3P189

蛍光エネルギー移動(FRET)法を用いた、細胞質ダイニンシステムのスイングの検出

○最上 聡文¹、昆 隆英¹、伊藤 光二²、大倉 玲子¹、須藤 和夫¹ (¹ 東大院・総合文化・生命環境、² 千葉大・理・生物)

ダイニンはATP加水分解にともない微小管上をすべり運動するモータータンパク質である。ダイニンのモータードメインである重鎖はAAA+ATPaseファミリーに含まれており、特徴的なリング構造をしている。ダイニンがすべり運動のための力を発生する機構は未知であるが、近年、電子顕微鏡を用いた構造解析研究から、軸糸内腕ダイニンcでは、リング構造から突出したステムと呼ばれる部位が、ATP加水分解の際にリング構造に対し相対的にスイングしていることが報告され、このステムのスイングがすべり運動のための力発生に重要であることが示唆された(Burgess, Nature, 2003)。そこで本研究では、ATP加水分解にともなうダイニンシステムのスイングを溶液中で検出し、第一にステムのスイングの起こる中間素反応を決定すること、また第二にstopped flowを用いてスイングが起こる反応速度を決定することを目的とし、BFP-GFP FRET法を用いた。粘菌の細胞質ダイニン重鎖のステムにGFPを、AAAリングにBFPを挿入した変異体を作成した。この変異体溶液の定常状態の蛍光スペクトルを測定したところ、ATPを加えるとFRET効率が変化し、一定時間後、ATP添加前のFRET効率に戻るものが観測された。また、ATPとバナジン酸を同時に加えADP-Vi中間状態を形成すると、ATPのみを加えたときと全く同程度のFRET効率変化が起こり、その変化が長時間固定された。このように、ATP加水分解にともなうダイニンシステムのスイングを検出するプローブが開発できた。ステムのスイングの起こる中間素反応を決定するために、AMPPNPやATP γ Sといったヌクレオチドアナログを用いた。またstopped flowにより、FRET効率変化の速度を決定した。こうした実験の結果について報告する。

T.Mogami, T.Kon, K.Ito, R.Ohkura and K.Sutoh : Detection of stem swing of cytoplasmic dynein by fluorescence resonance energy transfer(FRET) measurements

3P191

細胞質ダイニンストークと微小管の相互作用

○廣田 健介、枝松 正樹、豊島 陽子(東大院・総合文化・生命)

ダイニンはATPの加水分解に伴う力発生により、微小管のマイナス端に向かって動くモータータンパク質である。細胞質ダイニンは主に細胞小器官の輸送と有糸分裂に関与していて、双頭構造である。ダイニン分子は、球状のモータードメインからcoiled-coil構造を介して伸びたストークと呼ばれる構造で微小管と相互作用することが知られている。ダイニンはモータードメインにおけるヌクレオチド状態に依存した微小管との親和性を示すことが報告されている。また、微小管の存在下においてはATPase活性が上昇することも知られている。しかし、そのようなクロストークのメカニズムは依然明らかではない。ヌクレオチド結合部位は球状ドメインに存在するので、ストークのcoiled-coil構造がエネルギーの変換に関わっていることが予想される。

本研究では、ストークヘッド部位を含む、長さの異なる細胞質ダイニンストークのフラグメントを複数作製し、大腸菌での発現・精製に成功した。また、ゲルろ過クロマトグラフィーから、それらが溶液中において単量体で存在することが示された。そして、CDスペクトルを測定すると、長さの違いによる有意な α ヘリックス含量の差が見られた。さらに、共沈実験とゲルゾリンを用いた一分子直接観察(Yajima *et al.* 2002)によりそれらのフラグメントと微小管との親和性を調べたところ、有意な差があった。以上の結果は、ストークのcoiled-coil構造での巻き方の変化が、ダイニンの運動における微小管とのクロストークに関与していることを示唆している。

K.Hirota, M.Edamatsu and Y.Y.Toyoshima : Interaction between cytoplasmic dynein stalk and microtubules

