

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 沼田 直己

ダイニンは、ATP 加水分解で得られるエネルギーを利用して微小管上を運動する巨大なタンパク質複合体である。ダイニン複合体のなかでモーター機能を担う重鎖は分子量 50 万を超えるポリペプチド鎖で、AAA (ATPase associated with various cellular activities) ファミリーに特徴的な配列をもつ 30 kDa AAA-ATPase 様モジュールを 6 個ふくむ。これら AAA モジュールはリング構造 (AAA リング) を構成し、そこでの ATP 加水分解がダイニンの力発生を駆動する。AAA リングからは、ストークとリンカーという 2 つの機能部位が突出している。リンカー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。これまでの電子顕微鏡解析から、AAA リング、リンカー、ストークをふくむ重鎖のほぼ三分の二 (380 kDa) が、ダイニンのモータードメインに相当することが知られている。

本論文の第一章では、こうしたダイニンの構造とモーター活性との相関を明らかにするために、細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) 由来の細胞質ダイニン重鎖遺伝子を用いて、これまでに知られているモータードメインの N 末端領域および C 末端領域をさらに段階的に欠失させた組み換え体を構築し、その ATP 加水分解活性や微小管滑り運動活性を調べた。

まず、6 個の AAA モジュールの上流に位置するリンカーの N 末端側の限られた領域 (8 kDa) を欠失させると、ATP 加水分解活性や微小管滑り運動活性が百分の一にまで激減した。このことから、ここがモーター活性に必須ではないものの、モーター機能にとってきわめて重要な領域であることが分かった。この結果は、8 kDa 領域のよく保存された残基への点変異導入実験でも支持された。ダイニン AAA リングでの ATP 加水分解にともない、リンカーの N 末端領域がふたつの AAA モジュール (AAA2 と AAA4) の間を行き来する。このリンカースイングがダイニ

ンのパワーストロークに相当するというモデル（“リンカースイング・モデル”）が提唱されている。リンカーN末端の限られた領域の欠失や点変異導入で ATP 加水分解活性や微小管滑り運動活性が著しく低下したことは、このリンカースイング・モデルを支持するものである。

6個の AAA モジュールの下流には大きな非 AAA 型 C 端ドメイン (47 kDa) が位置している。このドメインは、N 末端側の 15 kDa のサブドメインと C 末端側の 32 kDa サブドメインに分かれる。この 47 kDa ドメインは、AAA リングの一員としてリング形成に必須とこれまで考えられていたが、その当否を検証するため、この 47 kDa ドメイン全体の欠失変異体や 32 kDa サブドメイン欠失変異体を作成し、これら変異体について ATP 加水分解活性や微小管すべり運動活性を調べた。その結果、47 kDa ドメインは ATP 加水分解活性には必須ではないこと、さらに 32 kDa サブドメインは微小管すべり運動活性にも ATP 加水分解活性にも必要がないことが分かった。このことは、47 kDa ドメインが ATP 加水分解活性を担う AAA リング構造に必須であるというこれまでの予想を覆すものであった。さらに電子顕微鏡による解析の結果、47 kDa ドメイン欠失変異体も AAA リング構造を維持していることが分かり、このドメインが AAA リングの構成要素ではないことが明らかとなった。

細胞質ダイニンはダイニン重鎖 2 本を主な構成成分としており、ふたつのモータードメインをもつ。ATP 加水分解にともない、細胞質ダイニンは微小管上を長距離にわたってすべり運動を続ける（連続運動性）。この連続運動性は、ダイニン分子内のふたつのモータードメインが 2 足歩行のように交互に微小管と相互作用することで保障されている。第二章では、連続運動性に必要なモータードメインの構造に関する知見を得るために、47 kDa ドメインの役割を検討した。まず、細胞質ダイニンの二量体構造を模倣するため、二量体化タグをもちいて二量体 380 kDa モータードメインを構築した。そして、二量体 380 kDa モータードメインや 32 kDa サブドメインを欠失させた二量体などの運動特性を定量的に解析した。

この結果、一分子の二量体 380 kDa モータードメインは微小管上を長距離にわたり連続的に滑り運動するが、32 kDa サブドメインを欠失した二量体では連続的運動は観察できなかった、こ

のことから、この領域が連続運動性には必須であることが分かった。しかし、微小管結合部位に変異を導入し人為的に微小管との親和性を上げると、この欠失変異体は連続運動性を回復した。したがって、この欠失変異体が微小管上での連続運動性を失ったのは、微小管との親和性が低下したためであり、二つのモータードメインが同時に解離することを防ぐゲート機構が失われたためではないことが分かった。さらに、15 kDa サブドメインと 32 kDa サブドメインをつなぐヒンジ領域に変異を導入し、その相対的位置関係を変えると、微小管との親和性が上下し、それに応じて連続運動性が変わることが分かった。このことは、47 kDa ドメインが ATP 加水分解部位とストーク先端部にある微小管結合部位をつなぐ働きをしており、そのうち 32 kDa サブドメインが連続運動性を保障していることを示唆している。

本論文で述べられた研究から、細胞質ダイニンについて、1) リンカーの先端領域がリンカーシングに重要な役割を果たす、2) 重鎖 C 端にある 47 kDa ドメインは AAA リング構築には関わっていない、そして 3) 47 kDa ドメイン後半にある 32 kDa サブドメインはダイニンの力発生には必須ではないが、微小管上での連続運動性を左右する、という重要な知見が得られた。

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