

平成 22 年 2 月 23 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16083205

研究課題名（和文） ミオシンナノシステムによる細胞内情報制御

研究課題名（英文） Regulation of information flow by motor protein systems

研究代表者

須藤 和夫 (SUTOH KAZUO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20111453

研究成果の概要（和文）：ミオシンやダイニンの細胞内機能をあきらかにする一環として、ミオシン 6 が相互作用するパートナーをスクリーニングし、その機能を細胞生物学を用いてあきらかにするとともに、我々が世界に先駆けて確立した細胞質ダイニン・モータードメイン発現系を駆使して、電子顕微鏡法、ATPase キネティックス、FRET 法などを用いながらダイニンの構造機構相関を詳細に解析した。

研究成果の概要（英文）：Our major goal of this project is to elucidate structures and functions of motor proteins, especially, unconventional myosin 6 and cytoplasmic dynein. We carried out the yeast two-hybrid screening of interacting partners of myosin 6. We identified several proteins including a membrane-bound tyrosine kinase. We examined in vivo functions of the kinase by using various cell- and molecular-biological techniques such as RNAi. We also examined structure and function of cytoplasmic dynein, using recombinant dynein motor domain. We identified interesting biochemical and structural properties of the motor domain by electron microscopy, rapid kinetics and FRET (fluorescence resonance energy transfer). The data obtained by these experiments will become the basis for understanding cellular functions of motor proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	8,100,000	0	8,100,000
2005 年度	21,600,000	0	21,600,000
2006 年度	16,200,000	0	16,200,000
2007 年度	10,800,000	0	10,800,000
2008 年度	8,100,000	0	8,100,000
総計	64,800,000	0	64,800,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード:モーターたんぱく質、ミオシン、ダイニン、AAA+ATPase, FRET

1. 研究開始当初の背景

下等真核生物から哺乳動物にいたるまで、細胞内ではアクチンフィラメントを足場とする多彩なミオシンモーターが細胞の移動、形態形成、貪食、分泌、細胞内物質輸送など様々な「運動」に関わっている。現在では、ミオシンファミリーは18のサブファミリーに分類されている。細胞内では、こうしたミオシンは、たとえば他のモーター分子やCargo結合タンパク質といった様々なタンパク質と動的な集合体を形成し、高次の機能を発揮している。一方、微小管を足場とするキネシンとダイニンも細胞内物質輸送や細胞分裂に関与しており、両者は微小管上で反対方向に滑り運動する。キネシンについてはその結晶構造も解かれており、1分子レベルでの力学的挙動やATPaseキネティクスも詳細に調べられている。これに対して、ダイニンはその巨大なサイズのため遺伝子組換え体の作成ができず、キネシンに比べて研究が大きく遅れていた。こうしたなかで、われわれは細胞性粘菌を用いたダイニン発現系作成に成功し、ダイニンもミオシンあるいはキネシン同様に構造生物学的、生化学的、生物物理的アプローチで研究することを可能にした。

2. 研究の目的

ミオシン、キネシン、ダイニンを中心とする生体分子モーターがどのような分子機構で作動し、こうしたモータータンパク質がどのようなタンパク質ネットワークのなかで機能するかという問題は、細胞の「動き」を分

子レベルで明らかにするにあたってきわめて重要な研究課題である。本研究では、1) ミオシンスーパーファミリーに属する多様なunconventionalミオシンがどのような高次構造体の一員として細胞内で機能しているかを、このファミリーのなかでもっとも変わったメンバーであるミオシン6とミオシン18を中心に明らかにするとともに、2) 細胞質ダイニンの組換え体を用いてダイニン作動の分子機構を明らかにする、という2つのテーマを進行させる。こうした研究で、生物分子モーターの作動機構から細胞内ネットワークまで、細胞生物学、生化学、生物物理学的視点にたって幅広くブレークスルーを追求する。

3. 研究の方法

ミオシン6やミオシン18と相互作用するタンパク質の同定には酵母ツーハイブリッド法を用いた。こうして同定されたタンパク質の細胞内機能は、免疫蛍光抗体法やRNAiなどの細胞生物学的、遺伝学的方法を駆使して検討した。ダイニンモータードメインの構造解析は、主に電子顕微鏡法を用いた。モータードメインのATPase依存的構造変化は、FRET法により追跡した。またモータードメインのATPaseサイクルの詳細は、多数の変異体を用い、ストップフロー装置を用いて解析した。こうした構造生物学的、生化学的アプローチにより、ダイニンモータードメインの構造機能相関があきらかとなった。

