

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 島 知弘

本論文は、ATP の加水分解により生じるエネルギーを用いて微小管のマイナス端方向へ運動するモータータンパク質である細胞質ダイニンの作動機構を、ダイニン組換え体を用いて明らかにすることを旨としたものである。

ダイニン重鎖は、ATP 加水分解活性を担う AAA リングからストークおよび尾部と呼ばれる 2 つの機能部位が突出した構造をとっている。ストークの先端には微小管結合部位であるストークヘッドが存在し、尾部には二量体形成部位や他のタンパク質との結合部位が存在している。一般に ATP 駆動型のモータータンパク質は、ATP の結合や加水分解によって起きるヌクレオチド結合部位の微小な構造変化を、大きな動きに増幅して力を発生させている。ダイニンでは、微小管結合部位を持つストークもしくは尾部の両機能部位のどちらかが、このような構造変化の増幅を起こす機械的なレバーのように働くことで、微小管上での力発生を行うという“tail swing”モデルが提唱されている。さらに溶液中においても、ヌクレオチド状態の変化に応じて、この尾部と AAA リングとの相対的な位置変化が起こっていることが、2 つの蛍光色素を融合させた単量体細胞質ダイニン重鎖を用いた蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET, Forster resonance energy transfer) による実験で確認された。しかしこの尾部のスイング様の動きが、実際にダイニンの運動を駆動しているのかという点については明らかでなかった。

そこで、論文の第一章では、“tail swing モデル”で示されるようにダイニンの尾部が力発生を担う機械的なレバーとして働いているのか、それとも他の力発生機構がダイニンの運動を駆動しているのかという点を明らかにするため、尾部の動きが微小管上でのダイニンの運動へとつながらない微小管すべり運動実験システムを構築した。具体的には、ビオチンタグを単量体細胞質ダイニン重鎖の尾部上または AAA リング内の特定の位置に挿入し、ビオチン-アビジン結合を利用してこのダイニンをガラス表面に固定した。Tail swing モデルに従えば、尾部末端でこのダイニンをガラスに結合させたときには、尾部の運動が AAA リングやストークを介して微小管のすべり運動を引き起こすのに対し、AAA リングでこのダイニンをガラスに結合させたときには、尾部のスイング様運動が起こっても、それによる AAA リングやストークの位置変化は起こらないはずである。そのため、これらのビオチン化ダイニンの微小管すべり運動活性を計測することで、尾部の構造変化がダイニンの運動に及ぼす影響を見積もることができる。その結果、細胞質ダイニンが速い微小管すべり運動を行うためには尾部の寄与が必要であり、尾部のスイングがダイニンの主要な作動機構であることが明らかとなった。一方、尾部の運動

が AAA リングやストークの位置変化につながらない場合でも、速い運動の 1/50 程度の速度で微小管すべり運動を細胞質ダイニンが起こすことが明らかとなった。この遅い微小管すべり運動は、他のモータータンパク質で提唱されているようなバイアスのかかったブラウン運動、もしくは AAA リングに対するストークの突き出し方向の変化によって駆動されている可能性がある。このように細胞質ダイニンは、尾部のスイング様運動とそれ以外の二次的な機構という 2 つの運動機構によって駆動されていることが示され、また、どちらの運動機構も運動の方向性は一致しており、ダイニンが微小管のマイナス端方向へ進む動きを生み出していることが明らかとなった。

第二章では、単量体細胞質ダイニン重鎖の運動がどのように組み合わさり、二量体ダイニンとしての運動を達成しているのか、という点について研究を進めた。二量体化した細胞質ダイニン一分子は、微小管から解離することなく百ステップ以上連続的に進むことができる。従って、両方の重鎖が同時に微小管から解離することがないように、何らかの制御が二つの重鎖にかかっているはずである。この制御の仕組みとしては、ATP 加水分解の特定の過程の速度を変化させる制御、もしくは二つの重鎖が結合している尾部を介した張力による制御といったものが考えられる。そこで一方の重鎖の ATP 加水分解過程を停止させ、ATP 加水分解過程の変化による制御を受けないようにしたヘテロ二量体や、尾部末端に柔軟なリンカーを挿入し、尾部末端を介した張力が影響しない二量体を作成し、これらの二量体の一分子運動を解析することで、二つの重鎖間の制御機構を明らかにしようとした。

これまで、細胞質ダイニンは二つの重鎖が交互に力発生して微小管上を進んでいると考えられてきた。しかしダイニンの主要な ATP 加水分解部位である AAA 1 モジュールの WalkerA モチーフに K/T 変異を導入した P1T 変異体重鎖と野生型重鎖を結合させた野生型/P1T ヘテロ二量体は、一方の重鎖が力発生を全く行わないにもかかわらず、微小管上を連続的に運動した。力発生を行わない重鎖である P1T 変異体は自立的に微小管から解離せず、ヌクレオチド状態も変化させることができないため、野生型重鎖の力発生に伴って P1T 変異体に機械的な張力がかかり、その力によって P1T 変異体が微小管から解離していると考えられる。したがって二量体細胞質ダイニンの連続的な運動を駆動する仕組みとして、分子内の二つの重鎖間での機械的な張力が関与していることが示唆された。この機械的な張力の伝達部位としては、二つのダイニン重鎖が結合している尾部末端が最も可能性が高いと考えられていた。しかし尾部末端に柔軟なリンカーを挿入し、尾部末端を介した張力が伝わらないよう設計した二量体組換えダイニンが、リンカーを挿入していないものと同様に連続的に運動した。このことから、ダイニン重鎖の尾部末端以外の領域、たとえば AAA+リング間に機械的な張力を伝達する部位が存在し、二量体間の情報伝達を担っている可能性が示された。

本論文の結果は、細胞質ダイニンの作動機構の解明に寄与するところが大きい。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。

