヌクレオチドを結合し、結合する頭部が入れ替わる度に一步進むことが示された。また変異体と野生型頭部のヘテロダイマーを用い、前後を区別した上での ATP 結合観察により、ネックリンカーが後ろ向きの張力を受けると ATP は安定して結合せず、前向きの張力を受けると安定して結合することが分かった。これらの結果から2量体キネシンがネックリンカーの向きと張力により ATP 結合解離がどう制御を受けるのかが明らかになった。

第4章では、ジスルフィド結合を用いてネックリンカーを前または後ろ向きに固定した単量体キネシンの反応速度測定結果について述べられている。ストップフロー測定や一分子観察により、ネックリンカーの前向きの張力は ADP 解離と ATP の可逆的な解離を、後ろ向きの張力は ATP 加水分解またはリン酸解離を阻害する、というように向きにより異なる制御がなされることが分かった。このように、張力の向きにより ATP 加水分解反応の異なるステップが阻害されることで、キネシンの二足歩行が上手く制御されていることが明らかになった。

第5章では、金ナノロッドを取り付けたキネシンの運動観察結果について述べられている。金ナノロッドの暗視野像を理論的に計算した点拡がり関数でフィッティングすることでナノ

ロッドの重心位置と三次元的な角度を決定し、キネシンのステップと頭部内の構造変化(サブドメインの回転)を同時に観察することに成功した。金ナノロッドの角度変化はキネシンの 16 nm ステップにつき一回見られ、角度変化のタイミングの解析から前頭部のサブドメインは回転前、後ろ頭部は回転後の状態をとることが示された。またネックリンカー伸長変異体ではサブドメインの回転が一回の頭部の微小管結合状態につき複数回見られた。これらの結果から頭部の構造がネックリンカーの張力の向きにより制御されていることが示された。

第6章では、最近報告されたキネシンの尾部非依存的不活性化の仕組みを、一分子 FRET を用いて調べた結果が述べられている。この不活性化には溶液中でもネックリンカーが頭部にドッキングした構造をとることが関係していることが明らかになった。

第7章では、本研究で得られた成果をまとめ、ネックリンカーの張力による加水分解制御と構造基盤の関連を議論し、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、申請者はキネシンの二足歩行の協調性の仕組みを、一分子 FRET やジスルフィド結合、金ナノロッドなど様々な手法を用いることで、運動中のどのステップが制御されているのか、どのような仕組みで制御されるのか詳細を明らかにした。特に金ナノロッドを用いた運動中の構造変化の検出は、小さな構造変化のダイナミクス観察を可能とする技術であり、様々なタンパク質への応用が考えられる。またキネシンの協調的運動制御メカニズムの理解は、タンパク質が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)の学位請求論文として合格と認められる。