

## 論文の内容 要旨

### 論文題目

#### Dissociation of Multi-headed Dynein Molecules and Motile Properties of the Dissociated Heads

(複数頭部を持つダイニン分子の分離と分離頭部の運動特性)

氏名 鳥羽 菜

細胞内では、その機能を維持するために様々な“動く要素”が必要であり、そのために動く分子;分子モーターと呼ばれるタンパク質が働いている。筋収縮に代表されるアクチン-ミオシン系に対して、微小管系にはキネシンとダイニン、二種類の分子モーターが存在する。これらの分子モーターは、ATPの加水分解エネルギーを利用して、多様な細胞機能を果たしている。

ダイニンは、微小管上をマイナス端方向に移動する分子モーターであり、繊毛・鞭毛運動、細胞分裂や細胞内輸送など細胞機能において重要な役割を担っているが、その運動メカニズムは、同じ分子モーター、キネシン、ミオシンに比べてよくわかっていない。ダイニン重鎖は、C末端側にヘッド(頭部)と呼ばれる球状のATP加水分解ドメインと、そこから伸長したストークと呼ばれる微小管結合部位を持ち、N末端側のステムと呼ばれる部位で重鎖同士や軽鎖などのサブユニットが相互作用している。その構造には、トライマー(3頭)、ダイマー(双頭)、モノマー(単頭)があるが、運動メカニズムの解明にはこれらの頭部を分離し、それぞれの機能を調べるのが必須であると考えられる。

繊毛・鞭毛は自律的に波動運動を行うユニークな細胞運動器官であり、軸糸ダイニンはその原動力を発生する。繊毛虫 *Tetrahymena* の繊毛の外腕を構成する軸糸ダイニンは、22Sダイニンと呼

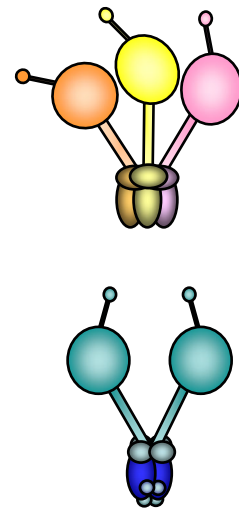


図1

ばれ、その構造は3つの異なる重鎖を持つヘテロライマー(3頭)である(図1上)。それぞれ、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ と呼ばれる重鎖から出来た頭部は、根元部分で束ねられて花束(ブーケ)状の構造を形作っている。それぞれの重鎖は、繊毛の波打ち運動において異なる機能を持つと想像されるがまだ明らかでない部分が多い。そのため、各重鎖それぞれの運動特性を理解することは、繊毛運動のメカニズムの解明に重要である。

細胞質ダイニンは有糸分裂、細胞内輸送などに関与し、細胞内できわめて多様な働きを担っている。その重鎖は幅広い種で高度に保存されており、その分子構造は2つの等しい重鎖から出来た頭部が根元部分で束ねられたホモダイマー(双頭)である(図1下)。哺乳類は少なくとも40種以上のキネシン様モーターを持っているが、細胞質ダイニンとして主に働く重鎖は1種しか同定されておらず、軽鎖やダイナクチンなどのアクセサリタンパク質の関与によって多くの細胞内運動に関与している。そのため、この細胞質ダイニンの重鎖の運動メカニズムを知ることは、細胞内運動の理解のために必須であるが、未だ明らかでない部分が多い。

いずれのダイニン重鎖も、4000以上のアミノ酸からなり、その分子量は約50万にも及び、遺伝子工学的に各重鎖を得る事は困難である。また、構造が複雑で容易に変性するため、重鎖の精製、分離による研究もキネシンに比べて進んでいない。本研究では、尿素によって *Tetrahymena* の外腕ダイニンを単頭部と双頭部に分離し、活性のあるフラクションを得る事が出来た。また、この方法を応用してブタ脳細胞質ダイニンを完全に単頭に分離し、運動特性を中心にその活性を調べた。これらの活性のあるダイニン重鎖の分離によって、ダイニン分子の運動特性への理解が進むと考えられる。

### 1. *Tetrahymena* 22S ダイニンの双頭重鎖と単頭重鎖の特性

繊毛虫 *Tetrahymena* 22S ダイニンの3頭の重鎖を尿素で処理し、ショ糖密度勾配遠心にかけて、双頭部( $\beta$ 、 $\gamma$ )を含む19Sと単頭部( $\alpha$ )を含む14Sに分離された(図2)。尿素による処理は、タンパク質分解酵素による分離と異なり重鎖の全長を保持した状態で分離する事が出来た。また、尿素を取り除く過程で再び3頭のダイニンに戻る現象が観察され(図2:R)、この処理が可逆的である事がわかった。

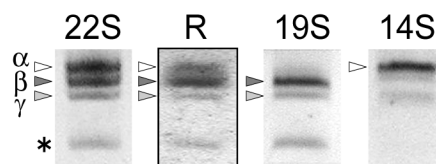


図2

こうして得られたダイニン重鎖には、ATPase 活性や微小管滑り運動活性があった。*in vitro* motility assay では、双頭部は3頭より速い速度でスムーズに微小管を滑らせる事が出来た。単頭部は、ATPase 活性があるにもかかわらず ATP 非依存的に微小管と結合し、滑り運動も起こさなかった。過去の報告によると、タンパク質分解酵素のキモトリプシンで22S ダイニンに処理を行い、根

