

論文の内容の要旨

論文題目

細胞質ダイニンの制御機構に関する研究

Studies on Regulatory Mechanism of Cytoplasmic Dynein

氏名 鳥澤 嵩征

細胞質ダイニンは、ATPの加水分解に伴う化学エネルギーを利用して細胞骨格・微小管の上をマイナス端方向に運動するタンパク質であり、その役割はオルガネラやRNAの細胞内での輸送や、有糸分裂時の紡錘体の配置や染色体分離、神経上皮における細胞運動など、非常に多岐にわたっている。このような多様な役割を単一のタンパク質によって担っていることは、同じく微小管上を運動するキネシンが機能や役割に応じて様々な種類に分かれていることと著しい対照をなしている。1種類のダイニンが細胞内での場所や細胞周期に応じて適切な機能を発現するために、様々な種類の制御タンパク質が存在していることが知られており、代表的なものとしてダイナクチンやLIS1およびNDEL1、Bicaudal Dといったものが挙げられる。これらのタンパク質はダイニンと輸送体とのアダプターとして働いたり、力応答性や運動速度などのダイニンの性質を直接制御する働きを有していることが分かってきている。本論文では、細胞質ダイニンが多様な役割を担う分子機構を明らかにするため、第1章ではダイニン分子がその置かれている状況に応じてどのように振舞いを変化させるかを調べた。その上で第2章では、LIS1とNDEL1という制御タンパク質によってさらにどのように運動機能が制御されるかを研究した。

第1章 細胞質ダイニンの自己制御について

細胞質ダイニンの運動メカニズムに関しては、出芽酵母のダイニンを用いた種々の研究から多くの知見が得られており、統一的な描像の確立に向けて着実に研究が進んでいる。しかしながら、哺乳類のダイニンを用いた観察においては、様々なグループから異なる振る舞いについての報告がなされており、かつどの報告も酵母ダイニンの振る舞い、また細胞内におけるダイニンの運動と質的に異なったものであるという混乱が生じている。具体的には、微小管上での振る舞いとして一方向に運動するという報告と両方向に運動するという報告が混在しており、また一方向に運動する報告に関しても、細胞内で見られている輸送速度との間に齟齬を生じている。このような混乱が生じる背景には、研究に用いられているダイニンの由来、およびダイニンの運動を観察するためのプローブなどがグループ間で異なっており、また哺乳類のダイニンに関しては組換え体の発現系の確立が遅れていたという事情からダイニンの直接標識による運動観察がなされていなかったという現状が存在している。これらの混乱を解消し、またダイニンの一分子の運動を明確に特徴づけることで細胞内での多様な役割の詳細な機構の理解の基礎を築くことを目指し、組換え細胞質ダイニンを用いた運動観察および形態観察を行った。

HEK293 細胞を用いて細胞質ダイニンの組換え体を作製し、運動観察および形態観察を行ったところ、ダイニンにはある種の自己制御機構が存在していることが明らかになった。すなわち、単独で存在しているダイニン分子においては、2つの頭部ドメインが積み重なったような"スタック構造"が形成されており、この構造においてダイニンは自己阻害的に弱結合状態を安定化させ、微小管上を拡散的に運動するということが示された。さらに、ダイニンにはキネシンなど異なる力学応答性が備わっていることも分かった。具体的には、弱結合状態にあるダイニンに外力が加えられると、強結合に遷移する確立が上昇するという性質や、力が及ぼされる向きによって結合力を変化させるラチェットの性質を持っていることが明らかとなった。このような力学応答性を備えていることによって、多分子化などに伴う外力によって力学的摂動が加えられると強結合状態が誘起されるのに伴って自己阻害状態が解除され、また後方への拡散が抑えられることで、細胞内で見られているような安定した輸送が達成されるという描像を確立することができた(図1)。

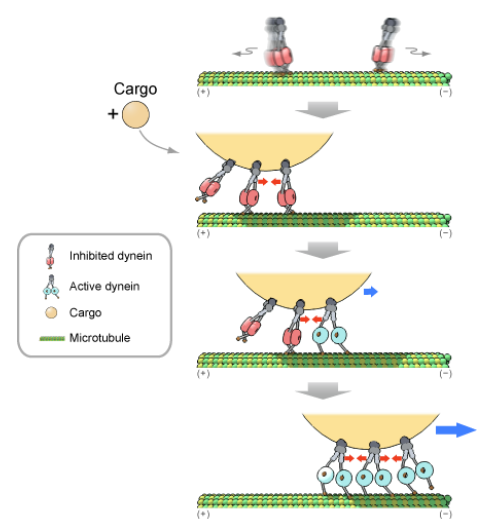


図1 ダイニンの自己制御のモデル

第2章 LIS1 および NDEL1 による細胞質ダイニンの運動制御機構

先述のように、LIS1 および NDEL1 というタンパク質は細胞質ダイニンの制御タンパク質として知られているタンパク質であり、ダイニンが関係する現象の一部には往々にして両者が共に関与している。具体的には、細胞の移動、核の配置、および細胞分裂前における核膜の崩壊などにおいて両者が働いてダイニンの機能を制御していることが確認されている。また、再構成系における実験においても LIS1 と NDEL1 が細胞質ダイニンの運動を制御することは複数のグループによって確認されている。微小管滑り運動実験においては、LIS1 はダイニンによる微小管の滑り運動を阻害し、NDEL1 はダイニンを微小管から解離させる働きをすることが分かっている。さらに、両者が同時にダイニンに作用する場合には運動性が回復することが分かっており、生化学実験でも同様の効果が観察されている。しかしながら、制御の具体的な分子機構についての知見は未だ少なく、LIS1 と NDEL1 が関与している多様な現象に対して分子レベルから統一的に説明可能な描像は得られていない。

