B305

LIS1、Nudel タンパク質による細胞質ダイニンの *in vitro* 運動活性の制御

○鳥羽 栞¹、佐々木 慎二²、徳岡 涼美³、清水 孝雄³、広常 真治⁴、豊島 陽子¹ (¹ 東京大・院・総合文化・生命環境科学、² 慶應大・医・解剖、³ 東京大・院・医・分子細胞生物・生化学分子生物、⁴ 大阪市大・医・細胞機能制御)

ヒト滑脳症原因遺伝子の産物である LIS1 は、細胞質ダイニンに相互作用し、このタンパク質の異常は、細胞質ダイニン依存の細胞機能に重大な障害を引き起こすことが示されている。また、Nudel は LIS1 のエフェクターと考えられており、細胞質ダイニンに結合する。このタンパク質の異常も、LIS1 同様に細胞質ダイニン依存の輸送に障害を与える。このように細胞内で LIS1、Nudel の細胞質ダイニンの活性の制御機構があると予想されているが、LIS1、Nudel、細胞質ダイニン 3 者の *in vitro* での相互作用や、活性への影響はほとんど明らかでない。今回、LIS1、Nudel が *in vitro* で細胞質ダイニンのモーター活性へ与える影響を調べた結果、エフェクタータンパク質による細胞質ダイニンのモーター活性の制御を初めて観察することができた。

昆虫細胞で発現させたヒト LIS1 とヒト Nudel を精製した。細胞質ダイニンはブタ脳から精製し、内在性の LIS1、Nudel、ダイナクチンが結合していないことを確認した。LIS1 が相互作用した細胞質ダイニンは ATPase 活性の変化はなかったが、微小管が結合したままで、gliding を行えなかった。Nudel も ATPase 活性の変化はなかったが、微小管がほとんど結合できなかった。しかし、LIS1 と Nudel が相互作用したダイニンは、ATPase が上昇し、微小管 gliding を行った。これらの結果から、LIS1、Nudel とともに ATPase 活性は阻害しないが、単独では細胞質ダイニンのモーター活性を阻害すること、両者が相互作用することによって、細胞質ダイニンの微小管すべり運動を可能にすることが示された。このようなメカニズムによって LIS1、Nudel が細胞質ダイニンのモーター活性を制御し、ひいては細胞内輸送の制御を行っているものと推察される。

S.Toba, S.Sasaki, S.M.Tokuoka, T.Shimizu, S.Hirotsune and Y.Y.Toyoshima : *in vitro* motility of Cytoplasmic Dynein Regulated by LIS1 and Nudel proteins

B307

テトラヒメナ外腕ダイニンサブユニットの性質

○須藤 美樹、豊島 陽子 (東大院・総合文化・生命)

ダイニンは巨大で複雑な構造を持ち、ミオシン、キネシンなどと大きく異なっている。テトラヒメナ軸系外腕ダイニンは α 、 β 、 γ の 3 つの異なる重鎖からなる 3 頭構造をした複合体で、運動における 3 つの頭部間の相互作用はほとんどわかっていない。この運動メカニズムを解明するために、3 つのモータードメインを分離し各々の性質を明らかにする必要がある。これまでに単頭 α サブユニットと 2 頭 $\beta\gamma$ サブユニットの分離は可能になっており、 $\beta\gamma$ サブユニットは運動活性を有することがわかっているが、 α サブユニットは運動活性が確認されていない。本研究では、特に単頭 α サブユニットの運動活性に着目し、その性質を明らかにすることで 3 頭構造の意義を明らかにすることを目的とした。

in vitro motility assay の実験系を検討し、今まで示されていなかった単頭 α サブユニットの運動活性を示すことに成功した。 α サブユニットの滑り運動速度は、 $\beta\gamma$ サブユニットの約 2 倍で、外腕ダイニンは両者の中間の速度であった。このことから、 α サブユニットは外腕ダイニン複合体においても運動活性を有することが示唆された。また、単頭あたりの ATPase 活性は α サブユニット、 $\beta\gamma$ サブユニット、外腕ダイニン複合体においてはほぼ同等の活性を示していた。ATPase 活性と運動活性の相関についても今後調べていく予定である。さらに、これらの活性の ADP による影響について調べたところ、ADP は ATPase 活性、運動活性において ATP に対して競争阻害的に働いていることがわかった。これは内腕 α ダイニンで報告されている制御 (Shiroguchi and Toyoshima, 2001) とは異なっていた。

M.Sutoh and Y.Y.Toyoshima : Properties of outer arm dynein sub-units from *Tetrahymena* cilia

