



Structural model of microtubule dynamics inhibition by kinesin-4 from the crystal structure of KLP-12 -tubulin complex

田口, 真也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8483号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482231>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Structural model of microtubule dynamics inhibition by kinesin-4
from the crystal structure of KLP-12 –tubulin complex

Kinesin-4 による微小管伸長制御の分子構造基盤

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

麻酔科学

(指導教員：溝渕 知司 教授)

田 口 真 也

細胞骨格として知られる微小管は、細胞種に応じた機能を発現するための形態形成に重要な役割を果たし、例えば神経細胞の軸索や上皮細胞の纖毛などが適切な長さになるように調節している。微小管は α 、 β -チューブリン二量体が連なってできる「プロトフィラメント」が束になり、中空の管状構造を呈している。微小管の成長端（プラス端）は外側に湾曲した構造をしているが、伸長（重合）時と短縮（脱重合）時とではプラス端のプロトフィラメントの湾曲度合いが異なる。プラス端の湾曲が小さければ重合が誘導され微小管が長くなり、湾曲が大きければ脱重合が誘導され微小管が短くなる。この湾曲は多くの因子によって制御されており、分子モーターとして知られるキネシンもその一つである。

キネシンスーパーファミリータンパク質(KIFs)はATPの加水分解エネルギーを利用して微小管上を移動する。KIFsはキネシン-1～14のサブファミリーに分類され、主に微小管に沿って細胞内の物質輸送を担う働きが知られているが、微小管自体に作用して微小管の伸縮を調節する種類のKIFも存在する。例えばキネシン-1は微小管の重合を促進し、キネシン-13は逆に微小管の脱重合を促進することが知られている。これらは各キネシンが微小管のプラス端に作用して湾曲の大きさを調節し、微小管の重合・脱重合を制御する分子メカニズムが報告されている。一方キネシン-4は微小管の伸縮を止めて微小管の長さの調節に働くことが知られており、神経細胞の軸索や染色体分裂における紡錘糸の長さを制御する重要なモーターである。これまでキネシン-4が微小管のプラス端に作用する様子を高分解能構造として可視化することが難しかったため、その制御の分子メカニズムは不明であった。今回我々は線虫のキネシン-4であるKLP-12を用いて、遺伝学的解析、生化学的解析、全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡解析、X線結晶構造解析を行い、機能と構造の両面からその分子メカニズムを解明した。

まず我々はKLP-12変異体の線虫の遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、KLP-12の

エクソン 4-6 を欠失しフレームシフトを持つ変異体や末端ドメイン欠失変異体では、ALM (anterior lateral mechanosensory) ニューロンおよび PLM (posterior lateral mechanosensory) ニューロンの軸索突起が異常に伸長することが確認された。そこで KLP-12 を組換えタンパク質発現系で発現・精製し、KLP-12 が微小管伸長に及ぼす影響を TIRF 顕微鏡で観察した。KLP-12 存在下で微小管伸長速度を観察したところ、KLP-12 の濃度が高くなるほど微小管の伸長速度が遅くなった。また KLP-12 の動きを観察すると、微小管のプラス端方向に能動的に移動し、プラス端に到達すると、そのまま脱落していく様子が確認された。興味深いことに、伸長速度は抑制されたが、微小管の短縮速度や崩壊の頻度には差がみられなかった。ATPase 活性測定実験では、KLP-12 は微小管格子および GTP 型チューブリン二量体（重合型）に高い親和性を示したが、GDP 型チューブリン二量体（脱重合型）との親和性が桁違いに低かったことから、KLP-12 は重合状態の微小管格子およびプラス端に結合しやすいことがわかった。

