

論文の内容の要旨

論文題目

Molecular Structure and Physiological Activity of the Monomeric Microtubule-Motor Proteins

モノマー型微小管モータータンパク質の分子構造と生理活性

城口 克之

背景と目的

筋肉の運動、細胞運動、細胞内輸送や細胞分裂における空間的な動きは、モータータンパク質によって生み出されている。モータータンパク質はATP加水分解酵素であり、ATPの加水分解から得られる化学的エネルギーを力学的エネルギーに変換して仕事(運動)を行っている。また、モータータンパク質は様々な特徴をもったものが多種類存在するが、それぞれのモータータンパク質が‘運動’という特性を利用して細胞内で様々な役割を果たしていると思われており、それらを調べることは生命現象を理解していく上で重要である。

ダイニンは、微小管上をATPの加水分解を伴って一方向に運動するモータータンパク質である。ダイニン重鎖には、一次構造上保存されたP-loop(ATP結合部位)が4つ存在し、1つしか持たない他のモータータンパク質とは異なった動作機構をもつと考えられている(図1)。ダイニンは負荷をかけると微小管上を振動するものなど、種類によって様々な運動特性を示す。これらは、ダイニンが複雑で多様な機能をもつ分子であることを表しており、それは巨大で複雑な重鎖が可能にしていると考えられる。複数のATP結合部位がこの複雑な運動の多様性に寄与している可能性も高い。しかし、複数の(最大4つ)ATPやADPがダイニンに結合することは示されているが、それによりダイニンの活性がどう変化するのかといった生理的活性は解明されていない。

キネシンもダイニンと同様に微小管と相互作用するモータータンパク質である。キネシンは類似タンパク質が百種類以上も同定されており、それぞれアミノ酸配列が異なる部分がある。これらのキネシン様タンパク質は、アミノ酸配列から予想される構造

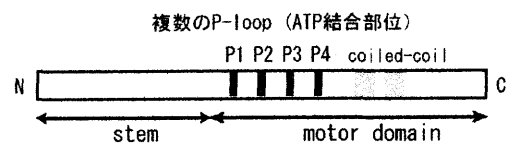


図1. ダイニンの一次構造

的な特徴に見合った機能を細胞内で担っていると考えられている。

キネシン様タンパク質の一つ、Kid (Kinesin-like DNA binding protein) は、N末側にキネシン様モーター部位、尾部にDNA結合部位を持つ全長 665 a.a. (ヒトの場合) からなるタンパク質である。分裂前期、中期に紡錘体及び染色体腕上に局在し染色体の中期板への整列に必須であり、後期にはセントロメア近傍に限局し、終期を経て核膜が形成されると核内に一様に分布する。このように Kid は分裂期に重要な役割を担い、polar ejection force の起源であると考えられている。しかし、Kid 分子の形態 (多量体形成の有無)、微小管との相互作用の特性、運動特性といった Kid 分子の性質や、さらには、Kid 自身が DNA を押すことができるのかといった細胞内で予測されている機能の *in vitro* での解析はされていない。

本研究では、生命に‘動き’という重要な特性をもたらしたモータータンパク質の理解を深めるために、その一次構造が調べられているが実際の機能は示されていない、ダイニンの4つの ATP 結合部位の生理活性と、Kid の分子全体の特性について詳しく調べることを目的とした。ダイニンの4つの ATP 結合部位の生理的機能が解明されれば、ダイニンがもつ複雑な運動特性の理解が進むと思われる。また、輸送モーターである conventional kinesin はその性質が詳しく調べられているが、Kid のような分裂期モーターが新たな特性を持つ可能性は高いと考えられ、キネシン様タンパク質の多様性の議論へと発展できると考えられる。

結果と考察

1. ダイニン重鎖に保存された4つの ATP 結合部位の生理活性

一つの重鎖内での ATP 結合部位の機能について調べるため、*Tetrahymena* の繊毛中に存在するモノマーのダイニンを複数種類含むと考えられている 14S ダイニン (複数のダイニンの総称) に注目した。大量培養された *Tetrahymena* から単離した繊毛から 14S ダイニンを抽出し、ショ糖密度勾配遠心法、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて各ダイニン(a-d)に分画した。これにより、*Tetrahymena* 14S ダイニン中には、少なくとも6種類の重鎖が存在することが明らかになった。

