3P193

LIS1、Nudel タンパク質は細胞質ダイニンのモーター活性を協調して制御する

○鳥羽 栞¹、豊岡 和人²、広常 真治²、豊島 陽子¹ (¹ 東京大・院・総合文化・生命環境科学、² 大阪市大・医・細胞機能制御)

LIS1 はヒト滑脳症原因遺伝子の産物であり、Nudel は LIS1 の effector と考えられている。これらのタンパク質の異常は細胞質ダイニン依存の細胞内運動に深刻な障害をもたらす。LIS1、Nudel、細胞質ダイニンの三者は直接相互作用することが知られており、細胞内において LIS1、Nudel による細胞質ダイニンの活性の制御機構があると予想されるが、*in vitro* での相互作用や、活性への影響は明らかでない。今回、我々は LIS1、Nudel が *in vitro* で細胞質ダイニンのモーター活性を協調して制御する機構を報告する。

LIS1、Nudel は昆虫細胞で発現、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 が相互作用したダイニンは ATPase 活性の変化はなかったが、motility assay では微小管が結合したままで運動を行えなかった。Nudel は、ダイニンと微小管との相互作用が弱くなり、微小管と結合できなくなった。また微小管による ATPase 活性の上昇も抑えられた。両者が相互作用したダイニンは、ATPase 活性が control と同程度に回復し、微小管滑り運動活性も回復した。ダイニンと微小管との共沈実験においても、LIS1、Nudel によるダイニンの微小管 affinity の変化が確かめられた。これらの結果から、LIS1、Nudel もともに単独では細胞質ダイニンのモーター活性を異なるメカニズムによって阻害すること、両者が相互作用することによって細胞質ダイニンのモーター活性が回復することが示された。このような機構によって LIS1、Nudel が協調して細胞内の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, K.Toyo-oka, S.Hirotsune and Y.Y.Toyoshima : LIS1 and NUDEL cooperatively regulate motor activity of cytoplasmic dynein.

3P195

単量体細胞質ダイニン重鎖の連続運動性

○鳥 知弘、昆 隆英、大倉 玲子、須藤 和夫（東大院・総合文化・生命環境）

細胞質ダイニンは、ATP 加水分解により生じるエネルギーを利用して微小管上をマイナス端方向へ進むモータータンパク質であり、モーター活性を担う重鎖がホモダイマーを形成している。ウシ脳から精製された細胞質ダイニンは微小管上を解離することなく複数のステップを連続して行えるとされ [R.Mallik et.al *Nature*, 2004]、これを連続運動性が高いという。しかしその運動の詳細やメカニズムは解明されていない点が多い。

本研究では、個々の細胞質ダイニン重鎖のみで高い連続運動性を持つかを明らかにすることを目的とした。材料としては、細胞性粘菌由来のダイニンモータードメイン (380k) を発現及び精製し、これを用いた。380k はダイニン重鎖 (全長: 540kDa) の C 末端側 380kDa のおぶんであり、モノマーで存在し [M.Samso et.al *J. Mol. Biol.*, 1998]、微小管滑り活性を維持していることが分かっている [M.Nishiura et.al *J. Biol. Chem.*, 2004]。得られた 380k を用いて *in vitro* microtubule landing assay を行い、その結果を解析したところ、1 本の微小管を滑らせるのに最低でも 5 分子程度の 380k が必要になることが明らかになった。また、連続運動性を示す特徴のひとつであるビポッティングが観察されないことから細胞質ダイニン重鎖は、モノマーでは連続運動性が低いことが示唆される。

以上の結果より、細胞質ダイニンは個々の重鎖の連続運動性が高いのではなく、2 つの重鎖間の協調が連続運動性をもたらすのに重要であると考えられる。また、連続運動性と深く関連する duty ratio についても、*in vitro* microtubule gliding assay による解析を進めており、その結果も併せて本会で報告する予定である。

T.Shima, T.Kon, R.Ohkura, K.Sutoh : Processivity of single-headed cytoplasmic dynein

3P194

変異細胞質ダイニンをを用いた AAA1、AAA3 モジュールの機能解析

○今村 謙士、昆 隆英、大倉 玲子、須藤 和夫（東大院・総合文化・生命環境）

細胞質ダイニンは微小管上をマイナス端方向に運動するモータータンパク質である。そのモータードメインはリング状に連なった 6 つの AAA+モジュール (AAA1~6) を含み、AAA1~4 はヌクレオチド結合モチーフ (Walker A モチーフ) を持つ。実際、1 分子のダイニンは最大で 4 分子の ATP を結合することが報告されている。Walker A モチーフに変異を入れるとヌクレオチドの結合が阻害されることが知られているが、我々は先の研究で、AAA1~4 のうち、AAA1 と AAA3 の Walker A モチーフに変異を入れた場合に、微小管による ATP 加水分解活性の活性化及び微小管すべり運動が著しく阻害されることを示した。このことから、AAA1 と AAA3 に存在するヌクレオチド結合ポケットへのヌクレオチドの結合が、ダイニンのモーター活性に重要もしくは必須であると考えられる。

AAA+モジュールのヌクレオチド結合ポケットには、Walker A 以外にも sensor-1、sensor-2 と呼ばれるよく保存されたモチーフがある。これらのモチーフは結合したヌクレオチドと相互作用することで、ヌクレオチドの結合、加水分解に関与していると考えられている。他の AAA+タンパク質の研究では、sensor-1、sensor-2 モチーフに変異を入れることにより、ATP 加水分解活性やヌクレオチドに対する親和性が大きく下がるという結果が報告されている。そこで我々は、ダイニンのモーター活性における AAA1 と AAA3 の役割をさらに詳しく調べるため、AAA1、AAA3 の sensor-1、sensor-2 モチーフに変異を入れた細胞質ダイニンを作成し、その生化学的活性を測定した。本会では、これらの変異ダイニンの ATP 加水分解活性、微小管すべり運動活性、FRET による構造変化解析の結果を報告する。

K.Imamura, T.Kon, R.Ohkura, K.Sutoh : Mutational analysis of AAA1 and AAA3 modules of cytoplasmic dynein

3P196

軸系ダイニンの微小管すべり運動に対する ADP 安定結合の役割

○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、加水分解は一つの部位で起こると考えられている。他の 3 箇所は、ATP や ADP の結合により、運動活性の調節に寄与する可能性が示唆されているが、その機構は明らかではない。

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 が加水分解だけでなく、数分に及ぶ安定結合を行うことを昨年報告した。今回、この安定結合によってダイニンの微小管滑り運動活性が制御されるかを検討した。

ウニ精子鞭毛の外腕ダイニンをガラス上に固定し、微小管と ATP (1mM) を与えて滑り運動を観察した。微小管は初め運動と停止を繰り返したが、時間と共にめらかな運動になった。平均速度の時間変化は、数分でゆっくりと増加し、速度変化の時定数は 213 秒、最大速度は 2.9 $\mu\text{m/s}$ と見積もられた。これは ADP に依存した分オーダーの運動活性化として報告された菊島らの結果 (2003) と同様であった。この活性化機構を明らかにするため、0.05mM ADP で 10 分間ブレインキュベートして ADP 安定結合を誘導した後、滑り運動を観察した。この結果、運動開始直後から滑らかな速い運動が見られた (時定数 30 秒、最大速度 3.6 $\mu\text{m/s}$)。同様の結果は Cy3ADP でも観察され、蛍光観察により、活性化された運動が、Cy3ADP の安定結合時に起きたことが確認された。一方、ATP 再生系存在下で ATP とブレインキュベートすると、開始直後の速度増加は見られなかった。(時定数 133 秒、最大速度 2.4 $\mu\text{m/s}$)。

以上の結果は、ダイニンの運動には ATP 加水分解だけでなく ADP の結合が重要であり、ダイニンの運動性が、ADP 安定結合を介して活性化される可能性を示唆する。

Y.Inoue, K.Oiwa and C.Shingyoji : Role of stable ADP binding in the regulation of microtubule sliding activities by axonemal dynein