次に我々は KLP-12 が微小管のプラス端に作用する様子を高分解能で可視化するため、X 線結晶構造解析を行った。KLP-12 が微小管のプラス端に結合している状態を再構築するため、微小管のプラス端に結合する人工タンパク質 DARPin を、遺伝子クローニングで KLP-12 の C 末端に導入し、微小管が重合しない工夫を施した。微小管の構成タンパク質であるチューブリンはブタの脳から抽出し精製した。チューブリンと KLP-12-DARPin との複合体をゲル滿過クロマトグラフィーで精製し、様々な種類と濃度の溶媒を試して結晶化を行ったところ、良質な結晶を得ることに成功した。この結晶を大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL32XU の微小集光 X 線を用いてデータ測定を行い、解析して得られた電子密度図からコンピュータ上で分子モデルを作成した結果、チューブリン-KLP-12-DARPin 複合体の構造を 2.9 Å 分解能で明らかにすることに成功した。

構造解析の結果、KLP-12 は通常のキネシンと同様にチューブリン二量体の間に結合していた。 α -チューブリンとは KLP-12 の Lys269 と α -チューブリンの Glu155、および KLP-12 の Arg267 と α -チューブリンの Glu414・Glu420 との静電的相互作用で結合していることが確認された。一方 β -チューブリンとは KLP-12 の Arg311・Arg317 と β -チューブリンの Glu410 との静電的相互作用で結合していることが確認された。また結晶化の際に入れた ATP アナログ (AMPPNP) の電子密度もしっかりと確認できたことから、KLP-12 は ATP 結合型を取っていることが確認された。

さらに我々は KLP-12 が微小管の伸長速度を抑制する分子機構を解明するため、KLP-12 の複合体構造を、微小管重合を誘導するキネシン-1 (KIF5B) および微小管脱重合を誘導するキネシン-13 (KIF2C) の複合体構造と比較した。すると KLP-12 は、KIF5B と非常に類似した構造を取りながら、チューブリンに面する一部側鎖の相互作用の強さから、KIF5B 複合体と比較してチューブリン二量体をキネシン側（微小管の外側）に 3 度ほど大きく曲げていることが確認された。一方 KIF2C 複合体と比較してみたところ、KIF2C は KLP-12 には存在しないループ (L2) を持っており、KLP-12 複合体よりさらに 3 度ほど大きくチューブリン二量体を曲げていることが確認された。これらのことから KLP-12 は重合誘導型である KIF5B と脱重合誘導型である KIF2C との中間にチューブリンの曲率を精細に保つことによって微小管の伸長速度を抑制していることが明らかとなった。

本研究は、キネシン-4 モータードメインによる微小管ダイナミクスの制御機構を原子レベルで明らかにした。これによって軸索や紡錘糸の長さなどを適切に制御する分子メカニズムが解明され、神経細胞ネットワーク構築の理解や、染色体分裂の精細な制御機構などの理解がさ

らに進むと考えられる。また KLP-12 のオルソログであり、様々な神経変性疾患の原因となる KIF21A/B の機能障害による疾患の分子機構を解明することや、新たな治療戦略の開発につながることが期待される。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第3226号	氏名	田口 真也
論文題目 Title of Dissertation	Kinesin-4による微小管伸長制御の分子構造基盤 Structural model of microtubule dynamics inhibition by kinesin-4 from the crystal structure of KLP-12 - tubulin complex		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 青井 實之 副査 Vice-examiner 古屋 敏子 副査 Vice-examiner 眞庭 謙馬		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

細胞骨格として知られる微小管は、細胞種に応じた機能を発現するための形態形成に重要な役割を果たし、例えば神経細胞の軸索や上皮細胞の纖毛などが適切な長さになるように調節している。微小管は α 、 β -チューブリン二量体が連なってできる「プロトフィラメント」が束になり、中空の管状構造を呈している。微小管の成長端(プラス端)は外側に湾曲した構造をしているが、伸長(重合)時と短縮(脱重合)時とではプラス端のプロトフィラメントの湾曲度合いが異なる。プラス端の湾曲が小さければ重合が誘導され微小管が長くなり、湾曲が大きければ脱重合が誘導され微小管が短くなる。この湾曲は多くの因子によって制御されており、分子モーターとして知られるキネシンもその一つである。

