

審査の結果の要旨

論文提出者氏名

西浦 昌哉

微小管上を運動するダイニンは、鞭毛および繊毛に存在する軸糸ダイニンと細胞質内に存在する細胞質ダイニンの、二つのグループに分けられる。細胞質ダイニンは細胞質内の微小管上をマイナス端に向かって滑り運動するモータータンパク質で、細胞内小胞輸送、細胞分裂時における染色体の分離など、多様な役割を担っている。細胞質ダイニンは、ミオシン、キネシンといったモータータンパク質群とは大きく異なる構造を持っている。細胞質ダイニンは重鎖、中間鎖、軽中間鎖および軽鎖の4種のサブユニットにより成る巨大な複合体タンパク質で、各サブユニットをあわせた分子量は1,200 kDaに達する。これらの内ダイニンの運動機能を司っているのは重鎖である。重鎖は分子量が約500 kDaの巨大なサブユニットで、微小管と相互作用し、ATPを加水分解して力を発生する。また重鎖はホモ二量体を形成する。一次配列から、重鎖はN末端側の尾部領域およびC末端側の頭部領域に大きく分けられる。その内モーター機能を有するのは頭部領域である。ダイニンの重鎖の頭部には、6つのAAA+(ATPases associated with diverse cellular activities)モジュール(N末端側より順にAAA1~AAA6とする)が存在する。またAAA6の下流にはC末端ドメインがあり、これを合わせた7つの球状ドメインによって、リング型の構造が形成されている。このように、ダイニンはミオシンおよびキネシンとは大きく異なる構造的特徴を持っており、その運動メカニズムを解明することは、分子モーターの研究における非常に大きな課題である。しかしこのためには、運動活性を持つ組み換え型のダイニンを発現・精製できる実験系を立ち上げることが必要である。

細胞性粘菌では、細胞質ダイニンのC末端側約3分の2、分子量が380 kDaとなる断片の大量発現が既に報告されている。以降この断片を380-kDa断片とする。一次配列によると、380-kDa断片にはステムの一部、6個のAAAモジュール、ストークおよびC末端ドメインが含まれている。電子顕微鏡による解析から、この断片は単量体であり、バレル型の頭部およびストークの構造が確認されている。またこの断片は、ATP依存的な微小管結合・解離を行なうこと、ADPバナジン酸を結合した状態で紫外線照射により二つの断片に切断されることから、ATPase活性および滑り運動活性を保持していることが期待された。そこで、本論文提出者は細胞性粘菌を発現系として、細胞質ダイニン380-kDa断片の発現および精製を試みた。380-kDa領域のDNA配列を細胞性粘菌Ax2株よりクローニングし、発現用遺伝子コンストラクトを作製した。目的タンパク質のN末端にはHis₆タグおよびGFPを融合した。得られた発現用プラスミドを細胞性粘菌に導入して形質転換し大量発現を試みた。発現にはテトラサイクリン-off型のプロモーターを用い、テトラサイクリン存在下で目

的タンパク質の発現を抑制しつつ増殖させた後、発現を誘導して一過的に 380-kDa を発現させた。この方法によって 380-kDa の大量発現に成功した。次に、発現した 380-kDa の精製に取り組み、Ni-NTA カラムおよび精製微小管との共沈降によって、非常に純度の高い 380-kDa を得た。次に精製したダイニンの運動活性を検討した。GFP 抗体によってこの組み換えダイニンをガラス表面に固定し、微小管を結合させて ATP を投入して運動を開始させ、微小管滑り運動を測定する実験系を開発した。この系で 380-kDa の微小管滑り運動を測定したところ、380-kDa は ATP によって直ちに微小管を連続的に滑らせ、このモーター領域断片タンパク質の運動活性を確認した。また ATPase 測定を測定したところ、微小管非存在下において 380-kDa は高い ATP 加水分解活性をもち、微小管により非常に大きく活性化されることが明らかとなった。

こうして本論文提出者は、ダイニン頭部領域の組み換え型タンパク質は細胞性粘菌において大量発現すること、またこの組み換え型ダイニン重鎖が運動活性を持ち、ダイニンの力発生に必要な構造のすべてが 380-kDa の領域に含まれていることを明らかにした。

次に、本論文提出者はダイニンの運動活性に必須な最小限の構造の決定を目標として研究を進めた。380-kDa の N 末端および C 末端を欠失させた欠失変異体タンパク質を発現し、その運動活性を確認した。380-kDa の N 末端側については、生物種間で相同性が低い約 90 アミノ酸 (8 kDa) を欠失させた断片を作製し運動活性を確認した。この欠失変異体は微小管滑り運動をまったく行わず、運動活性を喪失していた。また ATPase 活性は微小管非存在下で 380-kDa の 10 分の 1 以下に低下し、微小管による活性化は数倍にとどまった。以上の結果から、ダイニン頭部のモーター活性において、380-kDa の N 末端部分は非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。C 末端側については、酵母やアカパンカビなどごく一部の真核細胞の細胞質ダイニンが、C 末端ドメインを他の 3 分の 1 程度の長さしか持っていない事に着目し、酵母の C 末端に相当する部位までを残した欠失変異体を作製し、運動活性を確かめた。この欠失変異体は、380-kDa に比べて約半分の速度で微小管滑り運動をした。また ATPase 活性が野生型 380-kDa と同様に大きく、微小管によって大きく活性化した。しかし微小管との結合の状態に大きな変化が見られ、野生型にくらべて ATP 非結合状態 (野生型では微小管に強く結合する) における微小管との相互作用が弱くなっていることが明らかとなった。以上の結果から、C 末端ドメインを欠失させてもモータードメインの運動そのものは維持された。しかし ATPase サイクル中の微小管との結合状態に対して、C 末端ドメインが微小管との結合を強くする役割を果たしている、という可能性が示唆された。

以上の欠失変異体に対する研究から、本論文提出者は、ダイニンにおいて正常に機能する最小のモーター領域は、380-kDa の領域であると結論付けた。

このように本博士論文提出者の論文内容はモーター分子研究に組換えダイニンという新たな魅力的な材料を提供するものである。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。