

## 論文の内容の要旨

論文題目 蛍光共鳴エネルギー移動法を用いた組み換え細胞質ダイニンの構造機能相関の解明

Structure-function relationship of recombinant cytoplasmic dynein studied by fluorescence resonance energy transfer

氏名 最上 聡文

### 1. 研究の背景

細胞質ダイニンは微小管上をマイナス端方向にすべり運動するモータータンパク質であり、真核細胞内においてオルガネラや小胞の微小管に沿った輸送、また分裂期には紡錘体の形成や姉妹染色体の分離に深く関わっている。細胞質ダイニンは ATP の加水分解の際に生じる化学エネルギーを力学エネルギーに変換し、微小管上をすべり運動する。

細胞質ダイニンの組成を見ると、重鎖 2 量体といくつかの中間鎖、軽鎖および中間軽鎖といったサブユニットからなる複合体であり、その総分子量は 1000 kDa を超える巨大な分子である。これらのサブユニットのうち、重鎖がダイニンの力発生に必須であり、重鎖単量体のみでモーター活性、すなわち ATP 加水分解活性および微小管すべり運動活性を保持している。

ダイニン重鎖は AAA+ (トリプルエープラス、ATPase associated with various cellular activities) スーパーファミリーに属するタンパク質であり、AAA タンパク質に特徴的な、6 つの AAA モジュール (AAA1-AAA6) からなるリング構造 (AAA リング) を持っている。AAA リングからは、ストークと呼ばれる部位と尾部の 2 つの機能部位が突出している。尾部はダイニン重鎖一次配列のうち N 末端側約 1400 アミノ酸からなる機能部位であり、ダイニン重鎖の 2 量体形成を担い、また軽鎖およびダイナクチンを介して輸送小胞などを結合する。ストークは AAA4 モジュールと AAA5 モジュールの間から突出している。ストークは逆並行コイルドコイルからなっており、その先端にはストークヘッドと呼ばれる球状の部位がある。ダイニンの ATP 加水分解サイクルに依存的な微小管との相互作用はこのストークヘッドで起こるとされている。

AAA リングはそれぞれの分子量が 35-40 kDa の 6 つの AAA モジュール (AAA1 から AAA6)

が連なって構成されている。そのうち N 末端側の AAA1 から AAA4 の 4 つのモジュールには、ヌクレオチド結合に関わる Walker A モチーフもしくは P-loop と呼ばれるアミノ酸配列が保存されている。さらに AAA1 から AAA4 モジュールには、Walker B モチーフ、Sensor モチーフ、アルギニンフィンガーといった AAA タンパク質に特徴的なアミノ酸配列が見られる。

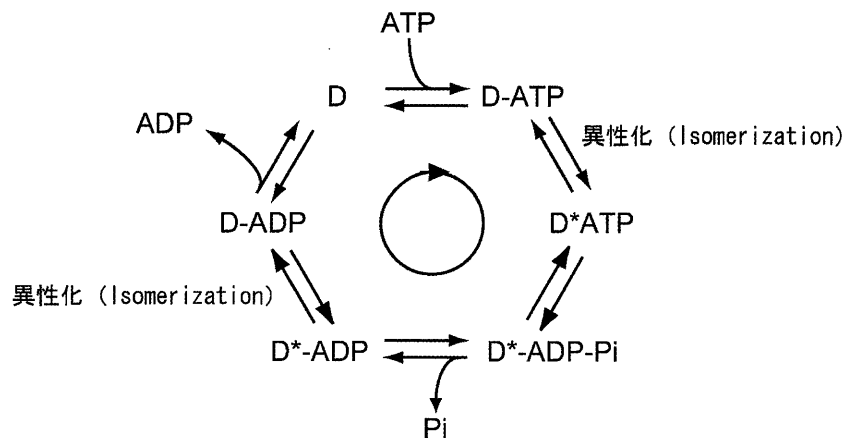
AAA1 から AAA4 モジュールにあるヌクレオチド結合もしくは加水分解部位のうち、どのモジュールで実際に ATP 加水分解が起こっているのか、まだ詳しくはわかっていない。しかし、AAA1 モジュールで起こる ATP 加水分解が主要であり、かつ AAA1 モジュールで起こる ATP 加水分解のみがダイニンのすべり運動を引き起こすことに必須であると考えられている。また、AAA3 モジュールにおける ATP 結合が、*in vivo* でのダイニンの機能に必須であることがわかっている。

ダイニンによる ATP 加水分解にともなう力発生分子機構は未だ良く分かっていないが、近年なされたネガティブ染色電子顕微鏡法を用いた軸糸内腕ダイニン c の研究により、ダイニンによる ATP 加水分解にともない、尾部が AAA リングに対して相対的に首振り様の構造変化を起こし、その構造変化がダイニンにおける power-stroke および recovery-stroke に相当するというモデルが提唱されている。