最も精製度が高いダイニン a に注目して、その性質を詳しく調べた。マーカータンパク質のショ糖密度勾配遠心において、ダイニン a の重鎖はモノマーダイニンと移動度が一致した。また、電子顕微鏡でダイニン a を直接観察したところ、他のダイニンで報告されているものと同じように、中心付近に空洞があるダイニンの重鎖が一つ一つ散らばっている様子が観察された。さらに vanadate, ヌクレオチド存在下における UV による重鎖切断の実験から重鎖が2本に切断されることが確認できた。これらの結果から、ダイニン a の重鎖はモノマーであると結論した。

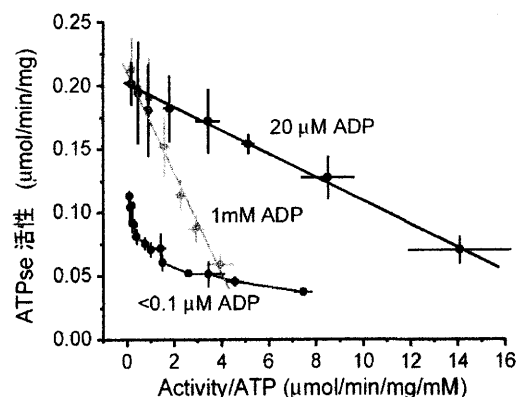


図 2. dynein-a の ATPase 活性 (Eadie-Hofstee plots)

vanadate 存在下において UV による重鎖切断効率を ATP 存在下, ADP 存在下で比較してみると, ATP 存在下においてより速く重鎖が切断されることがわかった. 重鎖は, ATP 加水分解部位と考えられている P1 において ADP-vanadate が結合しているときに UV を照射すると切断されると考えられている. また, 切断効率はタンパク質の構造に依存すると考えられている. したがってここでの結果により, P1 以外のヌクレオチド結合部位に ATP 又は ADP が結合することでダイニン重鎖の構造が変化して, 重鎖の切断効率が変化した可能性が示唆される.

ATP, ADP 濃度を変化させて, ATPase 活性測定, *in vitro* gliding assay を行った. このとき両方の測定結果ともに, 溶液中に ADP が 20 μM 程度存在するとダイニンの活性はミカエリス-メンテンの式で表すことができたが, ATP 再生系を用いた ADP が非常に少ない溶液中では (0.1 μM 以下), 活性は単純なミカエリス-メンテンの式では表すことができなかった (図 2). このように活性は ADP 濃度に依存して変化した. ADP が非常に少ない時の活性は以下の二種類のモデルによりうまく説明できる. 一つ目は, 加水分解部位がミカエリス-メンテンの式で表すことができる活性状態を二種類もち, それぞれの状態の切り替えを加水分解しない ATP 結合部位への ATP の結合, 解離により行うこと, 二つ目は, ダイニン a に加水分解部位が二つ存在し, それぞれが独立にミカエリス-メンテンの式で表現できる活性をもつこと, である.

これらの ATP, ADP による重鎖の切断効率の違いやダイニンの活性の変化から, ダイニン a には ADP と高い親和性を持つ ATP 結合部位が存在すること, さらに, 少なくとも 2 箇所にもヌクレオチドが結合し活性を制御していることが示唆された.

2. Kid の分子特性

Kid のモーター部位以外の特性も調べるために, 長さをかえたもの, モーター部位を欠損したもの, 運動アッセイのためにゲルゾリンを融合させたもの等のコンストラクトを構築し, 大腸菌で発現, 精製した (図 3).

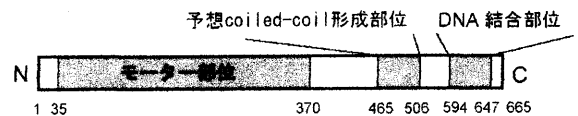


図 3. human Kid のドメイン構造

Kid の分子特性や微小管との相互作用を調べるにあたり, Kid が多量体を形成しているかどうかを調べることは重要である. Kid は, アミノ酸配列からなる予想 coiled-coil 形成配列を持つが, 実験ではダイマー形成能は示されていない. そこで, ショ糖密度勾配遠心法を用いて $s_{20,w}$ 値を, また, ゲルろ過法を用いて Stokes 半径を決定して, これらの値から実験的に分子量を決定した. 含有アミノ酸の質量と比較したところ, Kid はモノマーであることがわかった.

