

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07327

研究課題名（和文）微小管上を歩行する細胞質ダイニンの分子内相互作用の解明

研究課題名（英文）Interaction between two motor domains of cytoplasmic dynein stepping along microtubules revealed by cryo-electron microscopy.

研究代表者

今井 洋 (IMAI, Hiroshi)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：60391869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物の細胞内で細胞周辺部から細胞中心方向への細胞骨格である微小管に沿った細胞内物質の輸送は、主に細胞質ダイニンというタンパク質が担っている。この細胞質ダイニンは、微小管に沿ってあたかもヒトが二足歩行をするかのように、2量体として歩行運動を行い、その尾部に細胞内物質を結合して輸送を行うと考えられている。しかし、この歩行運動中の細胞質ダイニンの構造はよくわかっていない。そこで、細胞質ダイニンの構造と機能を理解する目的で、クライオ電子顕微鏡を用いて、微小管上で細胞質ダイニンが歩行するときの構造を撮影し、新しい知見を得た。また、微小管から解離した細胞質ダイニンの構造も解析し、新規の構造を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに報告されている多くの先行研究では、ヌクレオチドを、例えばADPなど1つに固定して、構造解析をしていた。本研究では、生理学的に最も意義のあるATPの加水分解サイクルが回っている状態で、微小管上を歩行している細胞質ダイニンの構造を、クライオ電子顕微鏡を用いて調べた点で、生理学的に重要な研究である。また、微小管から解離した細胞質ダイニンの構造も解析し、新たな知見を得た。細胞質ダイニンの機能にわずかにでも障害が生じると、神経変性疾患や脳の発達障害などの疾病が生じることが示唆されている。そのため、本研究で得られた知見は、これらの疾病の発症の分子メカニズムを理解する上で役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The goal of this project is to understand structure and function of cytoplasmic dynein, which steps along microtubules. In eukaryotic cells, cytoplasmic dynein transports varieties of intracellular cargoes such as mitochondria, mRNA, growth factors from cell periphery to cell center. We obtained new cryo-EM images of cytoplasmic dynein stepping along microtubules in the presence of ATP. In addition, we obtained new structure of cytoplasmic dynein, which detached from microtubules in the presence of ATP. These results would provide the structural basis of understanding of function of cytoplasmic dynein in the eukaryotic cells.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター 細胞骨格 クライオ電子顕微鏡 ナノマシーン ダイニン 微小管

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物は、真核生物、真正細菌、古細菌に分類される。このうち、真核生物の細胞内には、繊維状の細胞骨格があり、その上をモータータンパク質と呼ばれるタンパク質が細胞内物質の輸送を駆動している。細胞質ダイニンは、真核生物の細胞の細胞周辺部から細胞中心方向への輸送を行う最も主要なモータータンパク質である。細胞質ダイニンは、2量体として、細胞骨格の微小管の上を、あたかもヒトの2足歩行のように歩行していると想像されているが、その構造は明らかになっていない。細胞質ダイニンが微小管上を歩行するときに、積荷である細胞内物質を結合させて、輸送するが、その細胞内物質の例には、ミトコンドリアなどの細胞小器官や成長因子、mRNA やウイルスなどがある。この細胞質ダイニンが駆動する輸送システムに障害が生じると、神経変性疾患や細胞死、また、ガン化と強く関連することが報告されている。従って、細胞質ダイニンの運動の分子メカニズムを明らかにすることは、これらの疾病の発症の分子メカニズムを解明することに貢献できると考えられる。

細胞質ダイニンの2つのモータードメインの両方が、歩行中に、微小管から離れてしまうと、重力により微小管に再結合せずに、溶液中を漂ってしまう。これは、ナノメートルスケールのタンパク質では、水分子の振動の熱揺らぎの影響を大きく受けてしまうためである。1量体のダイニンは、ATP を与えると、すぐに微小管から解離してしまうことが報告されている。これを単に2つないただけでは、連続的な歩行運動を行うことができない。そのため、細胞質ダイニンが微小管上で歩行運動を行うためには、2つのモータードメインの両方のモータードメインが同時には離れないような相互作用の仕組みがあると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、微小管上を歩行する細胞質ダイニンがどのような仕組みで歩行運動をしているのかを理解するために、歩行中における細胞質ダイニンの2つのモータードメインの相互作用を明らかにすることである。2つのモータードメインを使って歩行するときに、片方のモータードメインが必ず微小管と結合していなくてはならないが、それをどのようにして、細胞質ダイニンが達成しているのかを解明したい。

