B497

変異体を用いた細胞質ダイニンのATP加水分解活性の解析

○高橋 良典、枝松 正樹、西井 淳子、豊島 陽子（東大院・総合文化・生命）

ダイニンは分子モーターの一種であり、そのモーター部位は6個のAAAモジュール(D1からD6)で構成されている。D1からD4には配列の相同性からヌクレオチド結合部位であると考えられているP-loop(P1からP4)がある。現在はP1が唯一のATP加水分解部位であり、P2からP4はその制御部位であると考えられているがその詳細は明らかになっていない。したがって、ATP加水分解活性を持つP-loopを特定することはダイニンの運動機構の解明につながると期待される。

2002年本年会において大腸菌で発現させたD1-4がブタ脳から精製した細胞質ダイニンとほぼ同程度の活性を持つことを示し、さらに小さな単位(D1-2、D3-4)に分けることで、P1だけではなくP3も活性を持ち得ることを示した。しかし、全長のダイニンにおいてもP3が活性を持っているかは明らかになっていない。本研究ではこのことを明らかにすることを目的とした。

ダイニンのATP加水分解活性に重要な部位としてP-loop、Walker Bなどが考えられる。そこで、D1-4をもとにしてこれらの部位を改変した変異体を作製し、そのATP加水分解活性を測定することにした。具体的にはP-loopの保存配列(GXXGXGKT/S)のGKをASに置換した変異体、Walker Bの保存配列(DEXX)のEをQに置換した変異体を作製したが、D1-4とほぼ等しい活性を持っていた。これらの変異はどちらも構造等への影響が比較的小さいと考えられるものであり、そのため活性に対する阻害効果がみられなかったと考えられる。現在、これらの変異より高い阻害効果が期待されるように改変した(Walker BのEをKにする)変異体を作製している。今後は、その変異体の活性を測定することでP3がD1-4の中でも活性を持っているのかを明らかにしていく予定である。

Y.Takahashi, M.Edamatsu, J.Watai-Nishii and Y.Y.Toyoshima : Mutational analysis of ATP hydrolysis activity in cytoplasmic dynein

B498

鞭毛内腕ダイニン運動性のADPによるゆっくりとした活性化

○菊島 健児、八木 俊樹、神谷 律（東大院・理・生物）

鞭毛運動の力発生を担っているダイニンは、複数のヌクレオチド結合サイトを有し、そのモーター活性はATPやADP濃度に対して特殊な依存性を示すことが報告されている。本実験では、*Chlamydomonas* 鞭毛内腕ダイニン a と c に着目し、*in vitro* 系の微小管滑り運動について、ヌクレオチドの及ぼす効果を解析した。ダイニン a, c ともに、分のオーダーのゆっくりとした微小管滑り速度の増加が観測された。ダイニンにおいてヌクレオチドによるこのような遅い効果が発見されたのは、これが初めてである。ダイニン a において、この速度の増加速度はADP依存性であったが、ダイニン c では、ADPによる影響は見られなかった。また、ダイニン a, c ともに高濃度のATPにより運動性が疎外される現象が観測されたが、ダイニン a では完全に運動性が阻害されるのに対して、ダイニン c においては高濃度のATP存在下でも完全に阻害されることはなかった。以上の結果から、ダイニンの運動性はATP加水分解サイト以外の複数のヌクレオチド結合サイトによって制御を受けており、その感受性はダイニンごとに異なっていることが示唆される。ヌクレオチドは、それぞれのダイニンに対して、異なる運動性制御を行うことにより、鞭毛運動の発生に関与している可能性が考えられる。

K.Kikushima, T.Yagi and R.Kamiya : Slow ADP-induced activation of motile activities in axonemal inner-arm dyneins

B499

ダイナクチンp150と微小管のin vitroでの相互作用

○染木 衣応里¹、城口 克之^{1,2}、枝松 正樹¹、豊島 陽子¹（¹東大院・総合文化・広域・生命環境、²現在：岡崎・統合バイオ）

ダイナクチンは細胞内では微小管モータータンパク質である細胞質ダイニンと複合体を形成して存在し、その機能を果たすのに必須であると考えられている。ダイナクチンの構成要素のひとつであるp150は、構成ドメインとして微小管結合ドメイン、ダイニン中間鎖結合ドメイン、およびダイナクチンArp-1結合ドメインを含んでいる。我々はp150の分子構造レベルでの機能とその機構を*in vitro*の系で検証するため、ヒトp150の微小管結合ドメインを含む、アミノ酸1-156および1-90の領域の組換えタンパク（それぞれP150N156、P150N90）を作製してその性質を調べた。

ゲルろ過より、P150N156は35kD、P150N90は10kDあたりにピークを示した。また、P150N156と微小管の共存下では微小管がバンドリングした。P150N156、P150N90の予想分子量がそれぞれ18.9kD、11.7kDであること、および微小管に対する結合ドメインが単独であることから、これらの結果よりP150N90がモノマーで存在したのに対し、P150N156は自己会合してダイマーを形成したと考えられる。P150N156は予想されるcoiled-coil構造を持たず、会合様式は現在のところ不明である。

さらに、遺伝子工学的手法によりP150N156にゲルゾリンを融合して蛍光ラベルF-アクチンと結合させ、1分子での微小管との相互作用を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、一次元ブラウン運動がみられた。これにより、ダイニンの運動連続性をダイナクチンがサポートしている可能性が示唆された。

I.Someki, K.Shiroguchi, M.Edamatsu and Y.Toyoshima : In vitro interaction of Dynactin p150 and Microtubule.

B500

べん毛フックキャップ蛋白質 FlgD の複合体形成の解析

○松波 秀行¹、古川 進朗¹、Samatey Fadel A.^{1,2}、難波 啓一^{1,2}（¹ICORP・超分子ナノマシン、²阪大院・生命機能）

べん毛フックキャップ蛋白質 FlgD はフックの構築に必須で、べん毛特異的輸送装置によって細胞内からロッドの先端に運ばれ、先端に結合してキャップ構造を構築する。このキャップは、後から運ばれてくるフック蛋白質、FlgE によるフックの伸張を開始し促進するが、フックの完成とともに送られてくる HAP1 に置き換えられて先端から解離する。一方、べん毛フィラメントでは、その先端に HAP2 (FlhD) がキャップ構造を形成し、フラジェリンの自己集合を促進してフィラメントの伸張を助ける。HAP2 が 5 量体を形成し、フィラメントの 5.5 回対称に近いらせん構造との対称性ミスマッチを利用して機能することから、同様のらせん構造を持つフックの先端で、FlgD も HAP2 と類似の複合体を形成することが期待され、FlgD とフックの複合体がフックの伸張モデルを考える上でも重要な役割を担っていると予想される。

これまでに、FlgD が溶液中で単量体と比較的均一なサイズの多量体を形成することを示した。ゲルろ過クロマトグラフィーから見積もられる溶液状態の分子量と架橋剤を用いた化学修飾の結果からこの多量体は 5 量体であることが示唆された。今回、この 5 量体の FlgD を pH の異なる条件でゲルろ過クロマトグラフィーによりその溶出特性を分析したところ、酸性側ではその大部分が 5 量体を形成していたが、中性からアルカリ性にかけて 5 量体の占める割合が徐々に減少し、単量体の占める割合が増加することが判明した。本会では超遠心分析の結果と併せて FlgD の複合体形成に関して報告する。

H.Matsunami, Y.Furukawa, FA.Samatey and K.Namba : Self-Assembly of Flagellar Hook Capping Protein FlgD