

本論文「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)」は、序論、第 1 章 Dynein and Kinesin Moving on Single Protofilaments、第 2 章 Dynein and Kinesin Moving on Crowded MTs with Motor Proteins、総合討論、という構成になっている。

ダイニンは微小管の関わる細胞運動の原動力となるモータータンパク質分子である。本論文の序論では、ダイニンの分子構造と運動メカニズムについて、*in vitro* で明らかにされてきたこれまでの研究をまとめ、さらに、細胞内でダイニンが働くときの周辺環境を想定すると、これまでの微小管側が一定環境にある *in vitro* の運動解析だけでは十分でなく、本研究の主題である「微小管の性質・状況を変化させてダイニン機能を探求する」ことが重要であるという着想に至った経緯が述べられている。

第 1 章では、ダイニンが微小管のプロトフィラメント 1 本だけを使って運動できるかどうか、という問題に答えるために、*tubulin* の集合体である *zinc-sheet* を使った実験を行った。*zinc-sheet* には、*tubulin* 上のダイニン結合領域が表面に露出しているプロトフィラメント、すなわち、ダイニンがトラックとして使用できるプロトフィラメントが 1 本しか存在しない。この *zinc-sheet* は基板に固定されたダイニンの上を滑り運動するが、片端の 1 本のプロトフィラメント以外のプロトフィラメントは運動に使用できないこと、片端の 1 本にモータータンパク質が特異的に結合することなど、綿密なコントロール実験を行ったうえで、ダイニン 1 分子がプロトフィラメント 1 本を使ってプロセスに（微小管から解離することなく連続的に）運動することを直接観察した。これは、本論文でコントローとして使用されたキネシンも含めて、モータータンパク質であるダイニンとキネシンが 1 本のプロトフィラメントだけを使って運動可能であることを直接示した、初めての実験結果である。さらに、ダイニン 1 分子中の 2 個の頭部間の距離を離して固定した組換え体ダイニンを使用して、ダイニン頭部の重なりあいが起こらない条件でも 1 本のプロトフィラメント上をプロセスに運動できることを明らかにした。これらの運動の速度、連続性、拡散係数などを計測し、それらの値が微小管上でおそらく複数のプロトフィラメントを使って運動しているときと大差がないことを見出した。これらの結果とダイニンの構造的特徴などから、ダイニンの運動は 2 つの頭部を交互に前に出す *hand-over-hand* 方式ではなく、片方の頭部が常に前方に、他方の頭部が常に後方に位置するような *inchworm* 方式で運動する可能性が高いことを結論した。

第 2 章では、細胞内で微小管は種々の微小管結合タンパク質が結合し、さらに積み荷の

輸送や紡錘体形成時に局所的にモーター分子が集合する状況にあるので、微小管上に複数のモータータンパク質が相互作用している状況において、1分子のモータータンパク質に着目してその運動特性を解析した。すなわち、微小管上に多数の蛍光ダイニン、または蛍光キネシンを相互作用させ、相互作用している分子の量を蛍光強度から定量し、別の蛍光色素で標識した1分子のダイニン、またはキネシンの運動を観察し、その速度、移動距離、相互作用時間、微小管への結合頻度などを計測した。相互作用させる多数分子については、1分子観察するのと同じ運動性のあるダイニンまたはキネシンを用いることに加えて、モータードメインに変異を導入して運動性を失ったダイニンまたはキネシンを用いた実験も行った。その結果、ダイニンは運動していない分子や反対方向に動くキネシン分子に出会うと、すぐに微小管から解離しやすく、一方、キネシンはそのような障害物に出会ってもすぐには解離せずに、別の結合サイトを探すか、次の結合サイトが空になるまで待つてから次のステップを行う、という特徴を持つことが明らかになった。このことは、キネシンには2つの頭部間でクロスブリッジの進行を連携させる機構が存在するが、ダイニンにはそのような機構がなく、2つの頭部のクロスブリッジサイクルが独立していることを意味する。さらに特筆すべき結果は、ダイニン、キネシン共に、微小管上が他の分子で混み合っている状況で、微小管への結合頻度が上昇したことである。特に、運動性のあるキネシンで混雑しているときに、1分子ダイニン、キネシン共に結合頻度の上昇が顕著であった。これは、多分子のモータータンパク質の間で微小管を介したコミュニケーションがあり、モーター分子が働いている微小管の近傍にさらにモーター分子が集合しやすいという特性を表わしており、細胞内でのモーター分子間の協調性を説明するメカニズムとして、新しい概念を提出するものである。

ダイニンは **inchworm** 方式のステップが可能であり、かつ、2つの頭部間のクロスブリッジサイクルが互いに独立している、という以上の結果を踏まえて、総合討論では、ダイニンの運動モデルを構築した。そのモデルにおいて、(1) ダイニンの2つ頭部の距離が可変であること、(2) ダイニン微小管結合部位は、微小管上を連続的に滑るように移動すること、(3) 微小管に結合したダイニン頭部に力がかかるとき、微小管の極性に基づく力の向きによって解離しやすさが異なること、の3要件があれば、ダイニンは **inchworm** 方式で運動できると説明した。

以上のように、論文提出者は本研究において、ダイニンがプロトフィラメント1本の上を **inchworm** 方式で運動できること、ダイニンの2つの頭部間のクロスブリッジサイクルが独立していること、モーター分子が働いている微小管の近傍には次のモーター分子が結合しやすいこと、など重要な新知見を提供した。これらの結果は、モータータンパク質の運動機構そのもの、さらに、細胞内での複雑で高次な現象に対応するモータータンパク質の特性についての理解に、大きく貢献するものと認められる。

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。