B493

遺伝子組み換え型細胞質ダイニンを用いたATP結合部位の機能解析

○昆 隆英、西浦 昌哉、大倉 玲子、豊島 陽子、須藤 和夫（東大院・総文・生命環境）

ダイニンは微小管上をマイナス端方向に運動する分子モーターで、AAA+ファミリーに属することから、Ras型モーターであるミオシンやキネシンとは異なったメカニズムで運動活性を発揮していることが予想される。実際、ダイニンにはヌクレオチド結合モチーフである4つのPループ、バレル状の構造を形成する6つのAAAドメイン、微小管と結合すると思われるストーク、2量体化や他のサブユニットとの結合に関与するステムといった、他の分子モーターには見られない特徴的配列・構造が存在する。しかし、これらの配列・構造がダイニンの運動活性に対してどのような寄与をするのかは現時点では推測の域を出ていない。

本研究では構造機能相関のアプローチによりダイニンの研究を進めるために、まず細胞性粘菌を用いた遺伝子組み換え型ダイニンの発現精製系の構築を行った。これまでの発現系では変異を導入したダイニンを得ることは困難な場合が多かったが、誘導系による一過的発現法を用いることで、Pループ、ステム、ストークなどに変異を導入したダイニンを発現・精製することが可能となった。

この系を用いて発現したPループ変異ダイニンの微小管への結合能およびATPによる解離能を検討したところ、いずれの変異ダイニンも野生型とは異なる挙動を示すことが明らかになった。この結果は4つのPループ全てがダイニンの微小管への結合解離に機能を果たすことを示唆している。現在、これら変異ダイニンの微小管への結合能、ATP加水分解活性、運動活性の詳細な検討を行っており、本会で報告する予定である。

T. Kon, M. Nishiura, R. Ohkura, Y. Y. Toyoshima, K. Sutoh : Mutational analysis of P-loops in cytoplasmic dynein

B495

細胞質ダイニンモータードメインの運動機能解析

○西浦 昌哉¹、昆 隆英¹、城口 克之²、大倉 玲子¹、豊島 陽子¹、須藤 和夫¹（¹東大院・総合文化・生命、²岡崎・統合バイオ）

細胞質ダイニンは真核細胞に存在し、ATPからADPへの加水分解により生じるエネルギーを利用して、細胞質中の微小管上を動くモータータンパク質である。

細胞質ダイニンは、ATPを加水分解し微小管と相互作用する重鎖のほか、軽鎖、軽中間鎖、中間鎖などのサブユニットより構成される、巨大な複合体タンパク質である。また重鎖は、ホモ二量体を形成している。重鎖の一次配列におけるC末端側約3分の2の領域には、中空なバレル形をしたモータードメインが含まれ、その中には6つのAAAモチーフ、ストークと呼ばれる微小管との相互作用部位、4つのP-loopなど、ダイニンに特徴的な構造も含まれている。また、この領域のみを発現させると、単量体として発現し、ATP依存的に微小管に結合、解離することが明らかとなっている。しかし、重鎖のモータードメインのみで、滑り運動能が維持されているのか、あるいは滑り運動能を持つ最小の領域がどこまでなのかは、まだ解明されていない。

本研究では、まず細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*を用いて、ダイニン重鎖の大量発現系を構築した。次に重鎖の一次配列上のC末端側約3分の2、分子量380kDaの部分を発現および精製した。得られた精製産物を用いて、ATPaseを測定したところ、微小管存在下において活性の上昇が見られた。また、*in vitro*での滑り運動を観察することに成功した。このことから細胞質ダイニンは、単量体のモータードメインのみであっても、微小管滑り運動能を保持していることが示唆された。現在、380kDaよりさらにC末端側へ短くしたコンストラクトを作製し、微小管滑り運動を維持できる最小の領域の決定を目指しており、結果は本会にて報告する予定である。

M.Nishiura, T.Kon, K.Shiroguchi, R.Ohkura, Y.Y.Toyoshima, K.Sutoh : Analysis of motile function of cytoplasmic dynein motor domain

