

論文の内容の要旨

論文題目

ダイニン複合体のサブユニット分子構築の研究 Studies on Subunit Architecture of Dynein Complex

氏名 市川 宗巖

真核生物では、高度に組織化された細胞骨格系と、細胞骨格上で ATP 加水分解に伴う構造変化を用いて力発生するモータータンパク質が存在し、効率的な輸送や、細胞や組織の秩序形成に関与している。本研究では、微小管骨格上で力発生するダイニンに着目した。ダイニンは、細胞内での機能によって細胞質ダイニンと軸糸ダイニンに分類される。他のモータータンパク質のキネシン・ミオシンについてはその運動機構についての詳細が明らかとなってきたのに対し、ダイニンの運動機構や制御機構は未だ十分には理解されていない。これは、ダイニン重鎖 HC が~500 kDa と巨大であり、その組換え体の発現系はこれまで細胞性粘菌や酵母の細胞質ダイニンに限られていたためであった。また、細胞質ダイニン・軸糸ダイニンともに、HC 以外のサブユニットとともに巨大なタンパク質複合体を形成しているが、このサブユニット構造が明らかとなっていないこともダイニンの制御機構を理解することの妨げとなっていた。本研究では、組換え体としてダイニン複合体を精製することのできる系を構築し、その性質、特にそのサブユニット構造を明らかとすることを目的とした。第 1 章では軸糸ダイニン複体内での軽鎖 LC1 の局在と機能について、第 2 章では、細胞質ダイニン尾部のサブユニット構造について調べた。

第1章 外腕ダイニンにおける軽鎖 LC1 の局在と調節機構

軸系ダイニンのうちの外腕ダイニンは繊毛/鞭毛打を引き起こす主要なモータータンパク質である。外腕ダイニン複合体は3種類の重鎖(α , β , γ HC), 2種類の間鎖(IC), 多くの軽鎖(LC)から構成されたタンパク質複合体であり、 α , β , γ HC それぞれの頭部ドメインが、尾部ドメインで束ねられた三頭構造をとっている。IC とほとんどの LC は尾部ドメインに結合するが、LC1 のみが γ 重鎖の頭部ドメインに結合する。LC1 は外腕ダイニン複合体の活性を制御する重要なサブユニットであるが、その制御機構は不明であった。これは、LC1 が頭部ドメイン内のどこに結合するのかが明らかとなっていなかったためであった。そこで、外腕ダイニン複体内での LC1 の結合の実体を明らかとし、その機能についての知見を得ることを目的とした。

まず、外腕ダイニン複体内の LC1 を直接標識して電子顕微鏡観察を行うため、テトラヒメナにおいて LC1 の C 末に hsGFP タグ(ループ部分に金粒子標識用 His タグが挿入された GFP タグ)を相同組み換えで付加した。LC1-hsGFP を含む外腕ダイニン複合体を精製し、His タグを Ni-NTA ナノゴールドで標識し、電子顕微鏡観察したところ、ストーク上に金粒子が結合し、LC1 がストーク上に存在していることが分かった(図 1a)。また、三頭のうち一頭のストーク先端の微小管結合ドメイン(MTBD)に LC1 に対応すると考えられる構造体(ストーク上構造)が見出された。さらに、クラミドモナスで N 末または C 末に His タグを付加した LC1 を発現し、外腕ダイニン複合体を精製して Ni-NTA ナノ金粒子標識を行ったところ、N 末側を標識した場合は、ストーク上構造の先端側が、C 末側を標識した場合は、ストーク上構造の基部側がそれぞれ金粒子標識された。

ストークと LC1 の結合を生化学実験でも検証したところ、LC1 は α , β , γ ストークのうち γ ストークのみにモル比 1:1 で結合することが分かった。また、 γ ストーク配列と β ストーク配列のキメラコンストラクトを用いて LC1 結合領域をマッピングしたところ、 γ ストーク先端の MTBD 領域のみで LC1 結合には十分であることが分かった。さらに、 γ ストークの微小管結合に対する LC1 の影響を微小管共沈実験によって調べたところ、 γ ストーク単独のときに比べて LC1- γ ストーク複合体では、微小管に対するアフィニティーが下がることが分かった。

上記の結果をまとめた LC1 の結合のモデルが図 1b である。本研究によって、一分子の LC1 が N 末を先端側に、C 末を基部側に向けて、 γ 重鎖 MTBD 領域に結合することが分かった。先行研究のモデルでは、LC1 は AAA+リングに結合すると考えられていたため、AAA+リングから距離的に近い軸系ダブレット微小管 A 小管に結合していると考えられていたが、本研究の結果を踏まえると、LC1 は γ MTBD とともに軸系ダブレット微小管 B 小管に結合していると考えられる。また、LC1 が γ ストークの微小管へのアフィニティーを