微小管との相互作用の特性を調べるために, 微小管と混合させて顕微鏡で観察した. すると, アミノ酸 442-515 a.a. をもつ Kid のみが微小管を束化させた. 微小管の束化は, 微小管結合部位が少なくとも 2 箇所もタンパク質と混合させた時でないとは見られないので, モノマーである Kid は, 442-515 a.a. に第二の微小管結合部位をもつ可能性が高いと思われた. そこで, Kid のモーター部位のかわりに GST を融合した 442-515a.a. を含むコンストラクトを構築し, 微小管と相互作用させた. その結果, この部位で微小管と結合することがわかり, Kid はモーター部位以外に第二の微小管結合部位が存在することが示された.

微小管存在下で ATPase 活性測定を行ったところ、単純なミカエリス-メンテン型で表すことができた。Kid515, Kid441, Kid388 共に k_{cat} は $\sim 12 \text{ s}^{-1}$ と同程度の値を示したが、Kid388 と Kid441 の K_{mMT} ; 29, 35 nM に対して Kid515 の K_{mMT} は 5.6 nM と 6 倍程度小さかった。これより、Kid の第二の結合部位は ATP 加水分解サイクル中においても微小管との親和性を高める効果があり、また、ATP 加水分解サイクルの律速段階には直接影響していないと考えられる。

Kid の第二の微小管結合部位の運動への影響を調べるため、蛍光ラベルしたアクチンフィラメントを結合させたゲルゾリン融合 Kid を用いた運動観察を試みた。ゲルゾリン融合 Kid515, Kid441 とともに微小管上を数 μm にわたって連続的に運動する様子が観察でき、その速度はともに約 150 nm/s であった。これより、442-515 a.a に存在する第二の微小管結合部位と微小管との結合は、運動を阻害するほど強いものではないことがわかった。この性質は、第二の微小管結合部位をもち、それが微小管と強く結合して束ねる役割を持っていると考えられているキネシン様タンパク質、NCD や CENP-E とは異なる。Kid の第二の微小管結合部位は、運動しながらも微小管から解離しにくくする効果があると考えている。

Kid が polar ejection force を発生しているという *in vivo* の実験報告からの予測に基づき、Kid が微小管に沿って DNA を運搬できるかを調べた。全長 Kid によって運ばれていると思われる、蛍光標識された DNA が運動する様子が観察できた (図 4)。これにより Kid が細胞内で polar ejection force を発生させていることが *in vitro* で確認できた。

総括

ダイニンには ATP や ADP の濃度を感知して活性を制御する分子内制御機構が存在することが示唆された。Kid においては DNA 運搬能をもつこと、また、予想とは異なりモノマーであること、さらには第二の微小管結合部位が存在することがわかった。第二の微小管部位は、モノマーである Kid が polar ejection force を発生しているときに、微小管と解離しないために役立っているのかもしれない。これらの結果は、局在は調べられているがその機能がわかっていない分裂後期の Kid の機能等を解明していく上で役立つ可能性もあると思われる。このように、一次構造上予測されているがその機能が示されていない特性を詳細に調べていくアプローチは、基礎的ではあるが重要であると感じている。

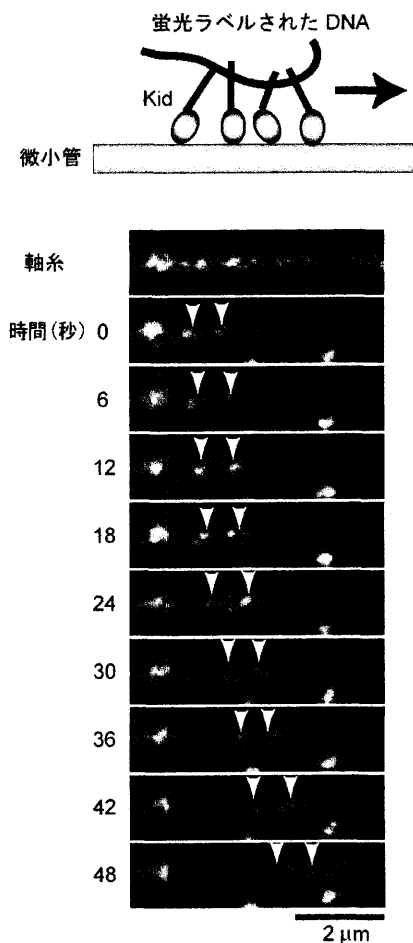


図. 4 DNAを運ぶKid