4. 研究成果

(1) ミオシン6あるいはミオシン18と細胞内で相互作用するタンパク質遺伝子群を酵母ツーハイブリッド法でクローニングした。これら遺伝子産物のいくつかのものについて、

細胞内での機能、局在、ミオシンファミリーとの相互作用の生理的意義について、免疫沈降、免疫蛍光顕微鏡法、RNAiなどを駆使して明らかにした。特に、ミオシン6と相互作用する膜結合型チロシンキナーゼ、ミオシン18Bと相互作用するプロテアソームサブユニットについて、深く掘り下げた研究をおこなった。その結果、ミオシン18bというアクチンフィラメントを足場とするタンパク質とプロテアソームというタンパク質分解系との共役の一端があきらかとなった (Inoue et al., BBRC, 2006)。また、RNAiや蛍光抗体法を用いた細胞生物学的研究から、ミオシン6と相互作用している膜チロシンキナーゼが endocytosis、特にlate endosome形成に大きな役割を果たしていることがわかり、ミオシン6とendocytosisの関わりがあきらかとなった (Inoue et al., Genes to Cells, 2008)。

(2) リンカー末端にGFPを融合し、AAAリングにBFPを融合したダイニンモータードメインを用い、ATP加水分解サイクルにともなうリンカーの動きをFRETシグナルの変化として追った。この結果、ATP加水分解にともないリンカーが2つの位置の間を行き来することがわかった。ダイニンモータードメインのAAA1, AAA3, AAA4モジュール3箇所でのATP加水分解部位のうち、AAA1モジュールにある部位がこのリンカーの動きを支配していることがあきらかとなった (Kon et al., Nature Structural & Molecular Biology, 2005)。

(3) クライオ電子顕微鏡像3次元再構成によりダイニンモータードメイン-微小管複合体の3次元クライオ電子顕微鏡像を得ることに成功した。微小管に結合したダイニンのはじめの3次元像である (Mizuno et al., PNAS 2007)。

(4) リンカーの動きがパワーstrokeとな

ってダイニンの動きを駆動するというモデルの当否を確かめるため、ダイニンモータードメインのさまざまな位置にビオチンタグを挿入し、これをストレプトアビジンでガラス基板上に固定した。リンカー末端近くで固定されたダイニンモータードメインは速い微小管滑りを駆動したが、リンカー末端から離れると、しだいに滑り速度は低下し、最後には数十分の一にまでなった。このことは、リンカー末端がレバーアームのように動いているというモデルを支持する。一方、リングを固定してもゆっくりした微小管滑り運動は停止しなかった。この滑り運動は速い滑り運動と同じ方向性をもっていた。このことは、ダイニンモータードメインによる微小管滑り運動には、パワーstroke機構によるものと、それとはまったく異なる機構によるものがあることを示している (Shima et al., PNAS 2006)。

(5) ダイニンモータードメインと微小管はATP加水分解にともない解離会合を繰り返している。これとパワーstrokeの位相があうことが微小管滑り運動には必須である。そこでダイニンモータードメインと微小管の相互作用を定量的に測定し、これがATP加水分解サイクルでどのように調節されているかを検討した。その結果、パワーstroke前には微小管に弱く結合していたダイニンモータードメインがパワーstroke後には強く結合することが分かった。またこの結合の強さの変化はリンカーの動きと同様にAAA1モジュールのATP加水分解と共役していることがあきらかとなった (Imamura et al., PNAS 2007)。

(6) ダイニンモータードメイン上の微小管結合部位はAAAリング構造と12nmにもなるコイルドコイルで隔てられているが、両者の緊密なコミュニケーションなしにはダイニンは微小管滑り運動を駆動できない。コイルドコ