下げるという結果から、LC1が γ MTBDの微小管へのアフィニティーを変化させることで外腕ダイニンの活性を制御している可能性が示唆された。

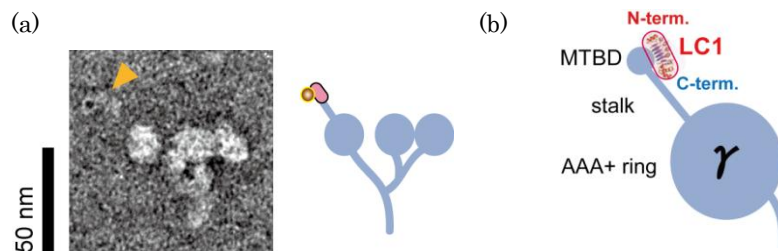


図 1 (a) 金粒子標識による LC1 の位置同定
(b) LC1 の結合様式モデル

第 2 章 細胞質ダイニン複合体の構造解析

細胞質ダイニンは、軸糸構造に組み込まれている軸糸ダイニンとは異なり、輸送するカーゴと結合し、微小管上を歩行するタイプのダイニンである。細胞質内で働くダイニン 1 と繊毛・鞭毛内での輸送に関わるダイニン 2 が存在している。これらの構造と機能を調べるために、まず、HEK293 細胞を用いて、これまで得られていなかったヒトダイニン 1HC 全長・ヒトダイニン 2HC 全長の発現系を構築することで、その性質を調べた。精製された組換え体ダイニン 1HC 全長、ダイニン 2HC 全長はどちらも *in vitro* での運動活性を有していた。電子顕微鏡観察で組換え体ダイニン 1 複合体は、内在性のブタ脳ダイニン 1 複合体と同等の分子形態を示した。また、ダイニン 2 もダイニン 1 同様に二頭構造をとることが分かった。これは、ヒトダイニン 1HC 発現系を初めて構築した結果であるだけでなく、これまでどの生物種でも明らかとなっていなかったダイニン 2 の *in vitro* での性質を初めて示した結果である。

次に、積荷分子や、ダイナクチン、Ndel などの制御タンパク質との結合の足場となるダイニン 1 複合体の尾部ドメインの構築について調べた。ダイニン 1 複合体を電子顕微鏡観察し、尾部ドメインについて単粒子解析を行ったところ、ダイニン 1 複合体の尾部ドメインは 3 つのサブドメインから構成されていることが明らかとなった。さらに、尾部ドメインに存在するサブユニットの HC, IC, 中間軽鎖(LIC), LC (TcTex1, LC8, RB)の N 末または C 末に His-tag を導入し、Ni-NTA ナノゴールドによる標識を行うことで、尾部ドメイン内でのサブユニットの位置同定を行った。その結果、ダイニン 1 複合体の

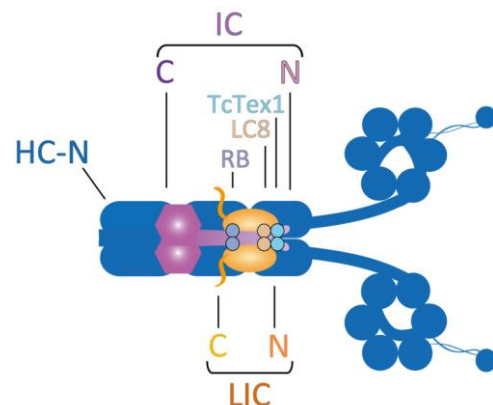


図 2
ダイニン 1 複合体のサブユニット構造モデル

尾部は、図 2 に示すようなサブユニット構造をとっていることが明らかとなった。これまでのダイニン 1 複合体の尾部サブユニット構造の推定モデルでは、IC は N 末を尾部末端側、C 末を頭部側に向けて結合していると考えられてきたが、本研究で得られた結果から、IC の向きは先行研究の推定モデルとは逆向きであることが分かった。このモデルのようにサブユニットが尾部ドメイン内に存在すると、IC の N 末や LC8 に結合するダイナクチンや Ndel などの制御タンパク質は、尾部ドメインの中の頭部ドメインに近い領域に結合すると考えられる。これらの制御タンパク質が尾部ドメイン内の頭部に近い領域に結合することでその活性を制御している可能性が示唆された。

総括

本研究では、主に、電子顕微鏡観察を用いて、外腕ダイニン複合体および細胞質ダイニンのサブユニットの分子構築を調べた。この過程で、軸系ダイニンおよび細胞質ダイニンの組換え体の発現系をそれぞれ構築した。これらの発現系は、これまで酵母や細胞性粘菌に限られていたダイニン重鎖の発現系の枠組みを広げ、組換え体を用いたダイニンの研究の可能性を拓いたものである。今後、これらの発現系を用いて、重鎖に変異を入れた組換え体ダイニン複合体を精製し、*in vitro* での運動活性を調べることでその運動機構を調べることも可能である。

本研究において、Ni-NTA ナノ金粒子標識・単粒子解析と組み合わせた解析を行うことで、外腕ダイニン複合体では、LC1 が γ 重鎖の MTBD 領域に結合することを明らかにした。LC1 についてはこれまで外腕ダイニン複合体の運動を制御することが知られていたが、その機構については明らかとなっていなかった。本研究で得られた構造的基盤から、LC1 が γ MTBD の微小管へのアフィニティーを変化させる可能性が示唆され、生化学的手法によってこのモデルが正しかったことも確認できた。また、細胞質ダイニン 1 尾部のサブドメイン構造と、サブユニットの対応を明らかとすることができた。その結果、制御タンパク質が結合する領域が尾部の中の頭部モータードメインに近い領域に結合することが明らかとなった。以上のように、Ni-NTA ナノ金粒子による標識は、ダイニンのような巨大な複合体中でのサブユニットの位置同定に有用であった。また、本研究において、ダイニン複合体中のサブユニットの分子構築を示し、ダイニン制御機構を明らかにする上で重要な構造的基盤を提示することができたことは意義深い。今後、Ni-NTA ナノ金粒子標識や単粒子解析などの手法を応用することで、さらに、ダイニン 1-ダイナクチン複合体のような、制御タンパク質とダイニンとの複合体の分子構築を明らかとし、ダイニンの運動制御機構の詳細について明らかとすることも可能であろう。