B494

138K中間鎖のリン酸化によるクラミドモナス内腕ダイニンの構造変化

○榊原 斉、坂井 由佳子、大岩 和弘（通信総研・関西）

クラミドモナス鞭毛の内腕ダイニンは、7種類の内腕ダイニン亜種のなかで唯一2個の頭部をもつダイニンである。その138K中間鎖は生体内でカゼインキナーゼ1(CK1)によりリン酸化される。138K中間鎖がリン酸化されると鞭毛軸糸内でダイニンの滑り運動が抑制されることが示されている。この抑制機構を明かにする為、我々は138K中間鎖リン酸化によるダイニンの構造変化を負染色電子顕微鏡法で調べた。鞭毛から単離精製したダイニンをCK1- δ (Sigma)により試験管内で処理し、138K中間鎖をリン酸化した。リン酸化は、138K中間鎖のSDS-PAGEでの移動度の変化で確認した。この処理を行ったダイニン(リン酸化ダイニン)と処理をしなかったダイニンをカーボン膜上に吸着させ、酢酸ウランで負染色した。何れのダイニンでも、2つの頭部のリング構造と中央の高電子密度の穴が確認できた。2つの頭部の距離の指標としてこの穴の間隔を測定したところ、リン酸化ダイニンの方がリン酸化されてないものと比較して分子内の2個の頭部が近接する傾向にあった(リン酸化ダイニン: 18 ± 4 nm, 未処理ダイニン: 21 ± 5 nm, それぞれn=50)。これは、138K中間鎖のリン酸化によりダイニンの形態が変化し、2つの頭部の位置関係が変化する可能性を示唆する。周辺微小管の位置が3次的に束縛される鞭毛軸糸内では、リン酸化によりダイニンの形態が変化し頭部の位置が変わると、ダイニン-微小管相互作用が大きく変化することが予想され、これが滑り運動の抑制に繋がるのではないかと考えられる。一方、*in vitro*運動アッセイでは、リン酸化ダイニンとリン酸化されてないものによる微小管滑り運動に差はみられない。ガラス表面上におけるダイニン-微小管相互作用では、微小管は3次的束縛を受けないので、2つのダイニン頭部の位置関係変化がダイニン-微小管相互作用にあまり影響を与えないと考えられる。

H. Sakakibara, Y. Sakai and K. Oiwa : The conformational change of Chlamydomonas inner-arm dynein f (II dynein) by phosphorylation of IC138K.

B496

電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いた細胞質ダイニン重鎖の可視化

○齊藤 良¹、西浦 昌哉²、昆 隆英²、大倉 玲子²、須藤 和夫²、安永 卓生¹（¹九工大・情報工・生物、²東大・総合文化・生命環境）

細胞質ダイニンは分子量50万以上の2つの重鎖と複数の中間鎖、軽鎖からなる巨大な複合体で、微小管に沿って細胞小器官を輸送したり、有糸分裂に関与したりと微小管のダイナミクスに関わるモータータンパク質である。また、AAAタンパク質に属しており、頭部はリング状の構造をしていることがわかっている。これまで細胞質ダイニンは結晶構造もわかっておらず、三次元構造が電子顕微鏡により数例報告されているに過ぎない。そこで今回、ダイニンのモーター活性を産出する分子メカニズムを構造学の観点から明らかにすることを目的として、*Dictyostelium discoideum*（和名：キロタマホコリカビ）の細胞質ダイニン重鎖をATP存在下において電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いて撮影を行った。この手法は単一分子のタンパク質を直接観察することのできる構造解析手法であり、近年急速に進展している。デフォーカス（ $5 \mu\text{m} \sim 9 \mu\text{m}$ ）による像のボケを補正するために計算機上で画像処理を行ったところ、大岩博士らによって報告されているようなAAAタンパク質に共通のリング状の構造が観察することができ、そこから突き出しているストーク、ステムに対応した構造も十分に観察することができた。また、リング状の構造をした頭部の側面からの像も観察され、側面からのストークやステムの突き出している向きも決定することができたので報告する。今後は、クラスター解析によって分子の様々な向きごとに画像を分類し、クラスターごとの平均像を得ることができればおって報告したい。

R.Saito, M.Nishiura, H.Kon, R.Ohkura, K.Suto and T.Yasunaga : Visualization of cytoplasmic dynein heavy chain by electron cryo-microscopy