

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18514

研究課題名(和文)4つのATP結合部位による細胞質ダイニンの活性調節機構

研究課題名(英文)Regulatory roles of the four ATPase sites in the dynein motor domain

研究代表者

島 知弘(Shima, Tomohiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：60631786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質ダイニンは、ATPのエネルギーを利用して微小管上を運動するモータータンパク質である。この運動は、細胞分裂・細胞内小器官の位置決定・ウィルスから核に至る種々の小胞の細胞内輸送といった多様な生命現象に深く関与している。ダイニンは1つの重鎖の中に、4箇所のATP結合部位を持つユニークな構造を取っており、これら4箇所でのATP結合がいかにかダイニンの運動を制御しているのか、という問題は未だ不明な点が多い。本研究において、我々はダイニン1分子に対するATP分子の結合・解離の様子を可視化することに、世界に先駆けて成功した。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic dynein moves along microtubule using energy of ATP. This movement enrolls in a wide variety of cellular processes including mitosis, organelle positioning, and intra-cellular trafficking. One of the unique features of dynein is that the dynein motor domain contains four ATP binding sites. Although regulation between these four ATP binding sites seems to be critical for the dynein motility, it remains unanswered how dynein uses these four ATP binding sites. Here, we tried and succeeded in visualizing the binding and release of ATP molecules on single molecules of dynein.

研究分野：生物物理

キーワード：協同性

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質ダイニンは逆行性細胞内輸送を担い、多岐にわたる生命機能に深く関わるモータータンパク質である。申請者らは、総分子量が 1MDa を超える巨大さ故に分子機構研究が立ち遅れていた細胞質ダイニンについて、世界に先駆けて組換えタンパクの発現・精製系を確立し、分子機構研究をリードしており、ついにダイニンモータードメインの結晶構造を解明するに至った。

しかし、1モータードメイン中に4つ存在する ATP 結合部位がいかに関与するのかがダイニンの運動を制御するのかというダイニン動作機構の根幹をなす問題は未解決であった。我々は一連の先行研究にて、1番目の ATP 結合部位 (AAA1) のヌクレオチド状態がダイニンの運動と連動し、他の3つの部位の状態が AAA1 の活性に強く影響することを示したが、その詳細は明らかでなかった。また、ダイニンの ATP 加水分解速度は、微小管結合時に20倍以上上昇することが知られているが、この活性化が各 ATP 結合部位に及ぼす影響も明らかでなかった。

### 2. 研究の目的

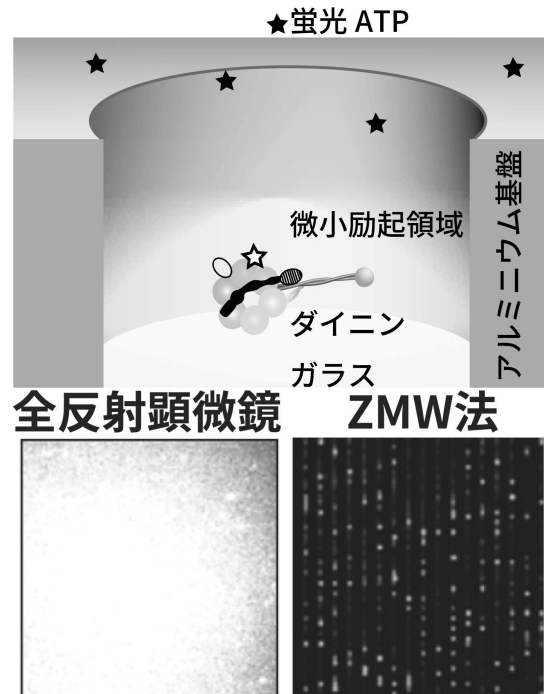
本研究では、細胞質ダイニンの4つの ATP 結合部位のどこに、そしていつ ATP 結合・解離するのかを明らかにすることを目的とした。そして、ダイニンの運動ステップの進行と ATP の結合・解離を対応付けることで、ダイニンの運動を駆動する上での各 ATP 結合部位の役割を解明したいと考えた。