イルを構成する2本の α らせんにCys残基を導入し、ジスルフィド結合で2本のらせんを固定するという実験をおこなった。この結果、2本のらせんは1ヘプタドリピート分(7残基)揺らいでおり、この揺らぎがATP加水分解部位と微小管結合部位のコミュニケーションを支配していることがあきらかとなった(Kon et al., *Nature Structural and Molecular Biology* 2009)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Satoshi Hiyama, Riho Gojo, Tomohiro Shima, Shoji Takeuchi and Kazuo Sutoh. Biomolecular-Motor-Based Nano- or Microscale Particle Translocations on DNA Microarrays. *Nano Letters*. Publication on Web on April 30, 2009.
2. Anthony J. Roberts, Naoki Numata, Matt L. Walker, Yusuke S. Kato, Bara Malkova, Takahide Kon, Reiko Ohkura, Fumio Arisaka, Peter J. Knight, Kazuo Sutoh, and Stan A. Burgess. "AAA+ Ring and Linker Swing Mechanism in the Dynein Motor" *Cell* 136, 485-595 (2009)
3. Takahide Kon, Kenji Imamula, Anthony J Roberts, Reiko Ohkura, Peter J Knight, I R Gibbons, Stan A Burgess and Kazuo Sutoh. Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding" . *Nature Structural and Molecular Biology* 16, 325-333 (2009)
4. Takeshi Inoue, Takahide Kon, Reiko Ohkura, Hisashi Yamakawa, Osamu Ohara, Jun Yokota and Kazuo Sutoh. BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking. *Genes to Cells* 13, 483-495 (2008)
5. Hiyama, S., Inoue, T., Shima, T., Moritani, Y., Suda, T., Sutoh, K. Autonomous Loading/Unloading and Transport of Specified Cargoes Using DNA Hybridization and Biological Motor-Based Motility. *Small* 4, 410-415 (2008)
6. Naoko Mizuno, Akihiro Narita, Takahide Kon, Kazuo Sutoh, and Masahide Kikkawa. Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules. *PNAS* 104, 20832-20837 (2007).
7. Kenji Imamula, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh. The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein. *PNAS* 104, 16134 (2007).
8. Toshifumi Mogami, Takahide Kon*, Kohji Ito, Kazuo Sutoh. Kinetic characterization of tail swing steps in the ATPase cycle of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein. *J. Bio. Chem* 282, 21639 (2007).
9. Tomohiro Shima, Takahide Kon, Kenji Imamula, Reiko Ohkura and Kazuo Sutoh. Two modes of microtubule sliding driven by cytoplasmic dynein. *PNAS* 103, 17736-17740 (2006).
10. Setsuko Fujita-Becker, Georgios Tsiavaliaris, Reiko Ohkura, Takashi Shimada, Dietmar Manstein, and Kazuo Sutoh. Functional characterization of the amino-terminal region of myosin 2. *J. Bio. Chem.* 281, 36102-36109 (2006).
11. Tomohiro Shima, Kenji Imamula, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh. Head-head coordination is required for the

processive motion of cytoplasmic dynein, an AAA+ molecular motor. *J. Struc. Biol.* 156, 182-189 (2006)

12. Takeshi Inoue, Takahide Kon, Rieko Ajima, Reiko Ohkura, Masachika Tani, Jun Yokota and Kazuo Sutoh. MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 829-834 (2006)

13. Takahide Kon, Toshifumi Mogami, Reiko Ohkura, Masaya Nishiura & Kazuo Sutoh. ATP-hydrolysis cycle-dependent stem motions in cytoplasmic dynein. *Nature Structural and Molecular Biology* 12, 513-519 (2005).

14. Yasushi Isogawa, Takahide Kon, Takeshi Inoue, Reiko Ohkura, Hisashi Yamakawa, Osamu Ohara, Kazuo Sutoh. The N-terminal extension of MYO18A has a ATP-insensitive actin-binding site. *Biochemistry* 44, 6190-6196 (2005)

15. Takahide Kon, Masaya Nishiura, Reiko Ohkura, Yoko Y. Toyoshima, and Kazuo Sutoh. Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein, as revealed by biochemical characterizations of recombinant fragments. *Biochemistry* 43, 11266-11274 (2004)

16. Nishiura, M., Kon, T., Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima, Y. Y., Sutoh, K. A single-headed recombinant fragment of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of microtubules. *J. Biol. Chem.* 279,

22799-22802 (2004)

[学会発表]
(招待講演)(計6件)