B306

軸系ダイニンへの ATP 安定結合の解析

○井上 裕一¹、大岩 和弘²、真行寺 千佳子¹ (¹ 東大院・理学系・生物科学、² 通総研・生体物性)

ダイニン重鎖には 4 つの ATP 結合部位があり、その中の一つで加水分解がおけると考えられている。ATP は他の結合部位にも結合し、運動のエネルギー源としてだけでなく、運動活性を調節するシグナルとして使われている可能性が示唆されている。昨年、我々はダイニン分子に結合する蛍光 ATP の 1 分子観察によって、蛍光 ATP が加水分解に伴うと思われる 1 秒程度の速い相互作用だけでなく、1 分以上安定に結合することを報告した。この安定結合について、さらに解析した結果を報告する。

ウニ精子鞭毛の外腕ダイニンをガラス上に固定し、Cy3-ATP (5nM) の結合過程を調べたところ、速い相互作用より安定な結合が優位に観察され、1 分程度で安定結合のみが観察されるようになった。その後、解離過程を観察するため、反応開始 5 分後に Cy3-ATP を含まない溶液で置き換えると、安定結合のスポットが数分に渡って減少した。ビデオ解析より、安定結合の解離定数と結合定数は、それぞれ 0.0053s^{-1} 、 $1.1 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と見積もられた。安定結合の ATP 濃度依存性を調べるために、1mM ATP 存在下で、結合過程と解離過程を独立に観察したところ、解離定数に大きな変化は見られなかったが (~ 1.3 倍)、結合過程では速い相互作用のみが観察された (0.37s^{-1})。

さらに、安定結合が通常の ATP でも起こるかを検討するため、ダイニンを 1mM ATP でインキュベートし、蛍光 ATP のみの溶液と置き換えた。この結果、蛍光 ATP の結合は ATP の解離のために約 6 倍遅くなり、ATP も蛍光 ATP と同様に十分小さい解離定数をもつことが示唆された。

以上より、生理的条件を含む広範囲な ATP 濃度において、ダイニンは ATP 加水分解以外にも、安定した結合を行い、数分オーダーでターンオーバーしていることが示唆された。

Y.Inoue, K.Oiwa and C.Shingyoji : Analysis of the binding of fluorescent ATP analogues to axonemal dynein molecules

B308

活性化した低分子量 G タンパク質 Rac の細胞膜へのリクルート：1 分子可視化による解析

○永井 理恵¹、小林 剛²、村上 瑞奈¹、川崎 拓実¹、武田 美江²、楠見 明弘^{1,2} (¹ 名大院理、² 科技団・ERATO)

アクチン細胞骨格の再編成などに関わる低分子量 G タンパク質の一つである Rac には、RhoGDI が Rac の活性化状態にかかわらず結合しており、エフェクターとの結合を阻害している。この結合は Rac の疎水脂質鎖に依存しており、RhoGDI への結合と細胞膜への結合は競合している。従って活性化された Rac は RhoGDI から細胞膜に移行して初めて Pak などのエフェクター分子に結合することができる。すなわち、Rac とエフェクターとの相互作用の場は細胞膜である可能性が高い。このような相互作用を可視化するための第一歩として、本研究では Rac の細胞膜へのリクルートの様子と、そこでの動態を 1 分子可視化した。N 末端に GFP を融合した Rac1 を発現させた HeLa 細胞では、定常状態で $0.17 \text{個/s}/\mu\text{m}^2$ の GFP-Rac1 が細胞膜上にリクルートされた。LPA 刺激をすると、リクルートされる GFP-Rac1 の数は一過的に増加し、刺激 2 分後には約 2 倍に増加した。これは、生化学的バルクアッセイによる Rac 活性化のタイムコースとよく似ているので、Rac 活性化と膜へのリクルートとの相関は現在 1 分子法で検討中である。GFP-Rac1 の細胞膜上での滞在時間は 1 秒以下と短かった。これは、Rac が細胞膜上でエフェクターを活性化する時間は極めて限られている可能性、細胞膜は Rac が RhoGDI をはずす部位であって、その後活性化 Rac は膜からはずれ、他の部位へと移行してエフェクターと相互作用する可能性などを示唆する。また、細胞膜に滞在中の GFP-Rac 1 のうち、約 3 分の 2 は膜上で静止しており、残りの拡散している Rac の拡散係数は中央値で $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。静止している Rac は細胞膜上またはその近傍でアクチンを主成分とする膜骨格や細胞骨格に結合していると考えられる。

R.Nagai, T.Kobayashi, M.Murakami, T.Kawasaki, Y.Takeda, A.Kusumi : Single molecule imaging of activated small G protein Rac on the plasma membrane