

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 今村 謙士

本論文は、細胞性粘菌の系で発現させた組み換え細胞質ダイニンを用いて、その化学力学サイクルを明らかにしたものである。ダイニンは ATP を加水分解しながら微小管上を一方方向に運動するが、これは ATP を加水分解する一連の化学的サイクルと、運動に必要な周期的な構造変化（尾部スウィング）や微小管との結合/解離といった力学的サイクルの共役によるものである。この現象を化学力学共役といい、共役した 2 つのサイクルを合わせて化学力学サイクルと呼ぶ。本論文では、ダイニンの化学サイクルおよび力学サイクルのそれぞれに関する本研究の結果を述べ、両サイクルがどのように共役して微小管上での運動を生み出すかについて論じた。

まず、複数の ATP 加水分解部位について検討した。細胞質ダイニンではその配列から、AAA1、AAA3、および AAA4 モジュールに ATP 加水分解部位が存在することが予測されていたが、リン酸放出の測定から、これらの部位はすべて実際に ATP を加水分解する活性を持つことが強く示された。ただし、各 ATP 加水分解部位への ATP 結合を阻害した変異体を用いて、前定常状態における微小管-ダイニン相互作用を解析した結果から、それら複数の部位のうち、微小管親和性の変化を制御するのは尾部スウィングと同様、AAA1 モジュールの ATP 加水分解部位であることが明らかになった。また、AAA3 および AAA4 モジュールの ATP 加水分解部位における ATP の加水分解を阻害した変異体を用いて、前定常状態における微小管-ダイニン相互作用を解析した結果から、これらの変異体では AAA1 モジュールの ATP 加水分解サイクルが微小管と強く結合する中間状態（たとえば D-ADP 状態）にトラップされることが分かった。すなわち、AAA3 および AAA4 モジュールの ATP 加水分解部位は AAA1 モジュールのそれに対して調節的に働くことが示された。

次に、AAA1 モジュールにおける ATP 加水分解サイクルと、微小管親和性の変化及び尾部スウィングの共役について検討した。様々なヌクレオチドや変異を利用して、AAA1 モジュールの ATP 加水分解部位をその ATP 加水分解サイクルにおける各中間状態にトラップし、微小管との共沈降実験を行った結果、ダイニンには微小管結合に関して少なくとも 2 通りの状態が存在することが分かった。 $0.2\mu\text{M}$ の K_d で微小管と強く結合する状態と、 $>10\mu\text{M}$ の K_d で微小管と弱く結合する状態である。微小管親和性の変化は尾部スウィングと協調し、適切なパワーストローク、リカバリーストロークのサイクルを生み出すことがあきらかとなった。共沈降実験の結果から、アポ状態（ヌクレオチドを結合していない状態）のダイニンは微小管と強く結合し、その尾部はポストstroークの位置にある。ストップフロー法による、前定常状態の微小管-ダイニン相互作用および尾部スウィングの解析から、ATP の結合 ($2.3\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) に伴い、ダイニンは微小管から迅速

に解離し (310 s^{-1})、続いて尾部がポストストロークからプレストロークの位置へとスウィングすることが示された。

さらに、リン酸結合タンパク質を用いたリン酸放出の測定結果から、ATP の加水分解、およびリン酸放出は速く起こることが示唆された。この後ダイニンは D^* -ADP 状態に入るが、この間ダイニンは微小管から解離した状態を保ち、また尾部もプレストロークの位置から動かない。リン酸放出の測定結果、および ADP 存在下における前定常状態の微小管-ダイニン相互作用の解析から見積もった ADP 放出速度の値から、AAA1 モジュールの ATP 加水分解サイクルの微小管非存在下における律速段階は、リン酸放出と ADP 放出の間にあり、 D^* -ADP 状態からもう 1 つの ADP 状態、 D -ADP 状態への遷移であることが分かった。

これまでダイニンの力学サイクルに関しては、尾部スウィングサイクルの研究が微小管との結合/解離サイクルの研究に大きく先行していたが、本研究から後者のサイクルについて多くの情報が与えられ、それらによって両サイクルの協調としての力学サイクルをより深く理解できるようになった。

このように、本論文は細胞質ダイニンの化学力学サイクルの解明に大きく寄与するものである。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。