### 3. 研究の方法

これまで、研究の進展してこなかった大きな要因として、運動中にダイニンと結合している ATP の数や結合のタイミングを実測できていなかったことが挙げられる。他のモータータンパク質では蛍光 ATP を用いた実測が報告されているが、従来の手法では ATP の有無は判別できるものの結合 ATP の数を決定するだけの精度は得られていない。また我々の先行研究から、ダイニンの ATP に対する解離定数は  $10^{-6}$  M のオーダーであることが分かっている。しかし、全反射蛍光顕微鏡など従来の1分子計測法では、蛍光分子を  $10^{-9}$  M 領域以下の低濃度に抑えねば各輝点を弁別できないため、測定は非常に困難であった。

我々はこの問題点を、次世代シーケンサーに採用されている1分子イメージング法の Zero-mode waveguide 法 (ZMW 法) を用いて解決できた。ZMW 法は直径 100 nm ほどの微小穴に局所励起光を照射するため、 $10^{-6}$  M オーダーの蛍光分子が存在しても背景光が劇的に低減した状態で分子の結合・解離を精度よく、しかもミリ秒以下の時間分解能で実測できるものである(下図参照)。ZMW 法による ATP 結合のタイミング・結合 ATP の分子数の実測と、私がすでに有している分子内蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によるダイニン運

動ステップ検出などの計測を組み合わせることで、それぞれの ATP 結合部位への ATP 結合・解離がいかに関与するのかがダイニンの運動を駆動しているか解明することを試みた。



図。(上) ZMW 法による蛍光 ATP の結合・解離測定の様式図。ZMW 法では、底面から 10-20 nm の微小な領域に存在する蛍光分子のみが励起される。そのため、従来の蛍光イメージング法では1分子を識別できない高濃度蛍光分子存在下でも、ZMW 法では1分子を検出できる(下)。

### 4. 研究成果

まず平成 27 年度の成果として、ZMW 基盤に固定したダイニン1分子への ATP の結合・解離の可視化に成功した。蛍光強度などの各種データから、結合している ATP 分子数も real-time に測定できるシステムが構築できた。水中でのダイニンへの ATP 結合・解離の可視化はこれまでに報告されていない成果である。

このシステムを用いて計測したところ、1分子のダイニンに複数の ATP 分子がほぼ同時に結合及び解離する現象が観察され、ATP 結合部位の間で協同性があることが示唆された。そこで平成 28 年度には、この ATP 結合部位間での協同性についてさらに計測を進めた。すると、高濃度 ATP 条件下だけでなく非常に低濃度の ATP 条件下においても、協同的な ATP 結合が見られ、ダイニンの ATP 結合部位間では緊密な ATP 結合・加水分解サイクルの調整が行われていることを支持する結果を得た。

今後はさらに解析を進め、各 ATP 結合部位の役割を解明し、雑誌論文等で発表したいと考えている。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Saki Osuka, Kazushi Isomura, Shohei Kajimoto, Tomotaka Komori, Hiroshi Nishimasu, Tomohiro Shima\*, Osamu Nureki\*, Sotaro Uemura,  
Real-time observation of flexible domain movements in Cas9, bioRxiv, 査読なし, 2017, ID: 122069, pp. 1-36,  
doi: <http://dx.doi.org/10.1101/122069>  
(\*:Co-corresponding authors)

Takumi Chinen, Peng Liu, Shuya Shioda, Judith Pagel, Berati Cerikan, Tien-chen Lin, Oliver Gruss, Yoshiki Hayashi, Haruka Takeno, Tomohiro Shima, Yasushi Okada, Ichiro Hayakawa, Yoshio Hayashi, Hideo Kigoshi, Takeo Usui & Elmar Schiebe (2015)  
The  $\gamma$ -tubulin specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle, Nature Communications, 査読有り, 6, 8722, pp. 1-11

