

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 松崎 興平

キネシン-1(以下キネシンと呼ぶ)は ATP 加水分解エネルギーを利用して細胞内で微小管上を連続的に運動し、物質輸送を行うモータータンパク質である。キネシンは二量体で機能し、2つのモータードメインが交互に微小管に結合・解離し、互いを飛び越えながら歩くように運動することが知られている。最近の研究により、運動中のキネシンでは後ろの頭部が先に解離し、また解離した頭部は高い確率で前方に結合することで効率的な二足歩行を行っていることが明らかになったが、その仕組みはまだわかっていない。申請者は様々な変異体キネシンの運動を高速一分子観察することでキネシンが効率的に二足歩行を行う仕組みを明らかにすることを目指した。

本論文は、以下の6章から構成され、和文で書かれている。

第1章では、キネシンの二足歩行についてこれまでわかっていることがまとめられ、その上で未解決の問題や本研究の概要について述べられている。

第2章では、研究に用いた試料の作成方法および、全反射暗視野顕微鏡による観察方法やデータの解析方法などが述べられている。

第3章では、キネシンにおいて前頭部の解離が抑制されるメカニズムを明らかにするための実験について述べられている。後ろ頭部に変位を加え前頭部だけが解離するよう設計した変異体を用いることで前頭部の解離を実際に観察し、解離速度を定量的に測定することで前頭部では解離速度が後ろ頭部よりも30倍程度遅いことが明らかになった。また、ネックリンカーを伸長すると前頭部の解離速度が2倍程度上昇することが明らかになった。以上の結果から、前頭部においてはネックリンカーが後ろを向いていることによってネックリンカーのドッキングが抑制され、加水分解反応が抑制されていることが後ろ頭部の選択的な解離を生み出していることが示唆された。

第4章では、キネシンの前方ステップを説明する2つのモデルを検証するための実験について述べられている。キネシンの前方ステップメカニズムには、ネックリンカーのドッキングによるパワーストロークが重要であるとする従来から知られてきたモデルと前後の結合サイトでネックリンカーにかかる張力が異なることで頭部の結合能が異なることが選択的結合を生むとする **Biased binding** モデルの2つがある。モデルを検証するためにそれぞれのメカニズムを交互に使って運動するタンデムキネシンを設計し、その運動を観察することで再結合確率やステップ速度を測定した。その結果、ネックリンカードッキングにより頭部の拡散運動が前方にバイアスを受けることで頭部は前方にステップしやすくなるものの後方への再結合は抑制できないことが明らかになった。一方、**Biased binding** モデルでは再結合が10%程度と低い確率に抑えられており、拡散運

動による頭部の移動時間は 3 ms 程度と野生型の二量体と大きく変わらないことが明らかになった。以上の結果から、キネシンの前方ステップを説明するには **Biased binding** メカニズムだけで十分であることが示唆された。

第 5 章では、微小管から解離した頭部が再び結合するまでの時間に含まれる律速過程の存在およびその詳細を明らかにするための実験について述べられている。他の頭部からの影響を排するために、単頭のキネシンが微小管に係留される変異体アンカーモノマーをデザインし、その微小管からの結合解離を様々な溶液条件で観察した。観察の結果、ATP 条件下では解離した頭部は 3 ms 程度で微小管に結合した一方、低濃度の ADP 条件下では 1-2 ms 程度で結合することが明らかになった。この結果から、ATP 条件で頭部が解離した時間における律速過程の存在が示唆された。また、ADP 条件に硫酸イオンを加えてネックリンカーをドッキングしやすくした結果 10 ms を超える長い解離時間が測定されたことから、律速過程はネックリンカーのアンドッキングであることが示唆された。以上の結果を元に単頭の加水分解サイクルの新たなモデルが提唱され、微小管からの解離の直前と結合の直後では頭部はどちらも ADP 状態にもかかわらず ADP の解離が異なる制御を受けている仕組みが説明されている。

第 6 章では、本研究で得られた結果をもとに、キネシンの二足歩行を制御する様々なメカニズムについてまとめられている。

以上のように、申請者はネックリンカーによる前頭部の解離抑制や後ろ頭部の前方ステップの制御の仕組みについて明らかにした。これらの結果は、キネシンの二量体では 2 つの頭部の結合や解離がネックリンカーによって巧みに制御を受けることで、ATP 加水分解エネルギーが方向性のある運動に変換されることを示唆している。これはキネシンの運動機構にとどまらず分子モーター全般の運動メカニズムの本質に関わるものであり、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。