



Title	Nucleotide-dependent displacement and dynamics of the α -1 helix in kinesin revealed by site-directed spin labeling EPR
Author(s)	安田, 哲
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34045
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (安 田 哲)

論文題名

Nucleotide-dependent displacement and dynamics of the α -1 helix in kinesin revealed by site-directed spin labeling EPR
 (部位特異的スピンラベルEPR によるキネシン α -1 ヘリックスのヌクレオチド依存的変位と動的構造)

論文内容の要旨

キネシンはATPの加水分解のエネルギーを用いて、微小管上を滑走するモータータンパク質である。しかしながら、どのような分子内部の構造変化によって、ヌクレオチド(ATP又はADP)の結合領域の情報がneck linkerの結合(docking)領域へと伝達されるかというエネルギー変換酵素としての最も重要な問題は解決していない。

結晶構造から、 α -1ヘリックスのN端はヌクレオチド結合領域を形成しており、C端はneck linker結合領域を形成していることが分かる。そこで、 α -1ヘリックスがこの情報伝達に寄与しているのではないのかと考え、このヘリックスにスピンラベルを導入し構造変化を観測した。まず、 α -1ヘリックスにある68番目の残基と隣接する α -2ヘリックス上の114番目の残基をシステインに置換し、スピンラベルを導入して、2点間の距離を測定することでヘリックス間の相対的な配置を観測した。微小管存在下では結晶構造と同じ平均1.5nmの狭い距離分布(20%)と測定限界の距離2.5nm以上(80%)の2種類以上の距離分布が存在することが分かった。このことは溶液状態では結晶状態よりも動的構造になっていることを示唆している。このことはスピンラベルの運動性が2種類以上あることから裏付けられる。

次に微小管(MT)結合条件下での、ヌクレオチド依存的な変化を検出した。微小管結合条件では、ヌクレオチド非結合(NN)状態の場合、1.5nmの短い方の距離は増加し(40%)、長い距離は減少した。また、ATPのアナログであるAMPPNPまたはADP結合状態では遠い距離(>25nm)の割合が約80%または75%へ増加することが観測された。さらに、NN状態に比べAMPPNPを添加した試料では、 α -1の68番目、72番目と α -2の114番目のスピンラベル

の回転運動性は増加し、2つのヘリックスが離れることで立体障害が解除されることが示唆された。これらの結果は、キネシン触媒部位でのAMPPNPならびにADPの結合に伴い、 α -1は、 α -2との距離が近い状態から距離の離れた状態へと転移することを示している。距離変化の割合はneck linkerのdock-undock平衡の割合と相関があったことから、この構造変化によって、 α -1のC端側はneck linkerに接近する頻度が上昇し、neck linkerのモータードメイン本体へのdockingが促進されるというモデルを提案した。すなわち、キネシン分子内の化学力学エネルギー変換の仕組み、 α -1ヘリックス変位によって、ATPのアデニン環の結合情報がneck linker結合へ伝達され、ダイマー歩行機構が達成される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (安 田 哲)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	倉 光 成 紀
	副 査	教授	栗 栖 源 嗣
	副 査	教授	上 田 昌 宏
	副 査	准教授	荒 田 敏 昭

論文審査の結果の要旨

キネシンはネックリンカー(NL)部位の dock-undock により 2つのモータードメイン(MD)を交互に解離結合させ微小管(MT)上を動く。しかしながら、MD 内部のどのような構造変化を通して、ヌクレオチドの結合部位の情報が NL の結合領域へと伝達されるか明らかではない。そこで、MD の結晶構造では α -1 ヘリックス (α -1) の N 端側が ATP のアデニン環に結合し、C 端側が NL に結合しているので、ATP の加水分解の情報が α -1 の立体配置の変化によって NL に伝わるという仮説をたて、 α -1 と α -2 に結合させた 2つのスピンラベル(SL)間の距離解析により調べた。 α -1 の 68 番目と α -2 の 114 番目の 2 か所にラベルをして、MT 非結合状態の試料を距離解析したところ、14~17Å に狭く分布する近い距離 (20%)と 25Å 以上に分布する遠い距離(80%)となる相対的配置があることが示唆された。このうち近い距離は結晶構造から予測される距離と等しかった。MT に結合すると、ヌクレオチド非存在状態では、近いヘリックス間相対配置にある割合が約 40%、別の相対的配置(>25Å)が約 60%で、それらは平衡状態であると推定された。また、遠い距離(>25Å)の割合が AMPPNP 結合状態では約 80%へ増加し、ADP 結合状態では約 75%へ増加することが観測された。さらに、ヌクレオチド非存在状態に比べ AMPPNP を添加した試料では、 α -1 の 68 番目、72 番目と α -2 の 114 番目の SL 運動性は増加し、2つのヘリックスが離れることで立体障害が解除されることが示唆された。これらの結果は、キネシン触媒部位での AMPPNP ならびに ADP の結合に伴い、 α -1 は、 α -2 との距離が近い状態から距離の離れた状態へと転移することを示している。距離変化の割合は NL の dock-undock 平衡の割合と相関があったことから、この構造変化によって、 α -1 の C 端側は NL に接近する頻度が上昇し、NL の MD への docking が促進されるというモデルを提案した。本論文は、キネシン分子内の化学力学エネルギー変換の仕組み、すなわち、 α -1 ヘリックス変位によって、ATP のアデニン環の結合情報がネックリンカー結合へ伝達されることを示す重要な発見である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。