3P190

細胞質ダイニンの潜在的な機能を有する複数のATP加水分解部位について

○高橋 良典、枝松 正樹、豊島 陽子(東大院・総合文化・生命)

ダイニンは微小管上をマイナス端方向に移動する分子モーターである。ダイニン重鎖はAAA+ファミリーに属しており、そのモータードメインは6個のAAAモジュール(AAA1からAAA6)を含んでいる。最初の4個のモジュールにはヌクレオチド結合部位であるP-loop(P1からP4)があり、細胞質ダイニンではP1とP3が非常によく保存されていて、そのどちらもATP依存的な微小管との結合に関わっていることが明らかにされている。しかし、加水分解部位の特定は依然されていない。

既に2002、2003年本年会においてブタ脳から精製した細胞質ダイニンと同程度の活性を持つダイニンフラグメント(AAA1-4)の大腸菌での発現・精製に成功したこと、また、P3も活性を持ち得ることを報告してきた。しかし、活性が有意に減少した変異体の作製には成功していなかった。

本研究では他のAAAタンパク質との配列の相同性の比較から隣のモジュール内のSRCモチーフのアルギニン(例えば、P1に対してはAAA2のSRCモチーフ)に注目し、アラニンに置換する変異をAAA1-2、AAA3-4に導入したところ、どちらにも有意な活性の減少がみられた。この結果により、ATPを加水分解する際の隣のモジュールの役割が示された。また、AAA1-4にこれらの変異を導入した場合にも同様に活性の減少がみられ、P1とP3に相当する2ヶ所の阻害の程度は加算的であった。この結果から細胞質ダイニンにはすくなくともふたつのP-loopにATPを加水分解する能力があることがわかった。ダイニンではP-loop間の制御が知られており、モータードメイン全体を含む変異体の活性を測定するといった方法で個々のP-loopの能力を調べることは困難であったが、本研究でフラグメントの活性を測定することにより初めて明らかにすることができた。

Y.Takahashi, M.Edamatsu and Y.Y.Toyoshima : Multiple ATP-hydrolyzing sites that potentially function in cytoplasmic dynein

3P192

細胞質ダイニンの最小モーター領域

○西浦 昌哉、昆 隆英、大倉 玲子、須藤 和夫(東大院・総合文化・生命)

細胞質ダイニンは微小管上をマイナス端方向へ運動するモータータンパク質で、重鎖、軽鎖、軽中間鎖、中間鎖により構成される巨大な複合体タンパク質である。これらの中では重鎖が、ATP加水分解によりエネルギーを得て微小管滑り運動を行うサブユニットである。重鎖のモータードメインは6つのAAA+モジュール(AAA1-6)を含むバレル形をしている。これらの中ではAAA1-4に、ATP結合部位がそれぞれ1箇所ずつ存在している。またAAA4とAAA5の間には、微小管結合部位であるストークと呼ばれる構造がある。

細胞性粘菌の細胞質ダイニン重鎖の場合、C末端側の約3分の2、分子量380kDaの領域に上記の特徴的な構造が全て含まれる。また380kの領域は単量体のモータードメインとなるが、この領域のみで、ATP加水分解活性や滑り運動活性といったモータータンパク質としての機能を保持している。(Nishiura *et al.*, 2004, JBC vol. 279, 22799-802)

本研究ではダイニンの、モーターとして機能する最小の領域を決定することを目的とした。最初に380k領域のN末端側をさらに削った分子量372kの領域のコンストラクトを作製した。このタンパク質は380kと同様に細胞性粘菌で大量発現した。しかしながら得られたタンパク質のATP加水分解活性は380kに比べて約10分の1と非常に小さかった。また微小管滑り運動活性は、現在のところ確認されていない。以上の結果から、372k領域のみでは充分なモーター機能が保持されているとは言い難く、380k領域が最小のモーター領域である可能性が示唆される。現在、380kのC末側を削ったコンストラクトについても同様の検討を行っており、本会において報告する予定である。

M. Nishiura, T. Kon, R. Ohkura, K. Sutoh : The minimal motor domain of cytoplasmic dynein