

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370057

研究課題名（和文） ダイニン分子の運動における複数頭部間の協同性

研究課題名（英文） Cooperation between multiple heads in moving dynein molecule

研究代表者

豊島 陽子 (TOYOSHIMA YOKO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：40158043

研究成果の概要（和文）：ダイニンは非常に巨大で複雑な双頭構造をもつが、2つの頭をどのように協調させて運動を行っているのかを明らかにすることを目標に、複数頭部間の協同性の実態を調べた。亜鉛の存在下で重合させたチューブリンは、ダイニンの結合領域が1本のプロトフィラメント上のみ露出するシート状のポリマー構造をつくる。この zinc シート上でダイニンの運動を観察したところ、微小管上と同様な速度でプロセスに運動することがわかった。このことは、ダイニン分子の双頭は、プロトフィラメントという細いトラックの上を互いの頭部が構造的に邪魔をするようなことなく、協同的に連携して一方向に進むことができることを意味する。

研究成果の概要（英文）：Cytoplasmic dynein is a two-headed microtubule (MT) motor protein. While kinesin moves by a hand-over-hand mechanism, the dynein walking mechanism is unknown. As the dynein motor domain is much larger than the step size, the two heads of dynein are thought to use multiple protofilaments of MT. Here we report dynein and kinesin motility on zinc-induced tubulin polymer (zinc-sheet), where only one protofilament can be used by motor proteins. Dynein and kinesin moved unidirectionally on a zinc-sheet at a similar velocity as MTs, demonstrating that both dynein and kinesin can walk on a single protofilament and multiple rows of parallel protofilaments are not essential for motility. These findings provide a clue as to how dynein uses the two huge motor domains for molecular walking.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：生物物理学・分子生理学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：ダイニン、微小管、分子モーター、zinc シート、プロセスィビティ、歩行モデル

### 1. 研究開始当初の背景

ダイニンは、微小管と相互作用して細胞内物質輸送、染色体移動、絨毛・鞭毛運動など種々の細胞運動を行うモータータンパク質である。細胞内の役割という点で多才であるとともに、分子機械としてモーター機能に注目したときにも単純な一方向の力発生のみでなく、状況によって振動運動、トルク発生、ギアチェンジ、On-Off 制御などの高次の機能をもつ非常に複雑なマシンである。ダイニン分子は AAA+型の ATPase ファミリーに属し、そのモータードメインは AAA 型タンパク質に特徴的なモチーフがリング状に並んだ構造をもつ。その中には複数の ATP 結合部位が存在し、それぞれ異なる役割をもつことが示唆されている。また、微小管と結合する部位はリング構造から突き出したストークの先端であり、その結合と解離は、15nm にも及ぶコイルドコイル構造を通してリング構造内の ATP 加水分解により制御されているはずである。このように、ダイニンは微小管の長軸に沿った単純な運動をするだけでも、ミオシンやキネシンなどのようなモータータンパク質のメカニズムとは異なり、これまでのタンパク質の機能と構造の常識では理解しがたいような、不思議な面をいろいろともっている。ダイニン運動機構の研究は、最近の数年間に細胞質ダイニン組換え体の発現系が確立され、その分子メカニズムの解明にメスが入るようになった。また、ダイニン 1 分子の力学計測から、ダイニンはキネシンと同様に 8nm のステップを刻むことが明らかにされた。しかし、直径が 16 nm ほどもあるモータードメインを 2 つもつ分子がどのように 8 nm のステップを刻むことができるのか、キネシンの分子構造とは全く異なるダイニンが、キネシンと同様な hand-over-hand メカニズムで運動するかどうか、まったくわかっていない。

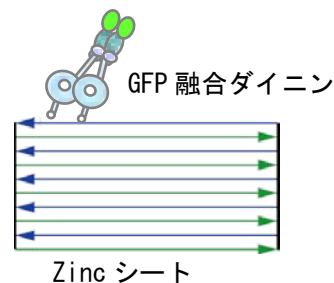
### 2. 研究の目的

本研究は、細胞運動にかかわるモータータンパク質のうち、もっとも複雑な構造をもち、かつ高次機能を有するダイニン分子の運動機構を明らかにすることを目標とする。具体的には、細胞質ダイニンの組換え体を用いて運動計測を行い、複数の頭部の変位を調べ、複数頭部間の協同性の実態を明らかにして、微小管上で力を発生する分子機械のメカニズムを理解することを目的とする。具体的には、複数の頭部をもつダイニン分子が微小管上を歩く時、何本のプロトフィラメントを使うかを明らかにする。すなわち、ダイニン頭部の大きさを考えると複数プロトフィラメントを利用することが推定されるが、ストーク