元側4分の1ほどを失った単頭  $\alpha$  鎖のフラグメントは ATP 非依存的に微小管とは結合しない。これらの結果から、この単頭  $\alpha$  鎖は軸糸内で微小管ダブレットの A 小管に根元側で強く結合し、外腕ダイニン全体を構造的に支えているものと考えられる。

## 2. ブタ脳細胞質ダイニンの単頭重鎖の特性

細胞質ダイニンは、その多くが精製の最終段階までダイナクチンと複合体を作っている。ダイナクチンは11~12のポリペプチドからなる複合体タンパク質で、ダイニン依存の細胞内機能のほとんどに必須である。その複合体を構成するポリペプチドの一つである p150 タンパク質は C 末端側に細胞質ダイニン結合部位、N 末端側に微小管結合部位を持ち、細胞質ダイニンの運動連続性を増加させる外因性要素として機能することが報告

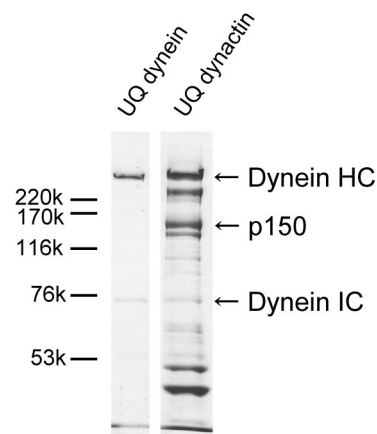


図3

されている。このことから、まず、第三の頭部ともいえるダイナクチンを解離した双頭細胞質ダイニンをブタ脳から得た(図3:UQ dynein)。さらに、そのダイナクチンのない双頭細胞質ダイニンに尿素による処理を行い、単頭の重鎖に完全に分離した。このダイニンの単頭構造は電子顕微鏡でも確認できた。また、尿素を取り除く過程において、双頭ダイニンを再び構成することができ、尿素処理による重鎖の分離は可逆であることがわかった。単頭ダイニン、再構成した双頭ダイニンいずれも、重鎖に相互作用する中間鎖や中間軽鎖は、control 双頭ダイニンと比較して、ほとんど解離していなかった

双頭の細胞質ダイニンは、2つの頭部のそれぞれの微小管結合部位で異なる微小管に結合して、ATP 非存在下で微小管を束化することが知られている。control 双頭ダイニン、再構成双頭ダイニンはどちらも ATP 非存在下で微小管を束化した。対して、単頭の細胞質ダイニンは ATP 非存在下で微小管を束化しなかった。単頭、再構成双頭ダイニンの ATPase 活性を調べた結果、いずれも control と同程度であった。*in vitro* motility assay では、単頭ダイニンは双頭ダイニンとはほぼ同量のタンパク濃度で、同程度の速度で微小管を滑らせることができた(図4)。ATP 濃度を変えてもそれぞれの微小管滑り運動速度は同じだった。これらの結果から、単頭細胞

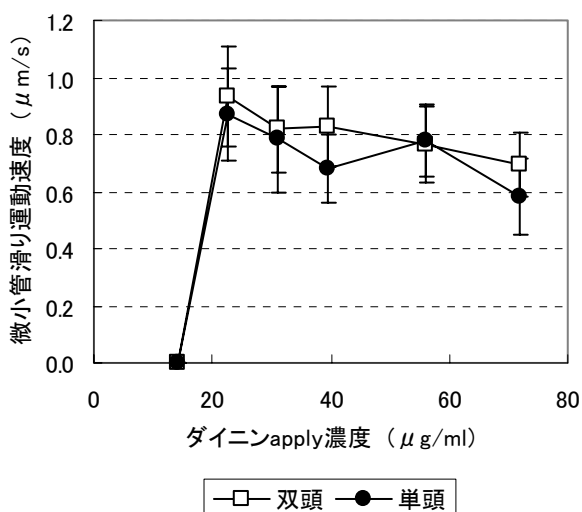


図4

質ダイニンは多分子で微小管と相互作用すれば、二つの重鎖が互いに結合していなくても双頭細胞質ダイニンと同様の微小管滑り運動能を持つことがわかった。次に、*in vitro motility assay* にて ATP とバナジン酸存在下で微小管の運動特性を観察したところ、双頭、単頭、再構成双頭のいずれのダイニンでも微小管がその長軸方向にランダムに振動する現象が観察された。バナジン酸は ATP 加水分解の阻害剤であり、ATP 加水分解サイクル中の ADP・Pi 状態で ADP・Vi 状態に置き換わり、サイクルを停止する。過去にウニ精子外腕ダイニンのβダイニンにて同様の現象が観察されている。今回、細胞質ダイニンでも、双頭、単頭いずれも ADP・Vi 状態で、微小管の解離は防ぐが、微小管の長軸方向へは自由に拡散できるような弱い相互作用をしていることが示された。

本研究では、複数頭部を持つダイニン分子の活性をもつ頭部の分離に成功し、その分離頭部の運動特性を調べることができた。その結果ヘテロライマーである 22S ダイニンはそれぞれの重鎖が繊毛運動において異なる機能を担っていることが示唆された。ホモダイマーである細胞質ダイニンは、2つの重鎖間の協調がその運動特性に必須ではないことが示された。尿素の処理により活性を持つダイニン重鎖が得られた事は、ダイニンの分子構造の特性に示唆を与えるとともに、他の様々なアプローチにより、その運動メカニズムと機能の解明に役立つものと期待される。