

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 最上聡文

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、神経軸索輸送をはじめとした真核細胞内の物質輸送においてきわめて重要な役割をはたしている。本論文は、遺伝子組み換え技術で作成した細胞質ダイニンのモータードメインをもちいて、このモータータンパク質がどのような機構で力を発生するかを生化学的視点で解明しようとしたものである。

ダイニン重鎖は AAA+ (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、ストーク部位と尾部という2つの機能部位が突出している。尾部はダイニンの力発生にあたってレバーアームとしてはたらくと考えられており、ストークは微小管結合部位である。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おり、ヌクレオチド結合あるいは加水分解活性をもつと考えられている。しかし、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、また、どのモジュールでの ATP 加水分解が力発生に必須であるかという、ダイニンの力発生機構の根幹にかかわる問題については不明な点が多い。

一方、負染色電子顕微鏡法を用いた軸系内腕ダイニンの研究により、ダイニンによる ATP 加水分解にともない、尾部がレバーアームのように AAA リングに対してスイング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パワーストロークを生み出すという“パワーストロークモデル”が提唱されている。しかし、溶液中でこのようなレバーアーム様の動きがあるかどうかという検証が未だおこなわれていない。

このようにまだ未解明の部分が多いダイニンの力発生の分子機構を理解するには、ダイニンの ATPase としての生化学的解析と、その溶液中での構造解析が欠かせない。

そこで本論文では、第一章で、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。このため、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尾部のスイング様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ことができた。

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 $D \rightarrow D^*$ および $D^* \rightarrow D$ 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第 1 章の結果および考察をまとめると以下のようなになる。

- (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 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 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。

第 1 章で開発し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 モジュールの役割も検討した。

このようにして得られた第2章の結果および考察をまとめると以下のようなになる。

- (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、尾部のスイング様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。

このように、第1章、第2章に述べられた研究により、細胞質ダイニンの ATP 加水分解サイクルの詳細がはじめてあきらかになるとともに、このサイクルがレバーアームと考えられている尾部のスイング様構造変化とどのように共役しているかもあきらかになった。その結果、細胞質ダイニンの ATPase サイクルとその力発生との共役について、重要な知見があらたに得られた。

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。