

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02390

研究課題名(和文) 微小管結合によるダイニン・ダイナクチン複合体の活性化機構の解明

研究課題名(英文) Structural study on the active binding of dynein/dynactin complex to the microtubule

研究代表者

栗栖 源嗣 (Kurusu, Genji)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：90294131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダイニンのストークMTBD領域とLC1さらに、チューブリンダイマーとの複合体結晶の作成に挑戦したが、微結晶は得られたものの構造決定には至らなかった。更に、ダイナクチンp150のCAP-Gly領域についても同様に、クライオ電子顕微鏡による複合体での構造解析にトライしたが、十分な解像度で構造解析を行うには至らなかった。これら構造解析に向けた挑戦の過程で、微小管結合能の高いMTBD融合タンパク質単独の結晶を得た。また、外腕ダイニン鎖のMTBD領域と軽鎖LC1の複合体構造解析より、フラップ領域を上手く利用した微小管相互作用様式を提案することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管を移動する分子モーターは、プラス端方向に移動するキネシンとマイナス端方向に移動するダイニンの2種類が知られている。キネシンの運動メカニズムについては、複数の視点で非常に詳細な情報が蓄積している。これに対しダイニンは、鞭毛・繊毛運動を駆動し、染色体分離や細胞内輸送を担う非常に重要な生体分子であるにも関わらず、モータードメインの分子サイズが380 kDaと巨大であるため、最近まで原子レベルの構造解明が遅れていた。本研究は理解が遅れていたダイニンの運動機構解明に貢献するものであり、今後の展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We attempted to crystallize a complex of dynein stalk-MTBD region with LC1 and the  $\alpha$ -tubulin dimer, but were unable to determine the structure of the complex, although microcrystals were obtained. Furthermore, the CAP-Gly region of dynactin p150 was also analyzed, after evaluating its interaction with  $\alpha$ -tubulin dimer, and then the structure of the complex was analyzed by cryo-EM. However again, the structure could not be determined at a high resolution. In the course of these structural analyses, we obtained the crystals of the much better MTBD fusion protein alone, which has high microtubule-binding capacity. In addition, from the structural analysis of the complex of the MTBD region of the outer-arm dynein  $\alpha$ -chain and the light chain LC1, we were able to propose a novel binding mode of MTBD to the microtubule utilizing the flap region.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物学 分子モーター ダイニン 微小管

### 1. 研究開始当初の背景

ここ数年、運動活性をもつダイニン重鎖の構造研究には大きな進展があり、ヌクレオチド依存的な構造変化を中心に構造的な理解が深まっていた。しかし、微小管結合状態での構造情報は電子顕微鏡による低分解能の構造情報に留まっており、微小管結合を介したダイニン・ダイナクチン複合体の活性化機構については著しく理解が遅れていた。

### 2. 研究の目的

微小管に結合したダイニンは遊離状態に比べて ATPase 活性が著しく上昇するため、微小管上結合により活性化されたダイニンの構造情報はダイニンの運動機能を理解するうえで必須の構造情報であると言える。そこでダイニン・ダイナクチン複合体の微小管結合領域に着目し、微小管を構成する  $\alpha\beta$  チューブリンドимерとの複合体結晶構造を解析するとともに、微小管結合によりダイニンが活性化される仕組みを明らかにすることを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者はダイニンのモータードメイン全体の構造解析と並行して、ストーク MTBD 領域の精密構造解析を進めてきた。ストーク MTBD の末端を人工的に改変し、S-S 結合を導入したり安定なコイルドコイルを持つタンパク質を融合したりして、ヘリックスの相対配置 (レジストリー) を固定し、微小管親和性の高い組換え体を得る事に成功していた ( $K_d = 2.9 \mu\text{M}$ )。理化学研究所・武藤悦子博士のグループから提供された昆虫細胞によるヒト組換え体  $\alpha\beta$  チューブリンドимерの発現系を用いて、結晶化用チューブリンドимерを高純度で大量に得て複合体構造解析を進めることもできていた。微小管を構成するチューブリンドимер ( $\alpha$ ,  $\beta$  鎖) は極めて重合しやすいため、これまで単結晶構造解析には不向きと考えられてきた。しかし、実際には重合阻害タンパク質 DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein) との複合体として単結晶構造解析に用いることが出来ることが知られている。我々も独自に調製した DARPin とヒト  $\alpha\beta$  チューブリンドимерの複合体構造を得る事に成功していたため、ここに高親和性の MTBD やダイナクチン p150 の微小管結合領域 CAP-Gly ドメインを混合し、複合体結晶化を進める手法を選択した。

### 4. 研究成果

(1) チューブリンドимер ( $\alpha$ ,  $\beta$  鎖)、重合阻害タンパク質 DARPin、人工的に微小管親和性を高めたダイニンストーク (AC-mDS) の 4 者についても複合体の形成が確認されており、ゲル濾過クロマトグラフィーで均一なピークとして分取することにも成功した。

(2) ダイニンのストーク MTBD 領域と LC1 さらに  $\alpha\beta$  チューブリンドимерとの複合体結晶の作成に挑戦したが、微結晶は得られたものの構造決定には至らなかった。