### 3. 研究の方法

私たちは、細胞質ダイニンを、細胞内の化学エネルギーである ATP (アデノシン三リン酸)存在下で、微小管の上を、歩行運動させて、瞬間凍結し、その構造をクライオ電子顕微鏡で観察した。そして、2つのモータードメインにどのような相互作用があるのかを明らかにしたいと考えた。そのための実験系をなるべく単純化するために、天然の細胞質ダイニンの尾部を、GST (グルタチオン S トラंसフェラーゼ) で置き換えた人工2量体の細胞質ダイニンを用いた。このダイニンは、天然の細胞質ダイニンと同様に、微小管上を歩行運動できることが報告されている。この細胞質ダイニンを、細胞性粘菌 (学名 *Dictyostelium discoideum*) で発現し、そのタンパク質を精製した。また、微小管は、*in vitro* で重合した微小管を用いた。ATP が存在する条件下で、微小管に沿って、細胞質ダイニンが歩行運動を行なっているときに、その溶液を瞬間凍結した。この試料をクライオ電子顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

微小管上を歩行する細胞質ダイニンのクライオ電子顕微鏡像を多数撮影し、単粒子解析法により、3次元再構成を行なった。微小管は、チューブリンダイマーが重合した長い繊維構造をしているが、その繊維構造には極性がある。チューブリンダイマーは、アルファとベータの2つのサブユニットから構成されている。その $\alpha\beta$ が1組となり、 $\alpha\beta\alpha\beta$ と連なっているため、繊維の片方の端は、アルファサブユニットがあり、もう一方の端にはベータサブユニットがある。この繊維の端がアルファサブユニットである方をマイナス端、そして、その逆に、ベータサブユニットが端にある方をプラス端と呼ぶ。細胞質ダイニンは、プラス端側からマイナス端に向けて、歩行を行うことが知られている。そこで、細胞質ダイニンの構造を調べる前に、細胞質ダイニンが結合した微小管の極性を決定する必要がある。私たちの先行研究では、クライオ電子顕微鏡で撮影した千本の微小管の極性を1本1本決定するのに、1年間を要した。この画像処理を自動化するプログラムを作成し、千本の微小管の極性を1週間で決定できるという約50倍の高速化に成功した。これにより、画像処理できる細胞質ダイニンの粒子数を飛躍的に増やすことができるようになった。そして、本研究において、溶液を凍結するまでのヌクレオチドの条件を先行研究よりも生理学的な条件に変更した。私たちの先行研究では、微小管に細胞質ダイニンをATPが存在しない条件下で、結合させて、その後、ATPを与えて、細胞質ダイニンを微小管に沿って歩行運動させた後に凍結した。その条件よりも、微小管にATPを与えて、また、細胞質ダイニンにもATPを与えてから、両者を混合して、ATP存在下で微小管上の歩行運動を行わせた方が、ヌクレオチドなしの条件を経ないため、先行研究より生理学的な条件と考えられる。そこで、この新しい溶液条件で、クライオ電子顕微鏡のグリッドを凍結して、撮影を行なった。先行研究では、CCD (charge-coupled device)を使って、クライオ電子顕微鏡像の撮影を行

なったが、本研究では、電子直接検出器(Falcon II)を使って、クライオ電子顕微鏡像の撮影を行なった。その結果、2つのモータードメインが微小管に結合したまま、歩行運動を行なっているクライオ電子顕微鏡写真を得ることができた。これらを用いて、3次元再構成を行なった結果、微小管に結合して、ATP存在下で歩行運動している細胞質ダイニンの3次元構造を得ることに成功した。これにより、歩行運動中の2つのモータードメインの相互作用を考える上で重要なパラメーターである2つのモータードメインの3次元的位置関係が明らかとなった。

