

## [課程－2]

### 審査の結果の要旨

氏名 王 斗斗

本研究は細胞内分子モーターキネシンスーパーファミリー蛋白質の一つである KIF19A の動作機構を解明する事を目的とする。KIF19A は、そのレールとして働く微小管上を能動的に動くのみならず、レールを脱重合して壊す働きも兼ね備えた、特異な二刀流モーターである。申請者は、構造生物学的解析、生物物理学的解析、生化学的解析を組み合わせて、下記の結果を得ている。

1. KIF19A の活性最小単位であるモータードメインを大腸菌にて発現、精製後、その結晶化に成功した。KIF19A 結晶の X 線回折実験は、SPring-8 BL41XU にて行った。分子置換法にて解析を試みたが、そのみでは原子の帰属が困難な領域が存在したため、Photon Factory BL1A にて硫黄の異常分散検出の回折実験を追加する事で、最終的に 2.7 Å 分解能で KIF19A のモータードメインの構造決定に成功した。
2. KIF19A の結晶構造は、基本的には他の KIFs のモータードメインの構造に類似していたが、2つのループ領域(L2, L8)と2つのヘリックス領域( $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ )で特徴的な構造が観察された。
3. L2 ループは非常に長く、また扇子の様に突端が開いた構造を取っている。その長さは、微小管脱重合専門の KIFs として知られる KIF2C に匹敵する長さであり、またその突端にある酸性、疎水性、塩基性という残基の並び方も KIF2C と類似しており、L2 が KIF19A の脱重合機構に重要な役割を果たしている事が推察された。そこで、これらの残基にアラニン変異を導入して微小管脱重合活性を測定した所、野生型と比べて顕著に微小管脱重合活性の低下が観られた事から、L2 ループが微小管脱重合活性に非常に重要な役割を果たしている事が構造機能両面で示された。また、L2 ループの塩基性部分は、微小管への結合活性の増大にも寄与している事が示され、L2 が KIF19A の微小管上運動における Processivity にも貢献していると考えられた。
4. L8 ループは、他の KIFs の L8 に比べて微小管から遠ざかる方向へ移動していた。L8 は微小管結合面の前端を形成するが、微小管結合面の後端を形成する L2 が長く、微小管方向へ突出して微小管結合面の形状が変わっている事を考慮すると、この L8 により微小管および Tubulin に結合しやすくなる様、結合面の形状を調節している可能性が考えられた。

5.  $\alpha 4$  ヘリックスは、微小管方向へ突出した位置にあり、その前後のループ(L11, L12)が長く伸びた状態になっていた。L12 の C 末端部分には、KIF19A 特異的にプロリンからアスパラギンに変異した部位があり、この変異が特徴的な $\alpha 4$  ヘリックスの構造を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、KIF19A のアスパラギンをプロリンに置換する変異を導入した所、微小管上での ATPase 活性の亢進および微小管運動速度の亢進を認める一方、Tubulin 存在下での ATPase 活性の低下を認めた。これらの結果は、KIF19A 特異的なアスパラギンが微小管脱重合活性を獲得する為に好都合である事を示す一方で、この為に微小管上の運動活性を犠牲にしている事を示唆する結果である。
6.  $\alpha 6$  ヘリックスは、他の KIFs と比べて 1 回転程度短くなっている。これは、KIF19A 特異的なグリシン残基の影響が想像される。 $\alpha 6$  ヘリックスは、ATPase 活性の調節に寄与するネックリンカーの根元に位置する事を考慮すると、このヘリックスの長さが ATPase 活性に何らかの重要な寄与をしている可能性がある。

以上、本論文は二刀流モーターKIF19A の構造解析および構造に基づいた機能解析を行う事で、その微小管上運動と微小管脱重合機構の両立に重要な構造・アミノ酸配列を明らかにすることに成功した。これは、KIF19A の機能の分子機構の解明のみならず、KIF19A の異常により生じる不妊症など、繊毛の機能異常に起因する疾患の病態解明・治療にも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。