(3) 更に、ダイナクチン p150 の CAP-Gly 領域についても同様に、 $\alpha\beta$  チューブリンドимерと相互作用解析を行って結合能を評価したのち、クライオ電子顕微鏡による複合体での構造解析にトライしたが、十分な解像度で構造解析を行うには至らなかった (図 1)。

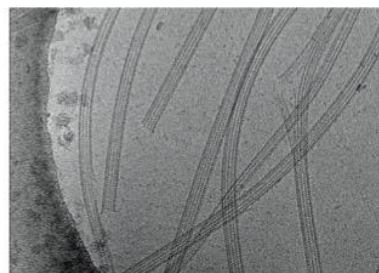


図 1. CAP-Gly-MT のクライオ電子顕微鏡写真(上)と 2D-class 平均イメージ図(下)

(4) これら構造解析に向けた挑戦の過程で、微小管結合能の高い安定な MTBD 融合タンパク質を得て、単独の結晶を得た。今後の構造解析が期待できる。

(5) 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来の軸系ダイニン軽鎖 (LC1) と軸系ダイニン外腕  $\gamma$  重鎖 (OAD  $\gamma$ ) との直接の相互作用を見るために、LC1 と OAD  $\gamma$  の微小管結合ドメイン (MTBD) との複合体 (LC1-MTBD) の構造を 1.7Å 分解能で明らかにした (図 2)。また、LC1-MTBD の立体構造を基に LC1 に部位特異的変位を導入してプルダウン実験を行い、LC1-MTBD 間の相互作用に Arg79 が重要であること、H5 ヘリックスが主に結合に寄与していること等を明らかにした。さらに、今回得られた LC1-MTBD 複合体の構造を既知の微小管-MTBD 構造に重ね合わせることで、微小管に結合した LC1-MTBD 複合体の予想複合体構造も考察した。予想複合体構造では、LC1 が直接微小管上の軌道と結合しておらず、微小管の C 末端テイル領域に結合する可能性が示された。

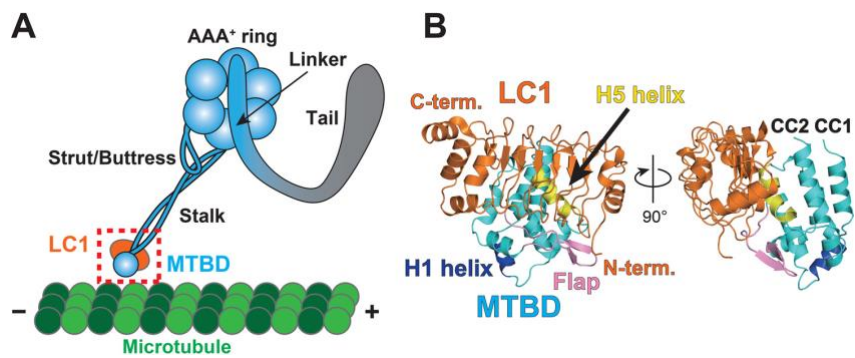


図2. LC1-MTBDの相対位置 (A) と複合体結晶構造 (B)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hanson Benjamin S., Iida Shinji, Read Daniel J., Harlen Oliver G., Kurisu Genji, Nakamura Haruki, Harris Sarah A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Continuum mechanical parameterisation of cytoplasmic dynein from atomistic simulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods	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） 10.1016/j.ymeth.2020.01.021	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Toda Akiyuki, Nishikawa Yosuke, Tanaka Hideaki, Yagi Toshiki, Kurisu Genji	4. 巻 295
2. 論文標題 The complex of outer-arm dynein light chain-1 and the microtubule-binding domain of the heavy chain shows how axonemal dynein tunes ciliary beating	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3982 ~ 3989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011541	査読の有無 有
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 Fujieda Nobutaka, Umakoshi Kyohei, Ochi Yuta, Nishikawa Yosuke, Yanagisawa Sachiko, Kubo Minoru, Kurisu Genji, Itoh Shinobu	4. 巻 -
2. 論文標題 Copper oxygen Dynamics in Tyrosinase Mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	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） 10.1002/anie.202004733	査読の有無 有
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 Toda Akiyuki, Tanaka Hideaki, Kurisu Genji	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural atlas of dynein motors at atomic resolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 677 ~ 686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-018-0402-y	査読の有無 有
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 YAGI Toshiki, TODA Akiyuki, ICHIKAWA Muneyoshi, KURISU Genji	4. 巻 61
2. 論文標題 The Complex of Outer-arm Dynein Light Chain-1 and the Microtubule-binding Domain of the Heavy Chain Shows How Axonemal Dynein Tunes Ciliary Beating	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 020 ~ 022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.020	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柳志歩, 戸田暁之, 小林琢也, 斎藤慧, 豊島陽子, 栗栖源嗣
2. 発表標題 ダイナクチンp150GluedがもつCoiled-Coil 1領域のX線結晶構造解析
3. 学会等名 生体運動班会議2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Toda, H. Tanaka, Y. Nishikawa, T. Yagi & G. Kurisu
2. 発表標題 Structural insights into complex formation of the axonemal dynein light chain-1 and OADgamma stalk
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>蛋白質結晶学研究室ホームページ  <a href="http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography/">http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography/</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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------