

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

# Studies on Motile Mechanisms of Cytoplasmic Dynein Based on the Properties of Microtubule Tracks (微小管相互作用特性に基づく細胞質ダイニン運動機構の研究)

柴田 桂太朗

### 研究の背景と目的

真核細胞において、細胞骨格の一種である微小管は中心体から放射状に伸展し、細胞内ネットワークを構築している。微小管系モータータンパク質の一種である細胞質ダイニン-1（以下、ダイニン）とキネシン-1（以下、キネシン）は ATP 加水分解エネルギーを利用して、この微小管上を一方向に運動することで細胞内輸送や紡錘体形成などを行っており、ダイニンは細胞の中心へ向かう逆行輸送（微小管のマイナス端方向）、キネシンは細胞の中心から外へ向かう順行輸送（微小管のプラス端方向）を担っている。また、キネシンは機能や役割によって多種類に分化しており、それぞれの運動特性も多様であるのに対し、ダイニンは1種類のみで細胞内の多くの生命活動に関与している。その多機能性をもたらす運動特性には多くの研究者が関心を寄せているが、未だに分かっていないことが多い。

細胞内において複数の役割を持っているモータータンパク質にとって、働いているときの周辺環境は一定ではない。特に微小管上には様々な微小管結合タンパク質が存在しており、ダイニンやキネシンの運動に影響を及ぼしている可能性がある。しかしながら、*in vitro*

でダイニン、キネシンの運動メカニズムを調べる際には、微小管の環境は一定であることが多く、これまで、微小管の性質を変化させて、モータータンパク質の運動を観察する試みはあまり多くなかった。

そこで本研究においては、微小管側の性質・状況を変化させ、ダイニン、キネシンがどのような運動変化を示すのかを観察し、その対応から特にダイニンの運動メカニズムを探ることを目的とした。

## 各論

### 1. 微小管プロトフィラメント1本上のダイニン、キネシン1分子運動観察

微小管はチューブリンの重合体で、13本のプロトフィラメントが円筒状に平行に並んだ構造をしている。ダイニン、キネシンが結合する部位は、微小管表面に露出している $\beta$ チューブリンのヘリックス12であり、各プロトフィラメントに8nm毎に存在している。

ダイニンは2つの頭部で微小管のプロトフィラメントを複数本使いながら運動する一方、キネシンは2つの頭部で1本のプロトフィラメントに沿って運動していることが分かっている。特にダイニンは、頭部の直径が約12nm、幅が9nmあり、キネシンの10倍程大きい。運動時は幅約4nmの狭いプロトフィラメントを複数本使わないと、運動に物理的な無理が生じると予想されていた。

そこで、微小管のプロトフィラメントを1本だけにしたとき、ダイニン、キネシンは運動可能かどうか調べることにした。まず私は、ダイニン、キネシンが使用可能なプロトフィラメントを1本しか持たないzinc-sheetを作製した。次にこのzinc-sheet上をダイニン、キネシンに運動させ、その様子を捉えることに成功した。さらにダイニンの頭部間距離を長くしたダイニンを使って同じ実験

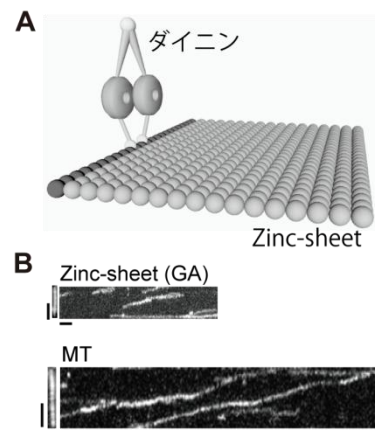


図1. (A) Zinc-sheet上のダイニン運動モデル (B) Zinc-sheet上と、微小管上のダイニンの運動を示したカイモグラフ

を行った。これらの運動速度を解析したところ、ダイニン、キネシン共に微小管上の運動速度とほとんど同じ速度であった。つまり複数本のプロトフィラメントを使って運動しているときと比べても、運動の仕方に大きな違いがないことが判明した。

この結果を踏まえて、特にダイニンに関しては、その構造的特徴や大きさから、zinc-sheet 上における運動は図 2 のような inchworm ステップである可能性が示された。

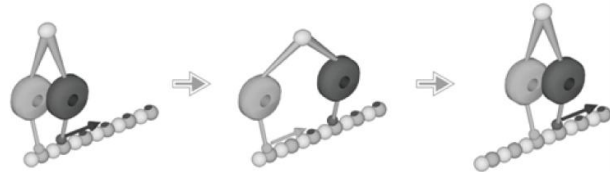


図 2. inchworm ステップの模式図

## 2. モータータンパク質による渋滞微小管上のダイニン、キネシン 1 分子運動観察

前述の通り、細胞内の微小管上には様々な微小管結合タンパク質が存在し、混雑していることが予想される。また積荷の輸送や紡錘体形成時においては、ダイニンやキネシンは局所的に密に集合して働かなければならない。

