

論文の内容の要旨

論文題目 細胞質ダイニンの構造および機能の解析

(Molecular dissection and functional characterization of cytoplasmic dynein)

氏名 沼田 直己

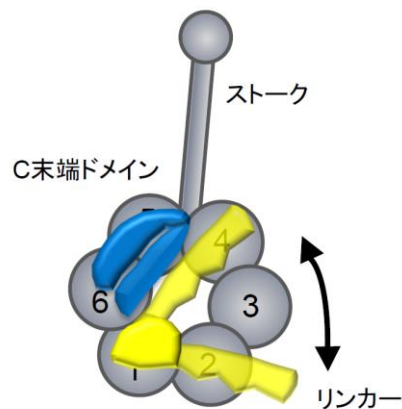
細胞質ダイニンはATP加水分解により生じる化学エネルギーを力学エネルギーに変換し、微小管上をマイナス端方向に連続的に運動するリニアモータータンパク質であり、細胞内における小胞輸送、細胞分裂時における染色体分離など、多様な役割を果たしている。近年、他のモータータンパク質であるミオシンやキネシンの分子機構は詳細な点まで明らかにされてきているが、ダイニンの構造や機能発現機構についてはほとんど分かっていない。

細胞内において細胞質ダイニンは、モーター活性を担う重鎖がホモ二量体を形成している。重鎖は、AAA+スーパーファミリー (AAA、ATPases associated with various cellular activities) に属するタンパク質である。AAA+スーパーファミリータンパク質に共通した構造的特徴は、ATP結合・加水分解活性を持つ、よく保存された200~250 a.a.のAAA+モジュールである。もう一つの特徴は、これらのタンパク質が、機能を発現するために、AAAリングと呼ばれる多量体（主に六量体）のリングをしばしば形成するということである。AAA+ファミリータンパク質の中では珍

しく、ダイニンは一つのポリペプチド鎖上に複数のAAA+モジュールを持ち一分子でAAAリングを形成する。ダイニン重鎖は、大きく分けて三つの構造的に異なるドメインから構成される：数珠つなぎに並んだ六つのAAA+モジュール（AAA1-AAA6）を含むリング状の頭部、N末端に位置し重鎖の二量体化および他のポリペプチドとの複合体形成や荷物との結合に携わる尾部、そして頭部から突き出た逆平行のコイルドコイルおよび先端の微小管結合部位からなるストークである。ネガティブ染色電子顕微鏡を用いた構造解析の結果、ダイニンにおいては、尾部のC末端側1/3を占めるリンカーと呼ばれる約60 kDaのドメインが、ATP加水分解部位の小さな構造変化を大きな運動へと増幅させるレバーアームとして機能していて、このリンカーのスイング運動によってダイニンの運動が駆動されているというモデルが提唱されている。また、尾部を欠失し、N末端がリンカーから始まる380 kDa断片がダイニンのモータードメインであることが分かっている。

第一章では、N末端領域およびC末端領域を段階的に欠失した様々な長さの組み換えダイニンコンストラクトの生化学的解析および電子顕微鏡観察によって、ダイニンのAAAリングのドメイン構造を明らかにした。その結果、図1のようにダイニンのリング構造が六つのAAA+モジュールのみから形成されていることが分かった。この発見は、C末端ドメインがリング形成に必須であるとするこれまで最も有力だった説を覆すものであり、ダイニンの構造の理解のみならず、AAA+スーパーファミリーの統一的な構造、動作原理を探る上でも非常に重要な意義をもつものである。

また、AAA+モジュールの先に位置するC末端ドメインは、詳しく見るとN末端側の15 kDaのサブドメイン、C末端側の32 kDaのサブドメインの二つの独立したサブドメインと、それらをつなぐ柔軟なヒンジ状の構造によって構成されているが、本研究によって二つのサブドメインが異なった機能を持つことが分かった。まず、N末端側の15 kDaの領域はリングを裏打ちする構造で、ATP加水分解サイトと微小管結合部位の間の情報伝達に必須である。また、C末端ドメインのC末端側32 kDaの領域は単量体での基本的な運動活性・酵素活性には必須ではない。