1. Sutoh K. Dynein-The old but still mysterious motor protein. The Biophysical Society subgroup meeting (2009)
2. Sutoh K. Communication of multiple ATPase sites of the dynein motor domain. Gordon Conference on Muscle and Molecular Motors (2008)
3. Sutoh K. Biochemical Dissection of Motor Functions of Cytoplasmic Dynein. The Biophysical Society annual meeting (2007)
4. Sutoh K. Force generation by cytoplasmic dynein, a microtubule-based motor protein that belongs to the AAA+ family. The 6th International Conference on AAA proteins (2007)
5. Sutoh K. Structure and Function of Dynein, A Huge Microtubule-based AAA+ Motor. The Biophysical Society annual meeting (2006)
6. Sutoh K. Molecular mechanism of force generation by cytoplasmic dynein as revealed by fully active recombinant motor domain. Gordon Conference on Muscle and Molecular Motors (2005)

(国外学会ポスター発表) (計15件)

1. Hasegawa Y., Shima T., Kon T., Sutoh K., Sutoh K. Elucidation of structural states of dimeric motor domain of dynein using Cys-light construct. The Biophysical Society annual meeting (USA)(2009)

2. Shima T., Numata N., Kon T., Ohkura R., Higuchi H., Sutoh K. How does the two-headed dynein processively walk on a microtubule? The Biophysical Society annual meeting (USA)(2009)
3. Mogami T., Imamula K., Ohkura R., Sutoh K., Kon T. Dissection of Inter-modular Communication among Multiple Nucleotide-binding/hydrolysis Sites of Cytoplasmic Dynein. The American Society of Cell Biology annual meeting (2008)
4. Imamula K, Kon T., Ohkura R, Sutoh K. Kinetic analysis of dynein-MT interaction. Biophysical Society annual meeting (USA) (2007)
5. Shima T, Kon T., Imamula K, Ohkura R., Sutoh K. Two modes of microtubule-sliding driven by cytoplasmic dynein. The Biophysical Society annual meeting (USA) (2007)
6. Numata N, Roberts A, Burgess SA, Kon T., Ohkura, R., Knight, P. Sutoh K. Are six AAA modules sufficient to form the AAA ring of dynein? The Biophysical Society annual meeting (USA) (2007)
7. Kon T., Imamura K., Okura R., Sutoh K. Dissection of Intra-molecular Communications between the Catalytic Head and Microtubule-binding Site in the Dynein Heavy Chain. The American Society of Cell Biology annual meeting (2006)
8. Sutoh K., Mogami T., Imamula K., Ohkura R., Kon T. Roles of multiple nucleotide-binding/hydrolysis sites of the cytoplasmic dynein motor domain in microtubule sliding. The Biophysical Society Discussion Meeting (USA) (2006)
9. Kon T., Imamura K., Okura R., and Sutoh K. Dissection of Intra-molecular Communications between the Catalytic Head and Microtubule-binding Site in the Dynein Heavy Chain. The Biophysical Society Discussion Meeting (USA) (2006)
10. Inoue T, Kon T., Ohkura R, Sutoh K. Interaction of myosin VI with a transmembrane Ser/Thr kinase KPI-2. The Biophysical Society annual meeting (USA) (2005)
11. Okura R, Kon T., Shima T., Sutoh K. Active participation of the stalk coiled-coil in communication between ATPase and MT-binding sites of cytoplasmic dynein. The Biophysical Society annual meeting (USA) (2005)
12. Kon T., Mogami T, Ohkura R, Sutoh K. ATP-hydrolysis cycle dependent stem motions in cytoplasmic dynein. Biophysical Society annual meeting (USA) (2005)
13. Mogami T, Kon T., Ohkura R, Sutoh K. .Kinetic analysis of FRET changes of recombinant dynein motor domain. The Biophysical Society annual meeting (USA) (2005)
14. Inoue T, Kon T., Ohkura R, Sutoh K. Cell Biology. Interaction of myosin VI with a transmembrane Ser/Thr kinase KPI-2. The American Society

- of Cell Biology annual meeting (2004)
15. Kon T, Mogami T, Nishiura M, Sutoh K. Distinct roles of the four nucleotide-binding/hydrolysis sites in the motor activities of cytoplasmic dynein. The American Society of Cell Biology annual meeting (2004)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 和夫 (SUTOH KAZUO)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：20111453

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

昆 隆英 (KON TAKAHIDE)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号：30332620