

# 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻  
平成 17 年度博士課程 入学  
氏名 清水 洋輔  
指導教員名 田之倉 優

論文題目 微小管系モーターの構造と運動機能の研究

細胞内の運動は、モータータンパク質と呼ばれるさまざまな種類のタンパク質が、ATP加水分解により放出されるエネルギーを用いて、各タンパク質に固有のレール上を移動することにより行われる。キネシンとダイニンは、いずれも細胞骨格を形成する微小管をレールとするモータータンパク質であるが、そのアミノ酸配列や立体構造は大きく異なる。

キネシンは細胞内物質輸送や染色体分離などに関与する。ダイニンは、鞭毛や繊毛などにおいて波打ち運動を引き起こす軸糸ダイニンと、キネシンと同様に細胞内においてカーゴ輸送や染色体分離などに関与する細胞質ダイニンに区分される。キネシンについては、その運動や構造に関するさまざまな研究が進められてきたが、運動の詳細なメカニズムは未だ不明である。ダイニンはキネシンに比べて理解が遅れており、運動機構の解明に繋がるものとして、構造解析が待たれている。

本研究では、キネシンとダイニンの構造的特性を研究し、運動機構との関係についての知見を得ることを目的とした。

## 1. Unc104 について

キネシンのモータードメイン（ATPase 部位を含む球状ドメイン）に続くストーク領域は、 $\alpha$ -ヘリカル・コイルドコイルを形成し二量化する能力があるといわれている。多くのキネシンは二量体 1 分子で連続的に運動できると知られており、これをプロセッシブ性という。

運動モデルとしては、ストーク領域の二量化を利用した「雲梯モデル」が提唱されている。

線虫 **Unc104** はマウス **KIF1A** と相同の、kinesin-3 サブファミリーに属するモータータンパク質であり、神経細胞においてシナプス小胞の輸送などの運動を担うとされている。その速度は約  $1.2 \mu\text{m/s}$  であり、運動はプロセッシブであると考えられている。

**Unc104** のストーク領域には、 $\alpha$ -ヘリカル・コイルドコイルの形成が予想される配列がある。しかし **Unc104/KIF1A** は、溶液中では単量体と報告されており、「雲梯モデル」とは異なる機構によって運動性を発揮している可能性がある。**KIF1A** モータードメイン単量体コンストラクトは、 $0.14 \mu\text{m/s}$  という遅い速度ではあるが、プロセッシブに運動しようと報告されている。一方 **Unc104** を人為的に二量化させたコンストラクトは、 $1.6 \mu\text{m/s}$  でプロセッシブに運動するという報告もあり、**Unc104/KIF1A** は生体中においては二量体を形成し、通常のキネシンと同様のメカニズムにより運動している可能性も示唆されている。

### 1-1. **Unc104** のコイルドコイル領域の二量化解析

我々は線虫 **Unc104** の二量体形成能の検証が重要であると考え、 $\alpha$ -ヘリカル・コイルドコイル形成が予測される領域のペプチドセグメントを合成し、CD スペクトル測定などを用いて解析した。

**Unc104** のコイルドコイル形成領域は、アミノ酸配列から  $\alpha$ -ヘリカル・コイルドコイル形成を熱力学的パラメータを用いて予測するプログラム **Amphisearch** により予測し、それをもとに合成するペプチドセグメントを決定した。

各ペプチドセグメントについて、CD 測定を行った。 $\alpha$ -ヘリックスに特徴的な CD スペクトルを示したものについては、222 nm CD 強度の濃度依存性測定および温度依存性測定を行い、得られたデータに対し、単量体と二量体の平衡を仮定した 2 状態転移の理論曲線へのフィッティングを行って熱力学的パラメータを決定した。また超遠心分析により、ペプチドが実際に二量体を形成していることを確認した。

各ペプチドの熱力学的パラメータを比較・検討することで、二量化に重要な領域の特定を行った。**Unc104** において  $\alpha$ -ヘリックスの形成・維持に重要であると思われる配列は、**Useg03** ペプチドセグメントの配列である (**N354-E388**) であると判明した (図 1)。**Useg03** の解離定数  $K_d$  は約  $5 \mu\text{M}$  と見積もられたが、これはヒトキネシンにおける対応セグメント (**N332-R369**) の値である  $62 \text{ nM}$  よりも 2 桁大きく、二量化能は比較的低いといえる。しかし  $5 \mu\text{M}$  は  $(100 \text{ nm})^3$  空間中に 3 分子、あるいは **Unc104** の全長タンパク質濃

度 1 mg/ml 弱に相当する。生体中においては、例えばモータータンパク質の微小管への集合などにより局所的に 5  $\mu$ M 以上となることで二量化し、通常のキネシンと同様の「雲梯モデル」によりプロセッシブに運動する可能性が示唆される。

本研究により Unc104/KIF1A の運動性が、タンパク質濃度によって制御されている可能性が提示された。つまりそれは、高濃度においてはダイマーとなって高速で運動し、低濃度においてはモノマーで低速で運動している可能性である。本研究は、タンパク質濃度による生体運動のユニークな制御システムへの重要な示唆を与えるものである。

## 2. ダイニンストークヘッドについて

ダイニン重鎖はリング状のヘッドと、そこから突き出た 2 つの部位、太いテールと細いストークから構成されている。ヘッドは 6 つの AAA ドメインをタンデムに含み、その中で最も N 末端側にある AAA1 は ATPase 活性を示し、運動性に極めて重要である。ストークは AAA4 と AAA5 の間から突き出ており、10~15  $\mu$ m の逆平行  $\alpha$ -ヘリカル・コイルドコイルと、その先端にある約 120 残基の球状部位、ダイニンストークヘッド (DSH) からなる。

DSH は微小管結合部位であると報告されており、ヘッドの ATP 加水分解サイクルの各段階に応じて、可逆的に微小管との結合と解離を繰り返していると考えられる。しかし DSH は酵素部位であるヘッドの AAA1 から離れており、酵素反応の情報をどのように DSH まで伝達しているかについて疑問が生じる。Gibbons らは、酵素反応サイクルの進行に応じて逆平行コイルドコイルの疎水性残基のレジストリがずれ、その結果 DSH に構造変化が起こり、それにより微小管結合能が制御される、という仮説を提唱している。

### 2-1. ダイニンストークヘッドの NMR 帰属とリガンド結合

DSH の構造解析は、微小管との可逆的な結合・解離の仕組みの解明や、ヘッドの酵素反応との共役の解明に繋がるものと期待される。我々はその第 1 歩として、フリーの DSH の構造解析を目指すこととした。

我々はマウス細胞質ダイニン重鎖の DSH および逆平行コイルドコイルの一部に対応する、136 アミノ酸残基を含むタンパク質の発現系を構築し、これを “DS(8:5)” と名付けた。微小管との共沈実験により、精製された DS(8:5) に微小管結合能があることが確かめられ、それゆえ正しく折り畳まれていることが示唆された。

次に、安定同位体ラベルした DS(8:5) サンプルを用い、種々の NMR 測定を行った。DS(8:5) は空気やガラス表面との接触により劣化することが判明したが、ガラス管壁のシリコナイズにより、解析に足るシグナルを得ることができた。得られたシグナルをもとに主鎖連鎖帰属を行い、主鎖 N-H シグナルの 94 % を同定した (図 2)。



に向け、大きな貢献をもたらすと期待される。