そこで私は、このような混雑時にダイニン、キネシンはそれぞれどのような運動変化を示すのか調べることにした。具体的にはモータータンパク質で渋滞した微小管上をダイニン、キネシンそれぞれに運動させ、その様子を観察した。まずは、運動するダイニンもしくはキネシンで渋滞した微小管を使って実験を行った。渋滞の混み具合は、3-4 段階に分けて観察した。さらによりダイニン、キネシンの運動阻害を明確にする為に、運動できないダイニンもしくはキネシンで渋滞した微小管を使って、同じ実験を行った。混雑時に 1 分子の運動を区別して観察する方法を工夫し、得られた画像データから、各分子の運動速度、移動距離、運動時間、微小管結合頻度を計測・集計した。

すると、渋滞要因や混み具合によって、ダイニン、キネシンそれぞれが特徴的な運動変化を示した (図 3)。最も特徴的だったのが、ダイニン、キネシン共に微小管の混雑が増すにつれて結合頻度が上昇したことである。特に運動性キネシン存在下では顕著であり、最大でキネシンの結合頻度が約 50 倍上がった。

これらの特徴から、ダイニンは障害物にぶつかるとうすぐに微小管から解離する傾向にあ

るが、混雑した微小管では結合頻度を上げることで、移動距離を維持しているものと考察される。これはつまり、片方の頭部のステップが阻害されても、もう一方の頭部はそのまま cross-bridge サイクルを進め、微小管から解離してしまうこと、すなわち分子内の 2 つの頭部間の cross-bridge サイクルが独立していることを意味する。一方、キネシンも微小管から解離しや

すくなるが、障害物が除かれるまで少し待つものと考えられる。さらにキネシンは混雑した微小管に結合したり、微小管上の一部に集合する際に効率よく集まることができると推察される。

## 総括

本研究により、ダイニンは inchworm ステップが可能であり、2つの頭部間の cross-bridge サイクルは互いに独立している、という特徴をもつことが明らかになった。しかしながら、これら2つの特徴が両立するような運動モデルは、これまでに提唱されていない。そこで私は、これまでに報告されているダイニンの研究結果を踏まえ、今回明らかになった特徴を両立させて説明するダイニンの運動モデルを構築した。今後、このモデルの正当性を検証し、ダイニン運動モデルの確立を目指していきたい。

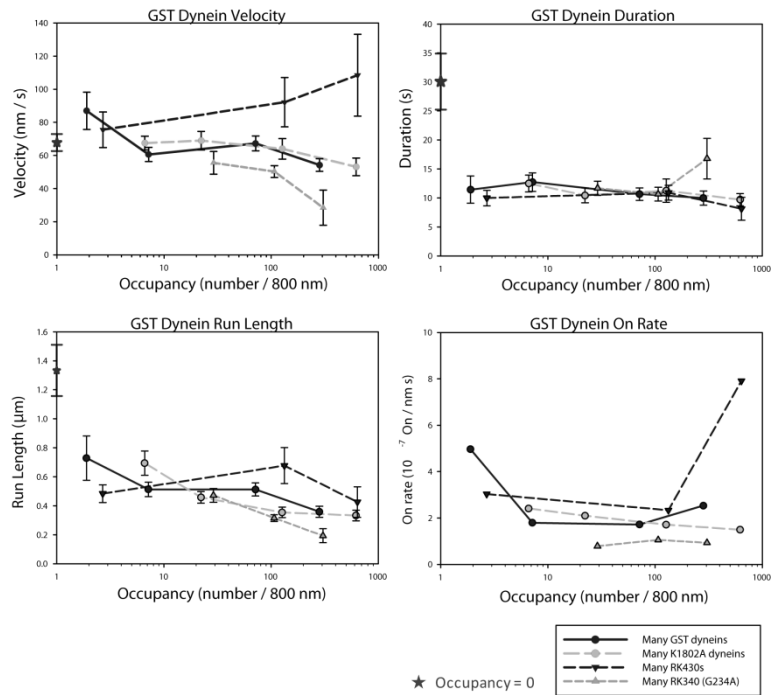


図 3. ダイニンで渋滞した微小管におけるダイニンの運動（上）と、キネシンで渋滞した微小管上におけるキネシンの運動（下）を示したカイモグラフ