

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 森川 真夏

神経細胞においてコンベンショナルキネシン (KIF5C) は、軸索へ選択的に物質輸送を行っている。本研究は、この仕組みを原子レベルで明らかにするために構造生物学的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 軸索には GTP 型微小管が GDP 型微小管よりも有意に多く存在し、KIF5C は GTP 型微小管を目印に軸索を選んでいることが知られている (Nakata et al., 2011)。そこでまず KIF5C の活性が GMPCPP 微小管下と GDP-taxol 微小管下で異なるかを調べた。Gliding assay を行ったところ、KIF5C モータードメインの運動速度は、GMPCPP 微小管の方が 36%速いことがわかった。また ATPase 活性も、GMPCPP 微小管存在下の方が 32%高いことがわかった。
2. クライオ電子顕微鏡法により、GMPCPP 微小管-ヌクレオチドフリー-KIF5C 複合体、GDP-taxol 微小管-ヌクレオチドフリー-KIF5C 複合体の三次元構造の再構成を行った。それぞれ 8.9Å、9.8Åの三次元構造を得て、分子モデルの *in silico* ドッキングを行った。
3. GMPCPP 微小管-ヌクレオチドフリー-KIF5C 複合体の GMPCPP 微小管部分を、2012 年に解かれている GMPCPP 微小管単体と比較した (Yajima et al., 2012)。その結果、単体構造で特徴的な α チューブリンと β チューブリンの架橋構造に、KIF5C が L11 を介して結合していることがわかった。この結合により、 α チューブリン、 β チューブリンの N ドメインと C ドメインが内腔側に落ち込む構造変化が観察された。
4. KIF5C の L11 により引き起こされた微小管の構造変化が、微小管の安定性にどのように関わるかを調べるため、様々な濃度の KIF5C 存在下で GMPCPP 微小管が脱重合するまでの時間を測定した。その結果、KIF5C が結合していると、GMPCPP 微小管が長時間安定に存在し、KIF5C の L11 が微小管のラティスを強めていることが示された。
5. GMPCPP 微小管-ヌクレオチドフリー-KIF5C 複合体の KIF5C 側の構造について調べた。スイッチ 1 の $\alpha 3$ は閉じ、L9 は長く伸びた構造をとっていた。ネックリンカーは NIS 領域のみがコアに固定されていた。NIS と L11 によって、スイッチ 2 は新規構造を取っており、これを rigor 構造と名付けた。Rigor 構造を取ることによって、スイッチ 1 はスイッチ 2 から離れ、これによってヌクレオチド交換がしやすい構造をとっていることが示唆される。
6. KIF5C の rigor 構造を支え、GMPCPP 微小管との結合にも関わる L11 が、微小管の GTP 型と GDP 型を識別していることを確かめるため、KIF5C の L11 を、軸索特異性のない

KIF1A の L11 に変えた変異体を作製し、生物物理実験・生化学実験を行った。その結果、KIF1A の L11 を持つ KIF5C は GMPCPP 微小管へ高い結合能と高い ATPase 活性を失っていた。また KIF5C の L11 の荷電アミノ酸をアラニンに変えた変異体も GMPCPP 微小管存在下での高い ATPase 活性は認められなかった。

以上から、KIF5C の L11 の荷電アミノ酸が GMPCPP 微小管の表面構造を認識して GDP 型微小管よりも強く結合することが明らかになった。また、GMPCPP 微小管上で、L11 が rigor 構造を取ることで、効率的な ATP 加水分解サイクルが可能になっていた。さらにこの L11 が、GMPCPP 微小管の構造変化を誘発し、微小管の安定性を高めていることを明らかにした。本論文は、KIF5C の rigor 構造と微小管の構造変化を初めて示し、KIF5C の軸索選択性の構造的基盤を解明した。本研究は軸索輸送の分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。