

キネシンは細胞骨格の 1 種である微小管の上を滑り運動する“モーター蛋白質”の一群である。本研究では、キネシンスーパーファミリー蛋白質の細胞内における多様な機能について新たな知見を得るために、多彩な細胞の挙動を示すモデル生物である細胞性粘菌より新規のキネシン様蛋白質を同定してその機能を解析した。

ゲノムプロジェクトの探索によって、細胞性粘菌には少なくとも 13 種類のキネシン様蛋白質が存在することが分かった。その中には conventional キネシンと相同性を示すものが 3 種含まれていた。このうち 1 種を DdKin5 と命名し遺伝子全長をクローニングして解析を行った。予想されるアミノ酸配列より、DdKin5 は N 末端から順に、モータードメイン、柄部、尾部の 3 つの領域から構成されていた。モータードメインが conventional キネシンのものと最も高い相同性を示したのに対して、モータードメイン以外の領域は既知のいかなる蛋白質とも相同性を示さなかった。柄部はコイルドコイルを形成して 2 量体化することが予想された。尾部領域は塩基性残基に富んでおり、負に荷電した構造体と相互作用する可能性が示唆された。

DdKin5 のモータードメインを大腸菌で発現して ATP 加水分解活性を測定した。また、モータードメインを細胞性粘菌で発現し、細胞抽出物を用いて微小管との共沈殿を行った。この結果、DdKin5 のモータードメインは他のキネシン様蛋白質同様に、ATP 依存的な微小管との結合能を保持していることが分かった。

DdKin5 の細胞内局在を調べるために、抗 DdKin5 抗体を作製し、間接蛍光抗体法によって細胞を染色した。DdKin5 は栄養増殖期においては、アクチン繊維が集積した細胞表面の突出構造に強く局在していた。走化性運動中の細胞においては、アクチン繊維の集積した先端に強く局在した。DdKin5 が細胞内において主にアクチン繊維と相互作用していることは、Triton 不溶性の細胞骨格に分画されたことから支持された。DdKin5 がアクチン繊維と相互作用するのに必要なドメインを同定するために、DdKin5 の様々な欠失変異体に GFP を融合して細胞性粘菌で発現した。全長に GFP を融合したものは、内在性の DdKin5 と同様の局在を示した。C 末端側 40 残基を欠失すると細胞質全体に散在したことから、C 末端側の尾部ドメインがアクチン繊維との相互作用に必要であることが分かった。一方 C 末端側の尾部ドメインのみに GFP を融合すると、一部がアクチン繊維との共局在を示したことから、アクチン繊維との相互作用には尾部ドメインのみで十分であることが分かった。

尾部ドメインがアクチン繊維と直接相互作用する可能性を検討するために、尾部ドメインを大腸菌で発現し、アクチン繊維との共沈殿を行った。相互作用の解離定数は  $0.58 \mu\text{M}$  であり、尾部ドメインが細胞内においてもアクチン繊維と直接結合していることを示唆し

た。さらに相互作用は塩濃度感受性であることから主に静電相互作用に基づいていると考えられた。尾部ドメインに柄部を一部付加して大腸菌で発現したものは、低速度の遠心でアクチン繊維と共に沈殿した。柄部を一部付加した尾部ドメインによってアクチン繊維が架橋された可能性を調べるために、そのアクチン繊維を電子顕微鏡で観察したところ繊維の束が形成されていた。以上より DdKin5 の尾部ドメインはアクチン繊維と直接相互作用し、その束を形成することが明らかになった。

DdKin5 の細胞内における機能を調べるために、相同組み換えによって DdKin5 遺伝子破壊株を作成した。遺伝子破壊株は無菌培養中で正常に増殖し、発生によって野生株と変わらない正常な子実体を形成したことから、DdKin5 は細胞性粘菌の増殖と発生に必須ではないことが分かった。また遺伝子破壊株は野生株とほとんど変わらない正常な液体成分エンドサイトーシス、貪食作用、走化性細胞運動、細胞接着などを示した。

DdKin5 を過剰発現すると、アクチン繊維の集積した大きな膜ラッフルや多数の王冠構造を形成した細胞がしばしば見られた。また細胞質分裂にも異常が見られたことから、DdKin5 の過剰発現はアクチン繊維の編成に影響を与えることが分かった。このことから、DdKin5 は微小管の動態の制御に関与している可能性が示唆された。

本研究は、微小管モーター蛋白質であるキネシン様蛋白質がアクチン繊維との直接的な相互作用およびその制御という新たな機能をもつことを明らかにした。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。