



Title	Dynamic Conformation of the Neck Linkers in Dimeric Kinesin by Electron Spin Resonance Spectroscopy
Author(s)	菅田, 和法
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45095
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	菅 田 和 法
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 8 4 0 5 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Dynamic Conformation of the Neck Linkers in Dimeric Kinesin by Electron Spin Resonance Spectroscopy (電子スピン共鳴による二量体キネシンの動的構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 小倉 明彦 (副査) 教授 金澤 浩 教授 徳永 史生 助教授 荒田 敏昭

論 文 内 容 の 要 旨

運動タンパク質キネシンは、微小管 (microtubule ; MT) との相互作用により細胞分裂や細胞内物質輸送を担う生体分子モーターの一つとして知られている。これまで truncation によって調製された単量体キネシンの「ネックリンカー」とよばれる保存性の高いエレメントが、ヌクレオチド依存的にその flexibility を変化させるという実験結果から、このエレメントの flexibility switch がふたつのモータードメインを相互に変位させキネシン分子の processivity (連続滑り能) を生み出していると考えられてきた (Hand-over-hand model)。本研究では実際に二量体キネシンを用いて、SDSL-ESR (Site-Directed Spin Labeling Electron Spin Resonance) により、ネックリンカーの flexibility と 2 つのネックリンカー間の相互距離を測定することによって、キネシン運動モデルの検証ならびにキネシン動作原理を解明することを試みた。

大腸菌系で発現させた二量体キネシン (mouse KIF5A) ネックリンカー上 (S332C) の SH 基に、マレイミド系スピラベル (4-maleimido-tempo ; MSL) を高い効率 (>80%) で特異的に導入することに成功した。ESR スペクトルを fitting simulation 解析したところ、回転相関時間 (τ_r) の異なる二つの成分が共存していた。微小管結合時に 3 種類のヌクレオチド (ADP, ATP-like ; +AMPPNP/ATP- γ S & No Nucleotide ; +apyrase) の共存状態をつくり各 ESR スペクトルを比較したところ、ヌクレオチド非依存的に flexibility の制限を受けた状態、すなわち ordered form をとることがわかった。この結果は、従来のネックリンカーによるヌクレオチド依存的 flexibility switch 説を否定するものである。

またネックリンカーの空間的挙動をより詳細に捉えるため、ネックリンカー間の距離測定を行った。得られた距離分布は 15-20 Å ならびに >20 Å となり、ネックリンカーがダイナミックな構造を有していることを示した。微小管非結合の条件下では、スピン間距離はヌクレオチドの種類に依らず 20 Å 以上となった。一方、微小管結合時には、>20 Å の距離に加えて、15-20 Å の間にもヌクレオチド依存的な距離分布が現れた。すなわち、ヌクレオチドフリー状態では、18.5 Å にピークをもつブロードな距離分布を示した。ADP および ATP-like 状態では 15 Å にピークをもつ距離分布を示したが、前者が比較的広い分布なのに対し、後者は極めてシャープな距離分布を示した。この結果からヌクレオチドフリー状態と ATP 結合状態では 2 つのネックリンカーの相互間隔が異なること、ADP 結合状態ではヌクレオ

チドフリー状態と ATP 結合状態の transient/mixture 構造をとることが考えられる。以上を総合して考えると、キネシンが ATP 加水分解サイクルに伴い2つのネックリンカー間の間隔を変える歩行模型が示唆される。

本研究では ESR によるモータータンパク質の距離測定実験に世界で初めて成功し、ネックリンカーのスピン間距離変化はヌクレオチド依存的であることを発見した。二量体キネシンは ATP 加水分解サイクルに伴い2つのネックリンカーの相互位置をコントロールし、微小管上の processivity を生み出しているものと推定される。

論文審査の結果の要旨

学位申請者に対して、平成 16 年 2 月 3 日（開催場所理学部 B144 室）において、関係教官出席のもとに公開研究業績報告会を開き、論文内容及びこれに関連する事項について試問を行い、審査委員全員の協議の結果、合格と判定した。

以上の結果、学位申請者 菅田和法は、博士（理学）の学位を授与される資格があると認める。

学位申請者から提出された博士論文の審査とその内容についての口頭発表を審査した。研究は微小管駆動モーターたんぱく質キネシンのネックリンカーとよばれるエレメントの動きに関するもので、2つの頭部の各ネックリンカーに遺伝子工学的に導入したシステイン変異部位にスピンラベルを結合させ、スピン間（ネック）の距離を ESR 測定した新規性の高い内容であった。同時にネックリンカーの flexibility-switch 模型を検討するため、スピンラベルの運動性も測定し、予想外にヌクレオチド非依存であることを示した点も意義がある。注目すべき発見は、ネック間距離がヌクレオチド依存的に変化することであり、ATP 分解と共役して2つのネックリンカーが脚のように動く運動模型について枠組みを与えるものである。