## 2. 実験の方法、結果と考察

第 1 章では、細胞質ダイニン重鎖の力発生に重要な構造変化を溶液中で捉えることを目指し、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 法を用いた。細胞性粘菌由来の細胞質ダイニン重鎖に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) および青色蛍光タンパク質 (BFP) を融合した組み換えダイニンを作製した。GFP・BFP 融合ダイニンはモーター活性を保持しており、また ATP 加水分解サイクルにともなってその蛍光スペクトルを変化させた。この蛍光スペクトルの変化は、GFP・BFP 融合ダイニンが ATP 加水分解にともなって構造変化を起こし、その結果尾部に融合した GFP と AAA リング部位に融合した BFP との相対的な位置が変化することで、FRET 効率が変化することを反映している。したがって、GFP・BFP 融合ダイニンを用いてダイニンの尾部の構造変化を溶液中で検出することができた。

GFP・BFP 融合ダイニンを用いてさまざまなヌクレオチド条件での FRET 効率の測定を行った。また GFP・BFP 融合ダイニンの AAA1 モジュールの Walker A 変異体および Walker B 変異体を用いて FRET 効率を測定した。その結果、ダイニンの ATP 加水分解サイクルと構造状態とを関連付ける以下の Scheme を得た。



ただし、この中で D および D\* はそれぞれ FRET により定義される異なる構造状態のダイニンを表す。また、ダイニンは異性化 (Isomerization) にともないこれらの 2 状態間を移行する。

次に、GFP・BFP 融合ダイニンが示す蛍光変化の速度を解析することで、ダイニンの尾部の構造変化のキネティクス解析を行った。ストップフロー法を用いて、GFP・BFP 融合ダイニンの D→D\* および D\*→D で表される異性化にともなう移行を解析した。また、これら異性化速度におよぼす微小管の影響を調べた。

このようにして得られた結果および考察をまとめると以下のようになる。

- (1) ダイニンの尾部の首振り様構造変化を溶液中で検出することに成功した。
- (2) ダイニンの尾部の首振り様構造変化は AAA1 モジュールにおける ATP 加水分解と共役して起こることが強く示唆された。また、ATP 加水分解サイクルにともない FRET 効率で定義される少なくとも 2 種類の構造状態をとることがわかった。
- (3) ダイニンに ATP が結合した状態で第 1 の異性化が起こり、その反応速度定数  $k_2$  は  $180 \text{ s}^{-1}$  であることがわかった。そしてこの第 1 の異性化にともない、recovery-stroke に相当する尾部の構造変化が起こることがわかった。
- (4) ダイニンに ADP が結合した状態で第 2 の異性化が起こることがわかった。その速度  $k_3$  は決定できないものの、最大値は  $4.2 \text{ s}^{-1}$  と見積もられた。
- (5) 第 1 の異性化は微小管によって活性化されず、第 2 の異性化が微小管によって活性化されることがわかった。これは第 2 の異性化にともない power-stroke が起こるといふモデルを支持する結果である。
- (6) 微小管によって、尾部の首振り様構造変化と共役している AAA1 モジュールでの ATP 加水分解のみならず AAA2-4 モジュールにおける ATP 加水分解も併せて活性化されることが示唆された。

第 2 章では、遺伝子組み換え技術を用い、AAA2 から AAA4 モジュールの Walker A 変異体および Walker B 変異体を作製し、ATP 加水分解活性および微小管すべり運動活性を測定すること

で、AAA2-4 モジュールにおけるヌクレオチドの結合または加水分解がダイニンの機能発現にどのような役割を担うのか調べた。

さらに第1章で開発された尾部の構造変化を検出する FRET プローブを用いて AAA2-4 モジュールの Walker A 変異体および Walker B 変異体の FRET 効率変化を測定し、尾部の構造変化に対する AAA2-4 モジュールの役割を検討した。

このようにして得られた結果および考察をまとめると以下のようになる。

- (1) AAA1 モジュールにおける ATP の結合および加水分解はダイニンの機能発現にとって必須であり、尾部の構造変化と共役している。
- (2) AAA3 モジュールにおける ATP の結合および加水分解はダイニンの機能発現にとって重要であり、AAA1 モジュールにおける ATP 加水分解サイクルと共役することで尾部の構造変化に関わっている。
- (3) AAA4 モジュールにおける ATP の結合はダイニンの機能発現にとって必須ではない。しかし、いったん ATP が AAA4 モジュールに結合して加水分解サイクルがまわりはじめると、AAA3 モジュールと同様に AAA4 モジュールにおける ATP 加水分解サイクルも AAA1 モジュールでの ATP 加水分解サイクルと共役し、この共役を介して尾部の構造変化に関わっている。
- (4) AAA2 モジュールは選択的な ADP 結合部位らしい。