Tatsuya Ohyanagi, Tomohiro Shima, Yasushi Okada, Yoshikazu Tsukasaki, Akihito Komatsuzaki, Setsuko Tsuboia and Takashi Jin (2015)  
Compact and stable SNAP-ligand conjugated quantum dots as a fluorescent probe for single-molecule imaging of dynein motor protein, Chemical Communications, 査読有り, 51, pp. 14836-14839

Hiroshi Imai, Tomohiro Shima, Kazuo Sutoh, Matthew L. Walker, Peter J. Knight, Takahide Kon, Stan A. Burgess (2015)  
Direct observation shows superposition and large scale flexibility within cytoplasmic dynein motors moving along microtubules, Nature Communications, 査読有り, 6, 8179, pp. 1-11

[学会発表](計10件)

Tomohiro Shima, Manatsu Morikawa, Junichi Kaneshiro, Taketoshi Kambara, Shinji Kamimura, Toshiki Yagi, Taro Ichimura, Tomonobu Watanabe, Sotaro Uemura, Ryo Nitta, Yasushi Okada, Nobutaka Hirokawa  
A novel function of kinesin-1: changing microtubule conformation that accelerates successive kinesin binding, American Society for Cell Biology's 56th Annual Meeting, Moscone Convention Center

(米国カリフォルニア州サンフランシスコ)  
2016年12月4日

島知弘、岡田康志  
キネシンによる微小管の構造変化  
第39回日本分子生物学会、パシフィコ横浜  
(神奈川県横浜市) 2016年11月30日

Shinji Kamimura, Hiroshi Imai, Toshiki Yagi, Tomohiro Shima, Yasushi Okada, Hiroyuki Iwamoto  
Determination of accurate axial tubulin repeat in GDP-microtubules  
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, つくば国際会議場(茨城県つくば市) 2016年11月27日

Tomohiro Shima, Manatsu Morikawa, Junichi Kaneshiro, Taketoshi Kambara, Shinji Kamimura, Toshiki Yagi, Taro Ichimura, Tomonobu Watanabe, Sotaro Uemura, Ryo Nitta, Yasushi Okada, Nobutaka Hirokawa  
A novel function of kinesin-1: changing microtubule conformation that accelerates successive kinesin binding  
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, つくば国際会議場(茨城県つくば市) 2016年11月25日

Mikiya Sakata, Takuya Kobayashi, Mitsuhiro Sugawa, Tomohiro Shima, Junichiro Yajima, Yoko Y. Toyoshima  
Single molecule FRET observation of cytoplasmic dynein's conformational change  
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, つくば国際会議場(茨城県つくば市) 2016年11月25日

Tomohiro Shima, Yasushi Okada. "Single molecule analysis of smart motor hypothesis", American Society for Cell Biology's 55th Annual Meeting, San Diego convention center (米国カリフォルニア州サンディエゴ), 2015年12月14日

Tomohiro Shima, Yasushi Okada. "Single molecule analysis of smart motor hypothesis", The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 金沢大学角間キャンパス(石川県金沢市), 2015年9月13日

Hiroshi Imai, Tomohiro Shima, Kazuo Sutoh, Matthew L. Walker, Peter J. Knight, Takahide Kon, Stan A. Burgess, クライオ電子顕微鏡により明らかとなった微小管上を歩いている細胞質ダイニンの新規の構造と揺らぎ, The 53rd Annual Meeting of the

Biophysical Society of Japan, 金沢大学角  
間キャンパス(石川県金沢市), 2015年9月  
13日

上村 想太郎 (UEMURA, Sotaro)

Tomohiro Shima, Yasushi Okada. "Single  
molecule analysis of smart motor  
hypothesis", The 67<sup>th</sup> Annual Meeting of  
the Japan Society for Cell Biology, タワ  
ーホール船堀(東京都江戸川区), 2015年7  
月2日

Tomohiro Shima, "The next generation  
single-molecule imaging for molecular  
motor study", 第5回分子モーター討論会,  
東京大学駒場キャンパス2 1KOMCEE (東京  
都目黒区), 2015年6月14日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島 知弘 (SHIMA, Tomohiro)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号: 60631786

### (2) 研究分担者

該当なし

研究者番号:

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者