

## 論文の内容の要旨

# Study on the structural aspect of the dynein-microtubule interaction

(微小管とダイニン複合体の相互作用についての構造的考察)

氏名 水野 直子

### (背景)

分子モーターは体のすべての動きに関わる非常に重要なタンパク質である。分子モーターには、微小管上を動くダイニン、キネシン系と、アクチン上を動くミオシン系の3つがあるが、これらが複雑にコーディネートすることで、細胞内の物質輸送や、細胞小器官の位置決定が成されている。ダイニンは微小管のマイナス端、キネシンはプラス端に動くことによって、さまざまな物質輸送を担っている。

ダイニンは、AAA(ATPases Associated with various cellular Activities)タンパク質であり、キネシン、ミオシンとは全く異なるカテゴリーに属する。ここで興味深い疑問として、なぜキネシンとダイニンという異なるグループ、異なる構造を持つモーターが、同じ微小管上を動くことができるのか、という疑問がある。モーターは、それのみでは運動活性はみられず、運動をするためには、足場となる微小管が必要である。微小管との相互作用によって、“活性化”され、ATP加水分解能が上がり、移動することができる。分子モーターが、ATP加水分解による化学エネルギーを、運動という物理エネルギーに変換する仕組みの本質を知るには、微小管モーターの相互作用について、知見を得て、さらに比較することが必須である。

これまで、キネシンに関しては多くの研究がされてきた。キネシンは、モーター部位の分子量が約40kと比較的小さいので、遺伝子操作を行い、タンパク質を得るのが容易だった為である。それに対してダイニンに関しては、発見が30年近く早いにも関わらず、分子としての挙動は、ほとんどわかっていなかった。その理由として、分子量が、コンプレックスにして2000k、モーター活性のある重鎖で

500kと非常に巨大であり、複雑であるため、a) 機能部位の特定が困難なこと、さらに、b) その分子量の大きさから、遺伝子操作やタンパク質としての扱いが困難である、ということがあげられる。近年、アミノ酸配列から、ダイニンがAAAタンパクである事が明らかになった。それにより、ダイニンの構造や機能部位が明かされつつあり、微小管結合部位の決定がされた(図1)。しかし、微小管がダイニンとどの様に結合し、ATP分解能を活性化するかはわかっていない。

私は、ダイニンの微小管結合部位であるストークヘッドに注目し、その微小管との相互作用の詳細を知ること、さらにキネシンとの比較により、分子モーターの運動活性獲得の機構を解明することを目的とし実験を行い、以下に示す結果を得た。

(結果)

まず、ダイニンストークヘッド(DSH)を、大腸菌内で発現、精製をおこなった(図1)。DSHは、モータードメインとコイルドコイルを通じてつながっており、構造が非常に複雑になっている。複数の可能性を考慮し、コンストラクトを組み立てたことにより、世界中でコンペティティブな試みが行われている中で初めて、タンパク質として安定なDSHの精製に成功した。

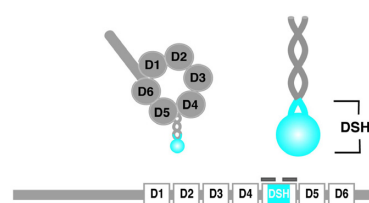


図1

DSHを用いて、微小管との結合実験を行い、DSH-微小管複合体の生化学的なキャラクタリゼーションを行った。その結果、DSHは、微小管の構成単位であるチューブリンダイマーに対し、飽和で1等量結合することがわかった。これは、キネシンの飽和結合と同じであった。

さらに、DSH-微小管複合体のクライオ電子顕微鏡像を得た(図2a)。これを、フーリエ解析(図2b)、コンピューター解析し、三次元再構成像を得た結果(図2c)、やはり、 $\alpha$ 、 $\beta$ チューブリンダイマーの周期、8ナノ