また、バックアップテーマとして、微小管から離れた細胞質ダイニンの構造をネガティブ染色電子顕微鏡法とクライオ電子顕微鏡により撮影し、その画像を解析した。実験材料には、細胞性粘菌で発現・精製した細胞質ダイニンを用い、ATP存在下で観察した。これまでに、この条件では、細胞質ダイニンは休止状態の構造を取ることが知られていたが、その休止状態の構造の構造多型を調べたところ、新規の構造を発見した。この構造を詳細に検討した結果、休止構造と微小管上を歩く構造の中間的な構造であることが示唆された。この考察をもとに、細胞質ダイニンが休止状態からどのようにして歩行を開始するかを説明する新しい仮説を提唱した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 今井洋, 昆隆英	4. 巻 70
2. 論文標題 動物細胞に共通する細胞内の輸送システム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 73-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rie Ayukawa, Seigo Iwata, Hiroshi Imai, Shinji Kamimura, Masahito Hayashi, Kien Xuan Ngo, Itsushi Minoura, Seiichi Uchimura, Tsukasa Makino, Mikako Shirouzu, Hideki Shigematsu, Ken Sekimoto, Benoit Gigant, Etsuko Muto	4. 巻 -
2. 論文標題 GTP-dependent formation of straight oligomers leads to nucleation of microtubules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1101/2020.03.05.979989">https://doi.org/10.1101/2020.03.05.979989</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuyoshi Sato, Tomotaka Shirane, Yuuko Wada, Hiroshi Imai, Shinji Kamimura	4. 巻 25
2. 論文標題 Development of phase-contrast/dark-field microscopy with scanning laser illumination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Institute of Science and Engineering, Chuo University	6. 最初と最後の頁 93-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Shioi, A. Fukunaga, R. Shimo, R. Yamamoto, H. Imai, and T. Kon.
2. 発表標題 Novel intermediate structures of cytoplasmic dynein between shutdown and active states.
3. 学会等名 日本生物物理学会 第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 R. Kanazawa, H. Imai, T. Shioi, R. Shimo, R. Yamamoto, K. Mitsuoka, and T. Kon.
2. 発表標題 Cryo-EM observation of stepping patterns of cytoplasmic dynein on microtubules with new freezing conditions.
3. 学会等名 日本生物物理学会 第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Imai, E. Muto, T. Kon.
2. 発表標題 A new negative staining EM method at high protein concentration for sample evaluation of cryo-EM single particle analysis.
3. 学会等名 NIPS EM Workshop 2018 生理研研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井洋, 中桐 侑平, Gerle, C, 武藤悦子, 栗栖源嗣, 昆隆英
2. 発表標題 高タンパク質濃度条件下のタンパク質複合体の構造を観察するための新規のネガティブ染色電子顕微鏡法
3. 学会等名 2019年生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村慎治, 今井洋, 八木俊樹, 岩本裕之, Estevez-Galego, J., Lucena-Agell, D., Diaz, J.-F. & Hermida-Merino, D.
2. 発表標題 微小管のX線繊維回折：チューブリン格子ラセン角の計測
3. 学会等名 2019年生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村慎治、今井洋、八木俊樹、岩本裕之
2. 発表標題 微小管内のチューブリン分子の安定性・可塑性・柔軟性を目安にした微細動態解析
3. 学会等名 日本動物学会・関東支部 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中原美奈、成田大樹、和田祐子、鈴木雄大、田中昂輝、今井洋、上村慎治
2. 発表標題 ラフィド藻シャトネラの遊泳停止と赤潮発生機構
3. 学会等名 日本動物学会・関東支部 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田大樹、和田祐子、中原美奈、鈴木雄大、田中昂輝、今井洋、上村慎治
2. 発表標題 シャトネラ鞭毛停止運動と赤潮発生機構
3. 学会等名 第39回エアロ・アクアバイオメカニズム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Imai and Takahide Kon
2. 発表標題 How does cytoplasmic dynein stepping along microtubules look like?
3. 学会等名 Dynein 2017 International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井洋
2. 発表標題 細胞内輸送の動力源の一つ・蛋白質「ダイニン」の不活性化状態と活性化状態の構造解析
3. 学会等名 大阪大学超高压電子顕微鏡センター医学・生物系共同利用研究報告会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Imai, Takayuki Kato, Gerle Christoph, Etsuko Muto, Kaoru Mitsuoka, Genji Kurisu, Keiichi Namba Takahide Kon
2. 発表標題 A newly developed negative stain EM method for protein complexes at high protein concentration.
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Yamamoto, Yuuhei Nakagiri, Osamu Kutomi, Hiroshi Imai, Chihong Song, Kazuyoshi Murata, Ken-ichi Wakabayashi, Takashi Ishikawa, Kazuo Inaba, Takahide Kon
2. 発表標題 Structural/functional analysis on MOT7, a novel light chain of ciliary dynein f/I1.
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Kamimura, Hiroshi Imai, Toshiki Yagi, Hiroyuki Iwamoto
2. 発表標題 Dynamic changes of tubulin dimer configurations on a scale of sub-second revealed by high flux X-ray fiber diffraction
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Yamamoto, Yuuhei Nakagiri, Osamu Kutomi, Hiroshi Imai, Chihong Song, Kazuyoshi Murata, Ken-ichi Wakabayashi, Takashi Ishikawa, Kazuo Inaba, Takahide Kon
2. 発表標題 Cryo-electron tomography revealed localization of a novel ciliary dynein subunit, MOT7.
3. 学会等名 NIPS EM Workshop 2019 生理研研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Roberts, A., Toropova, K, and Imai, H. (Editor Hirose, K.)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Jenny Stanford Publishing	5. 総ページ数 32
3. 書名 Handbook of Dynein (Second Edition)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院理学研究科 生物科学専攻 細胞構築学・昆研究室  <a href="http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/kon/">http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/kon/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	昆 隆英  (Kon Takahide)  (30332620)	大阪大学・理学研究科・教授   (14401)	



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	上村 慎治  (Kamimura Shinji)  (90177585)	中央大学・理工学部・教授    (32641)	