キネシンスーパーファミリータンパク質(KIFs)は ATP の加水分解エネルギーを利用して微小管上を移動する。KIFs はキネシン-1~14 のサブファミリーに分類され、主に微小管に沿って細胞内の物質輸送を担う働きが知られているが、微小管自体に作用して微小管の伸縮を調節する種類の KIF も存在する。例えばキネシン-1 は微小管の重合を促進し、キネシン-13 は逆に微小管の脱重合を促進することが知られている。一方キネシン-4 は微小管の伸縮を止めて微小管の長さを調節することが知られており、神経細胞の軸索や染色体分裂における紡錘糸の長さを制御する重要なモーターである。これまでキネシン-4 が微小管のプラス端に作用する様子を高分解能構造として可視化することは難しく、その制御の分子メカニズムは不明であった。本研究は線虫のキネシン-4 である KLP-12 を用いて、機能と構造の両面からその分子メカニズムを解明した。

【方法と結果】

遺伝学的解析では、線虫の遺伝学的スクリーニングを行った結果、KLP-12 変異体では軸索突起が異常に伸長することが確認された。

全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡解析では、組換えタンパク質発現系で発現・精製した KLP-12 存在下で微小管伸長速度を観察したところ、KLP-12 濃度が高くなるほど微小管の伸長速度が遅くなる一方、短縮速度や崩壊頻度には差が見られなかった。KLP-12 は微小管のプラス端方向に能動的に移動し、プラス端に到達すると、そのまま脱落していく様子が確認された。

ATPase 活性測定実験では、KLP-12 は微小管格子および GTP 型チューブリン二量体(重合型)に高い親和性を示したが、GDP 型チューブリン二量体(脱重合型)との親和性が桁違いに低かったことから、KLP-12 は重合状態の微小管格子およびプラス端に結合しやすいことが分かった。

X 線結晶構造解析では、微小管のプラス端に結合する人工タンパク質 DARPin を KLP-12 の C 末端に導入した KLP-12-DARPin と、ブタの脳から抽出し精製したチューブリンとの複合体をゲルfiltrationクロマトグラフィーで精製し、結晶を作成した。大型放射光施設 SPring-8 でデータ測定を行い、解析して得られた電子密度図から分子モデルを作成した結果、チューブリン-KLP-12-DARPin 複合体の構造を 2.9 Å 分解能で明らかにすることに成功した。解析の結果、 α -チューブリンとは KLP-12 の Lys269 と α -チューブリンの Glu155、および KLP-12 の Arg267 と α -チューブリンの Glu414・Glu420 との静電的相互作用で結合していた。一方 β -チューブリンとは KLP-12 の Arg311・Arg317 と β -チューブリンの Glu410 との静電的相互作用で結合していた。さらに KLP-12 の複合体構造を、微小管重合を誘導するキネシン-1 (KIF5B) の複合体構造と比較すると、KLP-12 は一部側鎖の相互作用の強さから、KIF5B 複

合体と比較してチューブリン二量体をキネシン側(微小管の外側)に 3 度ほど大きく曲げていた。一方微小管脱重合を誘導するキネシン-13(KIF2C)の複合体構造と比較すると、KIF2C は KLP-12 には存在しないループを持っており、KLP-12 複合体よりさらに 3 度ほど大きくチューブリン二量体を曲げていた。

【結論】

KLP-12 は微小管重合誘導型である KIF5B と微小管脱重合誘導型である KIF2C との間にチューブリンの曲率を精細に保つことによって微小管の伸長速度を抑制していることが明らかとなった。

以上、本研究は、キネシン-4 モータードメインによる微小管ダイナミクスの制御機構を明らかにしたものであり、神経細胞ネットワーク構築や染色体分裂の精細な制御機構を理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。