

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 城口克之

細胞の活動は、さまざまなタイプの細胞運動に支えられている。細胞運動は、細胞骨格であるアクチンフィラメントや微小管とそれぞれに特有な相互作用するモータータンパク質との相互作用によって生み出される。微小管とそのモータータンパク質であるダイニン、キネシンは、細胞分裂、繊毛・鞭毛運動、細胞内物質輸送において鍵となる役割を果たしており、それらの分子機構を明らかにすることは、生命活動の理解に重要な課題である。城口克之氏は、「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」と題した研究課題において、モノマー型（単頭）のダイニンとキネシンを対象にして、分子構造およびその運動活性、ATPase 活性、微小管との相互作用を詳細に調べ、運動メカニズムおよび細胞内での役割についての新たな知見を見出した。

第一章においては、巨大かつ複雑でモーターとしての機構がほとんど明らかでないダイニンの運動機構を探るために、ダイニンのモータードメインに存在する 4 つ ATP 結合部位の意義と役割に関する研究を行った。このために、まず、モノマー型のダイニンを得ることを試み、テトラヒメナ繊毛内腕ダイニンの精製を行った。ショ糖密度勾配遠心および陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製したダイニンがモノマーであることを複数の証拠から確認したあと、このダイニンの ATPase 活性および滑り運動速度を種々の ATP 濃度、ADP の存在下と非存在下で解析した。その結果、ADP 存在下では ATP 濃度に対してミカエリス・メンテン型の挙動を示したが、ADP 非存在下ではミカエリス・メンテン型に近似できなかった。ADP 非存在下での挙動は、このダイニンに加水分解部位が 2 ヶ所以上存在し、それぞれが独立に活性を持つというモデル、あるいは、加水分解部位が活性状態を 2 種類持ち、その状態の切り替えを他の加水分解しない ATP 結合部位への ATP の結合・解離により行うというモデル、により説明できる、とした。これらの結果は、この内腕ダイニンには、ADP と高い親和性を持つヌクレオチド結合部位が存在すること、さらに少なくとも 2 ヶ所にヌクレオチドが結合して活性を制御していることを示唆しており、ダイニンにおける複数のヌクレオチド結合部位の生理的な役割が始めて明らかになった。

第二章においては、キネシン様タンパク質の 1 種で、DNA を結合するモーター分子である Kid についての研究を行った。この分子は、細胞の核分裂時に染色体と相互作用することが示されていたが、分子構造や運動能力など分子としての特性が明らかにされていなかった。本論文では、まず、Kid 分子の会合状態を知るために、ショ糖密度勾配遠心法とゲルろ過法から分子量を決定し、全長の Kid がモノマーであることを明らかにした。次に、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ところ、アミノ酸 442-515 a.a.をもつ Kid 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思われないので、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推察された。そこで、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。次に、微小管存在下で ATPase 活性測定を行ったところ、第二の微小管結合部位 (442-515a.a.) を含む Kid はこの部位を含まないトランケートした Kid とともに  $k_{cat}$  は  $\sim 12 \text{ s}^{-1}$  と同程度の値を示したが、微小管との親和性が異なり、第二の微小管結合部位を含む Kid は Kid トランケートした Kid と比べて  $K_{mMT}$  が 6 倍程度小さかった。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、かつ、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 を用いて運動観察を行った結果、442-515a.a.を含む Kid も含まない Kid もともに微小管上を数  $\mu\text{m}$  にわたって連続的に運動し、その速度はともに約  $150 \text{ nm/s}$  であった。従って、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の NCD や CENP-E とは異なるものである。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られる。さらに、Kid が微小管に沿って蛍光標識した DNA を運搬する様子を観察した。これにより Kid が細胞内で polar ejection force を発生させる原動力となることを直接 *in vitro* で確認することができた。

以上のように、本研究は、微小管モータータンパク質であるダイニンとキネシンについて、分子構造を明らかにしたうえで、モノマーであることの特性を活かし、かつモノマーであることの意義を追求しつつ、ダイニンおよびキネシンの分子機構を明らかにしたものである。したがって、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。