

審査の結果の要旨

氏名 宝田 理

細胞質ダイニンの微小管親和性制御機構の解明と題する本論文は、細胞質ダイニンの微小管結合ドメイン(Microtubule-binding domain : MTBD)が微小管と強く結合する状態と弱く結合する状態の二状態の構造の違いを、NMR を用いて立体構造を決定することによって明らかとし、微小管と MTBD の複合体構造を低温電子顕微鏡と NMR から得られた構造情報を組み合わせることによって解析した成果を述べたものである。本論文は、全 4 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に結果と考察、第 3 章に総括と今後の展望、第 4 章に実験材料と実験方法が記されている。

第 2 章においては、まず、コイルドコイル鎖間に S-S 結合を導入することによって親和性を高い状態、低い状態に制御した、酵母由来の MTBD である MTBD-High、MTBD-Low の調製を行っている。次に調製した MTBD-High と MTBD-Low の立体構造決定を行い、両者の構造の比較を行っている。最後に、低温電子顕微鏡と NMR を組み合わせた MTBD-High と微小管の複合体構造の解析を行っており、MTBD-High、MTBD-Low の構造の違いと合わせて細胞質ダイニンの MTBD における微小管親和性制御メカニズムについて考察を行っている。

細胞質ダイニンは、ATP のエネルギーを利用して微小管上を+端から一端にむかって歩行運動する微小管モータータンパク質であり、神経細胞中の小胞輸送など様々な分子の輸送機能を担っている。ダイニンの主な機能を担うダイニン重鎖は、小胞などの結合を担うステム領域と、リング状の ATPase ドメイン、そして微小管結合ドメイン(MTBD)を含むストークから構成されている。MTBD の微小管親和性は ATPase ドメインの ATP 結合状態によって制御されており、ATP 結合状態では低親和性状態を、ATP が結合していない状態では高親和性状態を形成することが明らかとなっている。MTBD と ATPase ドメインは逆平行のコイルドコイル鎖 CC1, CC2 で連結されており、コイルドコイル鎖の会合状態が変化することによって MTBD の微小管親和性が変化することが示されている。これまでに、低親和性状態を反映した MTBD の構造は明らかとなっているものの、高親和性状態を反映した MTBD の構造は不明である。これに対し、本論文ではコイルドコイル鎖に S-S 結合を導入することによってコイルドコイル鎖の会合状態を変化させて、微小管親和性を制御した MTBD-High、MTBD-Low コンストラクトを構築し、各親和性状態の構造の違いを明らかとされていた。決定した両者の構造の比較を行ったところ、全体構造は類似していたものの、

CC1 と CC2 の相対配置が変化しており、CC1 に連結した H1 の構造が MTBD-High で傾いて前方に突出していることを示していた。次に、MTBD-High と MTBD-Low の TCS 実験を行い、各親和性状態の MTBD の微小管結合界面の同定を試みていた。その結果、MTBD を構成する 6 本のヘリックスのうち H3 が、MTBD-High でのみ結合に関与していることを明らかとしていた。続いて、NMR から得られた結合界面の情報と低温電子顕微鏡解析から明らかとした分解能 13Å の MTBD-High-微小管複合体密度マップの情報を組み合わせることによって、MTBD と微小管の複合体構造を明らかとすることを試みていた。その結果、TCS 実験、全体構造の密度マップ両者をもとに満たす複合体構造モデルを取得することに成功していた。この複合体構造中において、MTBD と微小管は複数箇所塩橋を形成していた。この相互作用を実験的に明示するために、MTBD-High の極性残基に変異導入した変異体の親和性解析、構造解析を行っていた。その結果、相互作用に関与したすべての極性残基への変異導入によって微小管親和性が低下したことから、複数箇所塩橋が同時に形成されることが、MTBD が高親和性状態へ移行するために重要であることを明らかとしていた。最後に、MTBD-High と MTBD-Low で観測された H1 の構造の変化が、複数箇所での塩橋形成に重要であることを、MTBD-High-微小管複合体構造と MTBD-Low の構造を比較することによって示していた。

本研究では、これまで解析が困難であった高親和性状態の MTBD の立体構造、および微小管複合体構造を明らかとした。その結果、MTBD のわずかな立体構造の変化によって、複数箇所での塩橋が同時に形成されることによって MTBD は高親和性状態に移行することができるという構造基盤を提唱している。

以上、本研究の成果は、細胞質ダイニンの微小管親和性制御メカニズムに対して新たな知見を加えるものであり、これを行った学位申請者は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。