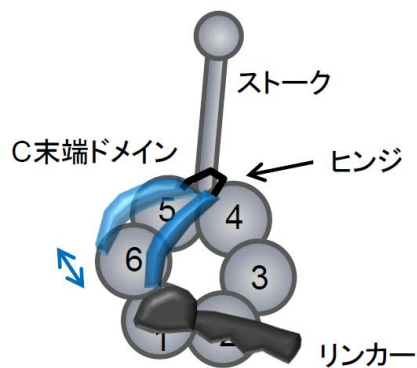
**図 1. ダイニンのリング構造。** ダイニンの AAA リングは六つの AAA+モジュールのみから形成され、リンカー（黄色）と C 末端ドメイン（青色）はリングの一部ではなく、リングを覆う構造である。リンカーのスイング運動（矢印）によってダイニンの運動が駆動されると考えられている。

第二章では、さらに C 末端ドメインの機能をダイニンの連続運動性の観点から検証した。二量体の細胞質ダイニンは、連続して歩行運動することができるが、この連続運動性に必要な構造はまだ明らかにされていない。そこで、GST による二量体化システムを利用し、380 kDa モーター断片を二量体化したコンストラクト GST380 の連続運動活性を決定したうえで、C 末端 32kDa の領域を欠失した二量体コンストラクトや、ヒンジの一部を欠失した二量体コンストラクトなどの運動特性を検証することで、C 末端領域の機能をより詳細に調べることにした。

GST380 は一分子で連続的に歩行運動した。次に、C 末端側の 32 kDa の領域を欠失した二量体コンストラクトを観察したところ連続的に運動しなかったため、この領域が連続運動性には必須であることが分かった。また、この領域を欠失したコンストラクトは ATP の有無に関わらず、微小管との親和性が非常に低いことが分かった。そこで、バッファーのイオン強度を下げたり、微小管結合部位に変異を導入したりすることによって人為的に微小管との親和性を上げると、連続運動性を回復した。したがって、C 末端側の 32 kDa の領域の欠失による連続運動性の損失が微小管との親和性の低さに起因すること、この領域を欠失しても二つのモータードメインが同時

に解離することを防ぐ gating 機構を保持していたことが分かった。このことから、微小管との親和性と gating 機構が独立した要素であること、また gating 機構を維持したまま微小管との親和性を変えることによって連続運動性の ON/OFF を制御する機構が存在することが分かった。

さらに、15 kDa 領域と 32 kDa 領域をつなぐヒンジを部分的に削り、二つのサブドメインの相対的位置関係を変えると、微小管との親和性が向上し、連続運動性が野生型よりも高くなることが分かった。したがって、以上の結果を踏まえると、C 末端ドメインが図 2 のように連続運動性の ON/OFF を切り替えるスイッチの働きをしている可能性が考えられる。また、その構造的特徴から、この C 末端ドメイン内の構造変化は、ヒンジを挟んだサブドメイン間の相対的位置の変化（矢印）によるものであるかもしれない。



**図 2. 連続運動性の ON/OFF の制御。** C 末端ドメイン（青色）は二つの独立したサブドメインとそれらをつなぐヒンジ（黒の曲線）からなる。C 末端ドメイン内の構造変化（矢印）によってダイニンの連続運動性が制御されている可能性がある。

ほぼすべての生物の細胞質ダイニンは、キネシンとともに、細胞内の小胞輸送に携わっている。細胞質ダイニンとキネシンは逆方向に運動するため、生産的な小胞輸送を行うためには、キネシン・ダイニンが一つの小胞を奪い合って経時的な綱引きを行う事態を避けなければならない。そのためには、ダイニンとキネシンの連続運動性の ON/OFF を制御することが不可欠であり、本論文で示したような連続運動性の ON/OFF の制御が生理的にも意味を持つ可能性がある。