

氏名 うめき のぶ ひさ  
学位 博士 (農学)  
学位記番号 新大院博 (農) 第 65 号  
学位授与の日付 平成 18 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Characterization and structural analysis of plant specific kinesin  
(高等植物におけるモーター蛋白キネシンの性質と構造の解析)

論文審査委員  
主査 教授 三ツ井 敏明  
副査 教授 仲川 洋治  
副査 教授 星野 力  
副査 教授 渡邊 剛志  
副査 教授 堀 秀隆

#### 博士論文の要旨

キネシンは ATP 駆動型のモーター蛋白で、細胞内物質輸送、紡錘体の形成とその伸長、細胞分裂時の染色体の両極への移動、シグナル情報伝達など生理的に重要な役割を担っている。キネシンスーパーファミリーは少なくとも 14 のサブファミリーに分類され、その中のいくつかのキネシンが主に動物細胞においてよく研究されている。しかしながら、植物におけるキネシンの研究は今のところほとんど行われていない。そこで本研究では、イネにおける植物特異的なキネシンの生化学的特性を明らかにするため、以下のような解析が行われた。

#### 1: イネキネシンの調製とその生化学的解析

3 種類の植物特異的なイネキネシン (K16, N14, O12) のモータードメインを大腸菌の系で発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製が行われた。ATPase 活性および共沈実験による微小管との相互作用、蛍光標識した ATP アナログとの相互作用を調べ、マウスコンベンショナルキネシンのそれらと比較したところ、イネキネシンモータードメインはマウスキネシンモータードメインに比べて、ヌクレオチドおよび微小管との相互作用が弱いことが明らかになった。

#### 2: イネキネシンモータードメインの結晶化と結晶構造解析

MgADP が結合したイネキネシン K16 モータードメインの結晶化と、その結晶構造を 2.4 Å の分解能で解くことに成功した。K16 モータードメインの構造は、すでに報告されている動物のコンベンショナルキネシンモータードメインの結晶構造と基本的によく似た構造を持っていた。一方で、いくつかの機能部位における局所的なループの長さや、微小管結合部位での構造の違いもみられた。これらの違いがイネキネシンの特徴的な性質を決定していると考えられた。

#### 3: イネキネシンに存在するループ L5 の構造変化の解析

キネシンには幾つかの特徴的なループが存在しており、ATP 結合部位近傍に存在するループ 5 (L5) もそのうちの一つである。イネキネシン K16 においても同様に L5 が存在しているが、マウスキネシンのものより短い構造をしていた。L5 中の 101 番の Gln を Cys に置換した変異体を

調製して、その Cys を蛍光プローブ 2-(4'(iodoacetamide) anilino-naphtalene-6-sulfonic-acid sodium salt)(IAANS)で特異的に標識し、ATP、ADP 存在下における蛍光スペクトル変化を測定したところ、その蛍光強度が、ATP 存在下で 63%まで減少し、さらに ADP 存在下では 51%まで減少した。また蛍光強度の減少に伴い、蛍光極大が ATP 存在下で 449.5nm から 446.0nm まで短波長側にシフトし、ADP 存在下では、444.0nm までシフトした。このことから、イネキネシンの L5 は ATP 加水分解中に構造変化を起こしていることが示された。また蛍光消光法、蛍光偏光解消法を用いた解析からも L5 がヌクレオチド依存的な構造変化を起こしていることが示された。

#### 4: イネキネシンの光架橋性 ATP 誘導体による分子間架橋

光架橋性の蛍光標識 ATP の誘導体である 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)-1.N<sup>6</sup>-etheno-ATP (Bz<sub>2</sub>-εATP) を合成してイネキネシン K16 と光化学反応を行いヌクレオチドに依存した構造の解析を試みた。ATP あるいは ADP 存在下でイネキネシンと Bz<sub>2</sub>-εATP を紫外線照射により反応させると、イネキネシンの分子間架橋が起こった。この架橋反応は、マウスキネシンのモータードメイン (モノマー) およびミオシンの S1 (モノマー) と HMM (ダイマー) では観察されなかった。しかしながら、マウスキネシンのダイマーコンストラクトでは分子間架橋が見られた。これらのことから、イネキネシン K16 は、ヌクレオチド存在下において構造変化を起こしダイマーを形成する特徴的な性質があることが示された。

#### 審査結果の要旨

平成 18 年 2 月 21 日 (火曜日)、専攻として公開発表会を行った。その後、審査委員会を開催し、発表内容、質疑応答、論文を査読しての感想、意見交換を行い、特記すべき事項として以下の 4 点が挙げられた。

1. 3 種類の植物特異的なイネキネシン (K16, N14, O12) のモータードメインを大腸菌の系で発現させ、Ni-NTA カラムによる精製に成功し、イネキネシンモータードメインの生化学的な解析を可能にした。
2. MgADP が結合したイネキネシン K16 モータードメインの結晶化と、その結晶構造が 2.4 Å の分解能で明らかにされた。K16 モータードメインには、いくつかの機能部位における局所的なループの長さや、微小管結合部位での特徴的がみられた。
3. イネキネシンに特徴的なループの 1 つである L5 が ATP 加水分解中に構造変化を起こしていることが示された。また蛍光消光法、蛍光偏光解消法を用いた解析からも L5 がヌクレオチド依存的な構造変化を起こしていることが示された。
4. ATP あるいは ADP 存在下でイネキネシンと 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)-1.N<sup>6</sup>-etheno-ATP を紫外線照射により反応させると、イネキネシンの分子間架橋が起こることが明らかにされた。

また、本論文に記載されている内容の主要部分は国内学会誌に記載されていることから、植物生化学分野へ新知見を加えることに大きく貢献したと評価した。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分であると認定した。