の先端(ストークヘッド)はキネシンよりも小さいので、1 本のプロトフィラメントをフォローすることも可能である。プロトフィラメント 1 本でも 1 分子ダイニンがプロセスィビに動けるかどうかを実験的に示すことにより、1 分子内の 2 つの頭部の協同性を調べる。

### 3. 研究の方法

細胞質ダイニンのうち、酵母のダイニン人工 GST ダイマーの N 末端に GFP を融合させ、全反射頭微鏡下で 1 分子観察を行った。コントロールとしてキネシンについても同様に GFP 融合タンパク質を作製した。ダイニン分子が微小管上を運動する際にプロトフィラメント 1 本で運動ができるのか、複数頭部を複数のプロトフィラメントにまたがって相互作用することにより運動しているのかを明らかにするために、ダイニンの結合領域である  $\beta$  チューブリンのヘリックス 12 付近がただ 1 列に表面に露出した重合体である Zinc シートを用いた。すでに、ガラスに固定したダイニンがこの Zinc シートを滑り運動させることを明らかにしているが、この運動再構成系では 1 本の Zinc シートに同時に複数のダイニン分子が相互作用できるので、必ずしも 1 分子ダイニンが 1 本のプロトフィラメントを利用しているとは限らない。酵母ダイニンの N 末端に GFP を融合させた組換え体は、微小管上を 1 分子でプロセスィビに運動することを確認しており、これを用いて固定した Zinc シートの一端を使って 1 分子ダイニンの運動を観察する。プロセスィビな運動が観察できれば、ダイニンの複数の頭部が 1 本のプロトフィラメントと交互に相互作用することの直接的な証明となり、双頭間の協調性が明らかになる。



### 4. 研究成果

Zinc シートは亜鉛イオン存在下におけるシート状のチューブリン重合体であるが、微小管が展開した構造とは異なり、Zinc シートの隣り合うプロトフィラメントは Zinc イオ

ンを介して逆平行かつ表裏逆に並んでいる (図 1A)。ダイニンとキネシンが結合する  $\beta$  チューブリンの H12 は Zinc イオンと結合し、隣のプロトフィラメントに埋もれてしまうために、Zinc シート的一端のプロトフィラメントにだけ露出していると考えられる。これまで Zinc シートや、Zinc シートがらせんを巻きながらチューブとなったマクロチューブとキネシンを使った滑り運動の実験などはすでに報告されているが、微小管が Zinc シートと同時に重合する可能性や、安定性に問題があったりすることから Zinc シートを使った実験は困難だった。そこで我々は、より安定で解析に耐えうる Zinc シートを作製するために Zinc イオン濃度と重合時間を試行錯誤して、幅  $200 \pm 63$  nm (図 1C)、長さ  $3.3 \pm 1.6$   $\mu$ m (図 1D) の Zinc シートを作製した。さらに電子顕微鏡観察により微小管が混ざっていないことを確認したうえで、異なる蛍光色素で標識した Zinc シートと微小管を全反射顕微鏡で観察したときにほぼ同じ本数観察されるように混ぜた溶液を電顕観察した。どちらも同等に観察されたので、顕微鏡によって Zinc シートの方が選択的に観察されやすいという可能性を排除した。つまり本実験で作製した Zinc シートの中に微小管の混入はほとんどないと考えられる。さらに Zinc シートをグルタルアルデヒドで固定した Zinc シート (GA) も作製した。GA 架橋率は微小管 (GA) が 46 %, Zinc シート (GA) が 39 %であった。

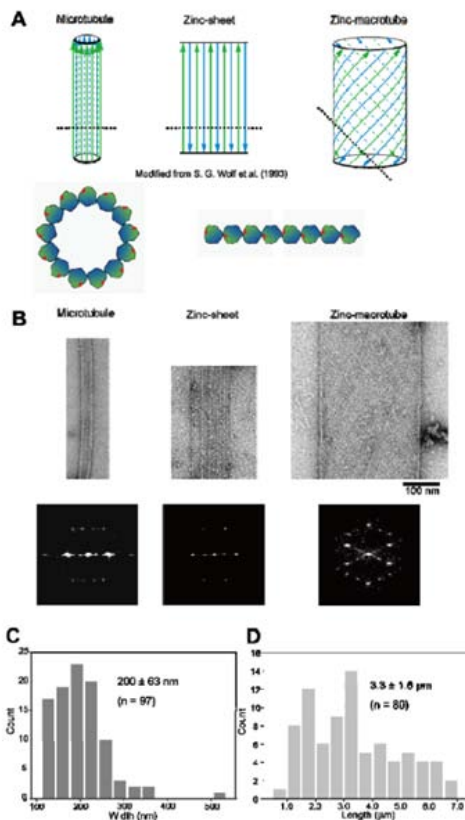


図 1

作製した Zinc シートがダイニンとキネシンの運動を支持するかどうか確かめるために、ガラスに固定した多数のモーター分子によってチューブリン重合体に滑り運動をさせる、グライディングアッセイを行った (図 2)。微小管のグライディングはダイニン・キネシンともに比較的真っすぐだったが、Zinc シートのグライディングはカーブを描いたり、回転するものが多く観察された。軌跡の平均曲率も大きくなる傾向にあり、キネシンだけでなくダイニンにおいても頻度良く運動を観察することができた (図 2A-D)。Zinc シートはリボンのような構造をしているため微小管に比べて軌跡が曲がりやすいと考えられる。本実験で観察されたカーブする軌跡は微小管のものとは大きく異なるために、混入した微小管ではなく、Zinc シートがグライディングしていることを示している。また、マクロチューブはモーターに結合したが滑り運動はしなかった。これはマクロチューブを構成するプロトフィラメント、つまりは Zinc シートの端以外のプロトフィラメントはダイニンとキネシンの運動を支持しないことを意味する。

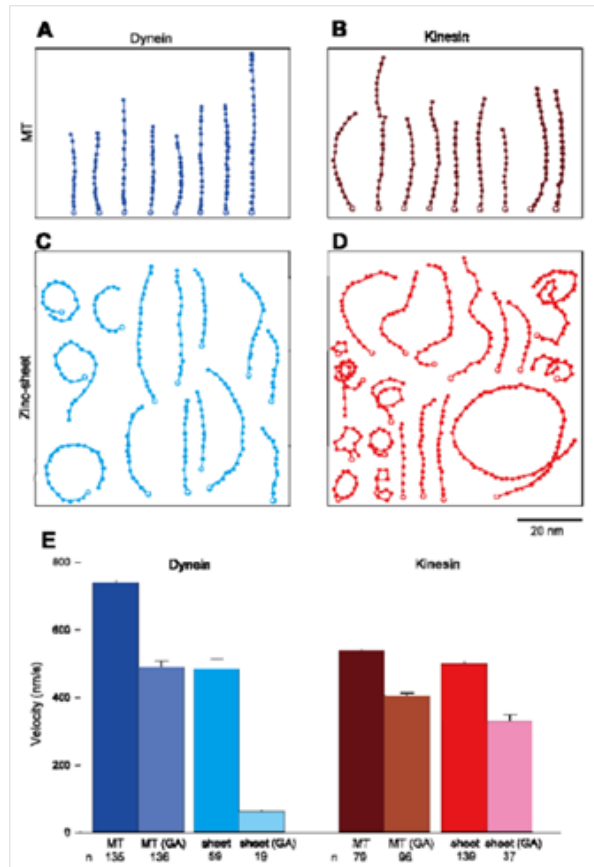


図 2

Zinc シートの端のプロトフィラメントだ

けがモータータンパク質の運動をサポートできることが分かったので、次に Zinc シート上でのモーター1分子の運動を観察し、速度を計測した。ダイニンはGFP融合酵母ダイニンを、キネシンはGFP融合ラットキネシンを用い、GFPの蛍光を全反射顕微鏡を用いて検出した。Zincシートをガラスに固定すると長さが1  $\mu\text{m}$  ほどに減少し、観察中にすぐに脱重合してしまっ。これは未重合や重合不良のチューブリンを除くための遠心処理や、運動 assay に必要な溶液条件などによって、Zincシートが壊されてしまうためだと考えられる。そこで観察にはグルタルアルデヒドで固定した Zinc シート(GA)を用いた。ダイニンとキネシンともに Zinc シート(GA)上の運動が観察され、視野中の約半数の Zinc シート(GA)が運動に使用されていた(図3A-C)。本実験において微小管が混ざっている可能性はほとんどないので、ダイニンとキネシンは Zinc シート上を運動可能であることが明らかとなった。ダイニンにおいては、MT, MT (GA), Zinc シート (GA)間で速度に違いはなかった(図3D-E)。さらにマクロチューブ上では先端や一部で結合が確認されたが運動はしなかった。

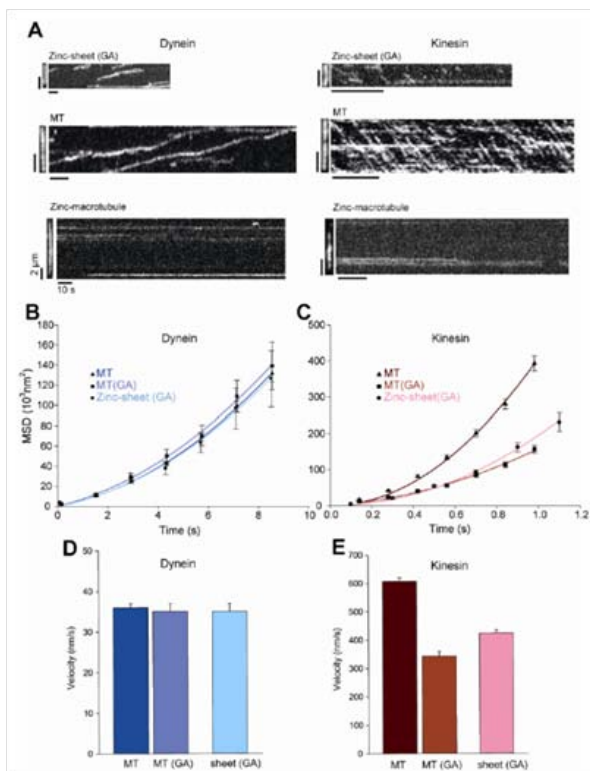


図 3

以上の結果から、ダイニンもキネシンもプロトフィラメント1本のみを使って運動が可能であることが明らかとなった。キネシンに関しては以前から微小管上のプロトフィラ

メントに沿った運動が報告されていたが、本実験によって隣のプロトフィラメントが利用できない状況でもキネシンは速度を落とすことなく運動が可能であることがわかった。これはキネシンが微小管上を運動するときは基本的にプロトフィラメント1本のみを使っていることを強く示唆する。また運動様式が分かっていないダイニンについても、微小管上と Zinc シート上で1分子の運動速度に変化がなかったことは、プロトフィラメント一本上と微小管上で運動様式が同じであることを示唆している。ダイニンの運動様式に関してモータードメインのサイズを考慮に入れると、キネシンと同じような hand-over-hand モデルで運動することは難しく、二つのモータードメインの一部が overlap したまま小股で動くような、overlapping hand-over-hand モデルで運動することが予想される。さらにダイニンは微小管上を運動するときは複数のプロトフィラメントを同時に使用したり、千鳥足で運動するなどと考えられてきた(図4)が、本研究の結果から、ダイニンは微小管中のプロトフィラメント1本上を運動している可能性が大きく、双頭間での協調した相互作用を行っていると考えられる。

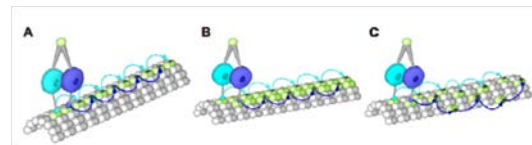


図 4

## 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 8 件)

①  
Torisawa T., Nakayama A., Furuta K., Yamada M., Hirotsune, S. and Toyoshima Y. Y. (2011) Functional Dissection of LIS1 and NDEL1 Towards Understanding the Molecular Mechanisms of Cytoplasmic Dynein Regulation *J. Biol.Chem.* **286**, 1959-1965.

②  
Miura, M., Matsubara, A., Kobayashi, T., Edamatsu, M., and Toyoshima, Y. Y. (2010) Nucleotide-dependent behavior of single molecules of cytoplasmic dynein on microtubules in vitro *FEBS Lett.* **584**, 2351-2355.



③

Arimura, N., Hattori, A., Kimura, T., Nakamura, S., Funahashi, Y., Hirotsune, S., Furuta, K., Toyoshima, Y. Y., and Kaibuchi, K. (2009) Inhibition of cytoplasmic dynein activity by CRMP-2 through a direct interaction. *J Neurochem.* **111**, 380-390.

④

Furuta, K. and Toyoshima, Y. Y. (2008) Diffusion and directed movement: In vitro motile properties of fission yeast kinesin-14 Pkl1. *J. Biol.Chem.* **283**, 36465-36473.

⑤

Yamada, M. Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., Mimori-Kiyosue, Y., Nakamura, T., Ito, mK., Fushiki, S., Setou, M., Whnshaw-Boris, A., Torisawa, T., Toyoshima, Y.Y. and Hirotsune, S. (2008) LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *EMBO J.* **27**, 2471-2483.

⑥

Taba, T., Edamatsu, M., Toba, S., Shibata, K., Imafuku, Y., Toyoshima, Y.Y., Tawada, K., and Yamada, A. (2008) Direction and speed of microtubule movements driven by kinesin motors arranged on catchin thick filaments. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **65**, 816-826.

⑦

Shimizu, Y., Kato, Y., Morii, H., Edamatsu, M., