

# 細胞質ダイニンの運動メカニズム解明を目指した 分子シミュレーション研究

久保 進太郎

## 序論

細胞質ダイニンは細胞内小器官の輸送や配置、細胞分裂において重要な役割を担う分子モーターである。本研究では、細胞性粘菌 *Dictyostelium Discoideum* の細胞質ダイニンの運動メカニズム解明を目指し、3段階の分子シミュレーション研究を行った。

細胞質ダイニンは ATP の加水分解から得られる自由エネルギーを用いて微小管上を二足歩行運動する事で物質輸送や配置を行う分子モーターである。二足のそれぞれの足はモータードメインと呼ばれ、ATP 加水分解反応を担う AAA+ドメインと微小管結合ドメインの MTBD からなる。歩行運動において特に重要な加水分解反応を行う AAA1(AAA+ドメインの一部)から MTBD までは約 25 nm と長距離離れているが、その間の伝達機構はこれまで明らかにされていなかった。そこで、第1章では単体のモータードメイン内部での構造変化機構について明らかにしていく。

次に、未解明な点が多い「ダイニンがなぜ微小管上を一方向に運動する事が可能なのか」に着目し研究を行った。筆者は一方向運動を可能にする鍵は、MTBD がダイニンの進行方向には解離しやすいが、逆方向には解離しにくいという異方性にあると考えた。そこで、第2章では MTBD のどの部位が解離の異方性を生み出し、そして解離の異方性が本当に一方向運動実現のために重要な役割を担うのかについて確認していく。

これらの知見を総合して、最後に、各足の ATP 加水分解サイクルと二足歩行の協調関係について研究した。二足歩行するダイニンにおいて、片足の ATP 反応サイクルを阻害するあるいは、片足を松葉杖のように全く別の構造体に置き換えても、一方向運動を行う事が知られている。そのような状況でも歩行運動が可能となるような二足間の相互作用についてはわかっていなかった。そこで、第3章では二足歩行運動時の二足の位置関係と歩行様式の関連性を調べるためにマルコフ状態モデルを作成し、モンテカルロ計算によって詳細な運動の様子を解明していく。

## 第1章 細胞質ダイニンのモータードメインにおける構造変化メカニズムに関する粗視化 MD シミュレーション

細胞質ダイニンの AAA+ドメインには AAA1~AAA4 に一つずつ ATP 結合サイトを有するが、運動において最も重要な役割を担う部位は AAA1 である事が知られている。この AAA1 のヌクレオチド状態変化が全体の構造変化に繋がる事が知られている。構造情報として、AAA1 が ATP アナログである pre 状態と、AAA1 が ADP 状態である post 状態の高分解能の結晶構造が取られている。pre 状態では MTBD が微小管との結合親和性が低い弱結合状態の構造をとる一方で、post 状態では強結合状態を取ることもまた知られている。つまり、AAA1 で ATP の加水分解反応が起こる事で、モータードメイン全体の構造変

化が起こり、歩行運動にも直結することが自明である。

実験では観察困難な詳細なヌクレオチド状態変化に伴う構造変化の伝播経路を調べる為に、ダイニンをよく知られている 8 ドメインに分割し、それぞれが pre/post の 2 状態を行き来出来る様に Multiple-basin model を用いて設定した。CafeMol による粗視化分子動力学シミュレーションをこのダイニンについて行う事で、加水分解反応時、及び、その後の ATP 結合時の構造変化の際に 8 ドメインがどのような順番で構造変化するかを明らかにした。pre 構造から post 構造に変化する際は AAA3→linker→AAA1→AAA4→MTBD→AAA2→AAA5→AAA6 の順番で変化した。一方、post 構造から pre 構造に変化する際は AAA6→AAA1→AAA2→AAA5→MTBD→linker→AAA3→AAA4 の順番で変化した。

## 第 2 章 細胞質ダイニンの微小管結合ドメインが有する微小管からの解離の異方性に関する粗視化 MD シミュレーション

細胞質ダイニンが微小管のマイナス端方向に一方向運動するのは、強結合状態の MTBD がマイナス端方向に解離しやすいが、プラス端方向には解離しにくいという解離の異方性が原因であると考えた。その真偽を調べる為にまずは解離の異方性を生み出す部位の特定を目標とする。まず、微小管に強結合状態の MTBD を配置し、MTBD に微小管のプラス端方向、マイナス端方向それぞれに外力を加える粗視化分子動力学シミュレーションを行った。結果として、解離の異方性は確かに確認され、さらに微小管との接触頻度が特に高い部位(R3423)を特定した。

理論的に明らかになったプラス端方向への移動時に微小管との接触頻度が高いアミノ酸に対して、共同研究者に点変異を導入したダイニンの作成とそれを用いた一分子計測実験を依頼した。その結果、確かに実験的にも R3423D の変異体は解離の異方性の消失が確認され、同時に一方向運動性能も消失した。これらの結果から、ダイニンの一方向運動の鍵となる部位を特定し、さらにその働きを解明することに成功した。

## 第 3 章 細胞質ダイニンの多様なステッピング運動に関するモンテカルロ計算

ダイニンは微小管上をマイナス端方向に二足歩行運動する分子モーターであるので、同じく微小管上をプラス端方向に二足歩行運動する分子モーターであるキネシンと対比して考えることが多い。キネシンは前足の加水分解反応に連動して後ろ足を前に送り出す動きを交互に繰り返す事で歩行運動を実現する。その為、キネシンのステップサイズは 8 nm に安定し、またその歩行様式は hand-over-hand という人間と類似の歩き方を行う。両足の運動が強く相関している為、片足の加水分解反応を阻害すると歩行運動が大きく阻害されることも知られている。一方、ダイニンは hand-over-hand だけでなく、尺取り虫のように常に片足が前方に、もう片足はそれを追従するように動く inchworm-like や、片方の足が連続してステップするような非交互の運動も確認されている。また、片足のヌクレオチド状態変化を阻害したり、松葉杖のような全く別の構造体に置換しても一方向運動が実

現される。これらの結果は二足間の相互作用が弱いことを示唆しているが、とはいえ効率的な一方向運動の実現のためにはある程度の相関関係は必要になると考えられる。

一分子計測ではステップ運動と詳細なヌクレオチド状態変化を同時に追うことは時空間分解能の限界から困難である。そこで、マルコフ状態モデルを作成し、Gillespie モンテカルロ計算を行う事でダイニンの運動を再現した。計算の結果、作成したモデルは実際のダイニンの特徴的な ATP 濃度依存の運動性能の変化や外力応答を再現していた。その上で、最頻出経路は実験でも確認されているように *inchworm* であった。しかし、その詳細なヌクレオチド状態変化はこれまで考えられていたような二足それぞれが ATPase cycle を回す事で一歩ずつ前進するのではなく、片足は ATPase cycle を回すことで前進するが、二歩目を行う後ろ足は前足との間に発生する内力によって ATP を使わずに拡散を用いて運動する事が明らかになった。

## 結論

第 1 章でモータードメイン単体のヌクレオチド状態変化と構造変化の関係性を明らかにした。そして、第 2 章ではダイニンがマイナス端方向への一方向運動を実現するために MTBD が微小管に対して有する解離の異方性が重要であることを明らかにした。最後に第 3 章では、第 1 章から明らかにされたモータードメインの構造変化の様子や第 2 章の解離の異方性をパラメータとして含めたダイニンモデルを作成することで、ダイニンの二足歩行運動時の詳細なヌクレオチド状態変化と多様なステップ様式の関係性を明らかにした。