本研究では、制御機構の詳細を解明することで細胞レベルで起こっている現象をタンパク質分子のレベルから基礎づけることを目標として、LIS1 と NDEL1 分子の機能領域と推定される部分を切り分けた断片を作製し、再構成系における運動観察および生化学実験を行った。具体的には、LIS1 および NDEL1 の機能領域と推定されている部位毎の断片を作製して、それらのダイニンの運動への影響を観察することで、機能領域の特徴付けとダイニン、LIS1、NDEL1 の3つのタンパク質の間の分子間相互作用の詳細の解明を目指した。

LIS1 については二量体化を担っていると推定されていた N 末側領域を除いた断片 (Δ N-LIS1) を作製し、取り除いた N 末側領域が二量体化に必須であること、さらに LIS1 の制御機能において二量体化が重要であるという結果を得た。また単量体化した切断断片の N 末側に GST を付加することで人工的に二量体化させた組み換え体 (GST- Δ N-LIS1) を用いた実験を行ったところ、人工的であっても二量体化さえしていれば LIS1 は制御機能を発揮することが出来るということが示した (図 2. B)。NDEL1 については、N 末側領域に LIS1 結合部位、C 末側領域にダイニン結合部位を保持していることが分かっているので、どちらか一方だけを含ま 2 種類の断片を作製し、ダイニンに対する影響を観察した。その結果、ダイニンを微小管から解離させるという機

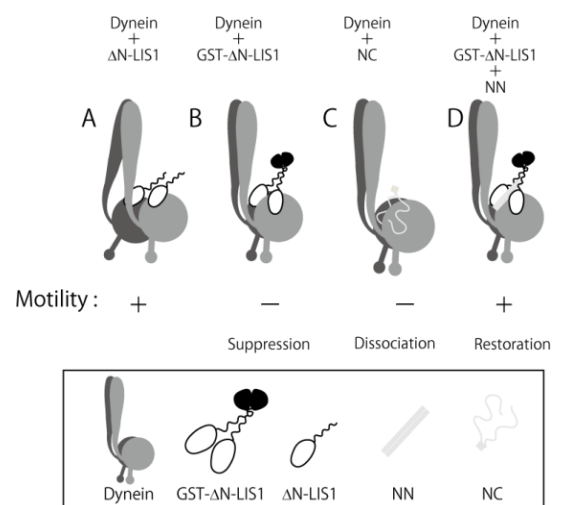


図 2 LIS1 と NDEL1 による制御のモデル

能はC末側に局在し(図2.C), LIS1によって阻害されているダイニンの運動を回復させるという機能はN末側に局在している(図2.D)ということが分かった. さらに, LIS1による阻害の回復は, NDEL1がダイニンではなくLIS1に作用することで起こるという結果も得られた. また, 阻害の回復には上述のLIS1内で本来の二量体化を担っている部位は必須ではないことも分かった. 以上の結果を総合することでLIS1とNDEL1の各機能領域のダイニンの制御機能における役割と, ダイニン, LIS1, NDEL1の3者の細かい相互作用の関係について新たな知見を得ることができた.

第1章の結果からは, 負荷や複合体化によって運動が変化するという自己制御機構をダイニンが備えていることが分かり, そのような自己制御的に振舞いを変化させるという性質の上に, 第2章で研究したLIS1, NDEL1といったものに代表される制御タンパク質による制御機構が存在しているという描像が得られた. また, 制御タンパク質による制御機構においても, 各タンパク質による制御の効果の上に, それらが組み合わさってダイニンと相互作用することで, 単独の場合とは異なる制御が現れる機構も存在していることが明らかとなった. 本研究で明らかとなったこれらの結果は, ダイニンの運動機能制御における階層性(ダイニン単体→制御タンパク質による制御→制御タンパク質の組み合わせによる制御)を明示的に考える観点から, 多様な場面とタイミングでそれに応じた機能を担うダイニンというタンパク質を統御する仕組みを考察する上で, 重要であるというを示しているものと考えられる. また, これまでのダイニンの運動観察においては, TIRFMによる1分子の観察と微小管滑り運動実験などによる多分子の挙動の観察の中間の分子数の領域で起こる現象を, 分子数が厳密に制御された状況下で調べることは技術的に難しく, 複数分子のダイニンによる協調の問題にはなかなかアクセスできなかった. 一方で, 実際の生体内でダイニンが関与しているオルガネラなどの輸送に代表される現象は, まさにこの中間領域である少数分子による協同現象が支配的である可能性が高く, これからのダイニンの研究においては, この少数分子の領域で起こる現象のメカニズムを知ることが重要であると考えられる. 本論文の第1章で用いられた分子数やその配置を制御できる実験技術によって, 少数分子による協同現象について, またそのような状況下において制御タンパク質から受ける影響に関して, さらに詳細な分子機構についての知見を得られることが期待される.