

論文の内容の要旨

ヒト細胞質ダイニン 1 分子の パワーストロークに伴う変位の測定

(Single molecular measurement of displacement driven
by power stroke of human cytoplasmic dynein)

氏名 木下 慶美

細胞質ダイニンは、ATP の加水分解エネルギーを利用して、微小管上をマイナス端方向に運動する生体分子モーターである。ダイニン頭部のモータードメインに含まれる linker 部位のスイング（パワーストローク）がダイニンの二足歩行運動に関わっているというモデルが提案されている。他の分子モーターであるキネシンやミオシンにおいて、頭部の構造変化が二足歩行運動において重要な役割を持つことが示唆されていることから、ダイニンにおいてもパワーストロークが運動に重要である可能性がある。しかしながら、これまで行われてきた二量体ダイニンが微小管上を運動する研究では、頭部間が相互作用するため個々の頭部のパワーストロークに伴う変位のみを抽出することが困難であった。そこで本研究では、ダイニン頭部のパワーストロークが運動を担っているのかを明らかにするために、単量体ダイニン 1 分子が微小管結合に伴い発生する変位を、光ピンセットを用いて測定した。さらに、ダイニンの変位と linker のスイングの関係を明らかにするために、ダイニンに導入した GFP と BFP 間の FRET 効率を測定した。

微小管非存在下でパワーストローク前後の状態にあるダイニンの割合を FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）法により見積もった。FRET 効率は BFP と GFP の相対距離を表す指標であり、相対距離が近いと FRET 効率は高くなる。リングを構成する AAA2 ドメイン内に BFP, linker の N 末端に GFP を各々導入した単量体ダイニンを作製し、ダイニンに導入された BFP と GFP の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定することで、FRET 効率を算出した。既知の構

造研究を踏まえて、高 ATP 濃度と ADP-Vi (ADP-Pi 疑似) 状態では FRET 効率は~51 %と高く、linker が折れ曲がったパワーストローク前の構造を反映していると予想した。それに対し、ADP/apo/AMPPNP 状態では FRET 効率は~17 %まで低下し、linker がまっすぐに伸びたパワーストローク後の構造を反映していると予想した。さらに、ATP 濃度を変化させたところ、ATP 濃度の減少に伴い FRET 効率も低下した。ダイニン単体ではリン酸放出と ATP 結合が律速過程であると考えて、高 ATP 濃度では pre 状態 (パワーストローク前の状態) のダイニンの割合が多いため FRET 効率が高く、ATP 濃度低下に伴い apo 状態 (ヌクレオチド非結合の状態) の割合が増加することで FRET 効率が減少し、~3 μ M ATP で 2 状態の割合が半々であるというモデルを提案した。

単量体ダイニン 1 分子が運動する距離は、光ピンセットを独自に組み込んだ蛍光顕微鏡を用いて測定した。ダイニンを結合させたビーズをチャンバーのガラス表面に固定し、近赤外レーザーでトラップされた径の小さい 2 つのビーズを極性微小管の両端に結合し、この微小管をダイニンと相互作用させた。トラップビーズの 2 次元変位を同定するために、トラップビーズに斜めからレーザー照射したときの散乱光を 4 分割フォトダイオードに結像し、ビーズの位置を算出した。ダイニンが微小管と結合すると、ダイニン-微小管間働くバネ定数が加わるためにブラウン運動由来のノイズが小さくなり、そのノイズが小さくなった領域を結合領域と定義し、その領域での変位を解析した。すると、ダイニン 1 分子が微小管と結合した直後に一段階のステップ状の運動を発生し、その後解離するという結果が得られた。ステップサイズをガウス分布の累積分布関数の中心値と定義し、運動した変位 500 データ以上を取得して算出した。その結果、ステップサイズは ATP 濃度の減少に伴い、~8 nm (高 ATP 濃度) から 0 nm (apo 状態) に見かけ上減少する結果が得られた。

FRET 効率測定の結果から、変位測定により生じたダイニン 1 分子の微小管結合に伴うステップ運動について、高 ATP 濃度では pre 状態のダイニンは微小管と結合して~8 nm 運動し、ATP 濃度低下に伴い apo 状態のダイニンが微小管に結合する割合が増加するため運動変位が 0 nm に減少し、~13 μ M ATP で pre, apo 状態のダイニンが微小管に結合する割合が半々であるというモデルで説明できた。したがって、生体内と同程度の高 ATP 濃度では、単量体ダイニンは微小管に結合し、微小管マイナス端方向に~8 nm 運動するといえる。

単量体ダイニンの運動変位~8 nm が、linker のスイングにより引き起こされていることを確認するために、linker のスイングが阻害された変異ダイニンを用いて、FRET 効率と 1 分子運動変位を測定した。実験に用いた変異ダイニンは、linker とリング間で相互作用する AAA2 ドメイン内の 2 本の β ループを削ったことで、運動活性を失い、ヌクレオチド状態に関わらず FRET 効率が低く変化しないことから、linker がスイングできなくなったと変異ダイニンであると考えた。この変異ダイニン 1 分子が微小管を運動させる距離を測定した結

果、ほぼ 0 nm であった。したがって、パワーストロークしないダイニンは微小管を運動させないことから、linker のスイングが、~8 nm の運動を生み出す重要な構造変化であることが示唆された。

本研究において、ダイニンモータードメイン単量体 1 分子が微小管上を ATP 存在下で運動する様子を観察することに初めて成功し、ATP 濃度が減少するとステップサイズが見かけ上~8 nm から 0 nm に減少することを化学反応モデルに基づいて説明できた。さらに、生理的条件である高 ATP 濃度では、ダイニン単量体がパワーストロークにより運動するステップサイズは~8 nm であると導けた。よって、ダイニン linker のパワーストロークによる~8 nm の変位は、ダイニンが二足歩行運動する際の歩幅 8.2 nm に近い値であり、~8 nm の運動変位でダイニン二量体の運動を担うことができると考えられる。

本論文は 5 章からなり、構成は次の通りである。第 1 章では、本研究の研究背景、目的、概要を述べた。第 2 章では、タンパク質の調製方法と測定方法を説明した。第 3 章で精製したダイニンの性質を示す実験結果、FRET 法を用いた構造変化の ATP 濃度依存性、単量体ダイニン 1 分子が微小管に結合した後に起こる変位の ATP 濃度依存性について述べた。第 4 章では、ATP 濃度依存性を中心に考察し、二足歩行モデルを提案した。第 5 章では、本論文のまとめを述べた。