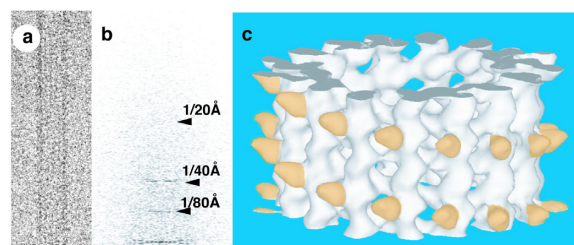


図2

メートル周期で微小管と結合することがわかった。この結果は、ダイニンの運動測定から得られた8ナノメートルというステップサイズを構造から支持するものである。興味深いことに、このときの結合面がチューブリンモノマーのちょうど間にあたる部分にあり、あたかもキネシンと同じ所に結合しているように見えた。さらに、この結合位置は、DSHよりもアミノ酸配列にして、N末、C末両端が約60残基長いDSH-SLにおいても同じことを確かめた。また、軸糸外腕2Sダイニンの微小管に対する結合位置がDSHのものと同じであることが、コンピューター画像解析の手法を工夫することにより、確かめられた。

そこで、DSHとキネシンが競合して結合しているかの検証実験を試みた。キネシンは、チューブリンダイマー間ではなく、ダイマー内のチューブリン間に結合することが知られている。DSH-微小管複合体においては、現在得られている15Åの分解能では $\alpha$ 、 $\beta$ チューブリンの区別を付けることが不可能なため、3次元再構成像からダイマー間、またはダイマー内、どちらのチューブリン間にDSHが結合している

かはわからない (図3、A、B)。DSHがキネシンと同じ面に結合しているように見えても、DSHがダイマー間に結合している場合は、キネシンとDSHは微小管上の結合サイトを共有しない (図3、B)。まず、生化学的なアプローチとして、距離0で完全に相互作用している分子間を架橋するEDCをもちいて、DSH、キネシンの競合実験を行った。その結果、DSHはキネシンとサイトを取り合う形で阻害しあっていることが分かった。さらに、キネシン-微小管複合体、DSH-微小管の複合体の3次元再構成データから、8ナノメートル周期由来のものを取り出し、その密度分布を比較した。(図3、C、D。CはDSH-、Dはキネシン-微小管複合体密度分布を示す。それぞれの図の左側に見える高いピーク位置が、DSH、キネシンとなっている。)。微小管中の8ナノメートルの周期シグナルは非常に低いため、再構成像でみる限りはシグナルによる違い、すなわち $\alpha$ 、 $\beta$ チューブリンの区別はつかないが、このように8ナノメートルのシグナルだけに注目することにより、縞が見えるようになり、キネシンがダイマー内のチューブリン間に結合することを考慮すると、図3C、Dの白丸で示した緑色の密度を持つ部分は $\alpha$ チューブリン、赤丸で示した黄緑色の密度を持つ部分は $\beta$ チューブリンを示していることがわかった。DSH-微小管複合体を、キネシン-微小管複合体と縞がそろおうように並べると、DSHの位置がキネシンと同じところにくることがわかり、DSHとキネシンは微小管中の同じ位置、すなわちダイマー内の2個のチューブリンの間に結合することが明らかになった。

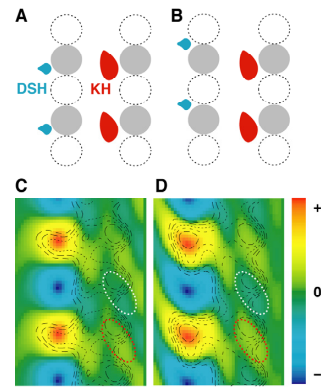


図3

(結論)

この一連の研究によりはじめて明らかになったのは、1. ダイニンストークの生化学的な性質 2. ダイニンストーク-微小管の相互作用 3. ダイニンストークとキネシンは、結合サイトを共有する ということであった。

これらの結果から私はダイニン、キネシンという2つのモータータンパク質が運動能を獲得するためには、DSH、キネシンが相互作用を起こすチューブリン表面の特定部位が必要なのではないか、ということを提唱した。また、微小管と相互作用するMAPsと呼ばれるタンパク質らは、これまで、DSH相互作用サイトと異なる部位に結合することが報告されている。そこで、さらに、微小管のプロトフィラメントの片側はMAPsが認識、分子モーターの移動を制御し、もう片側によって分子モーターの運動活性がアクティベート、移動が可能になるのではないかと、というモデルを立てた (図4)。

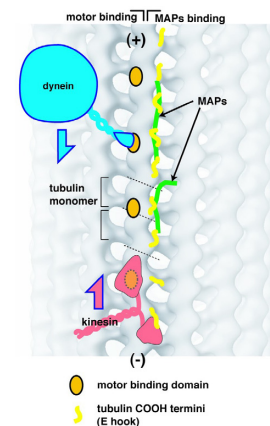


図4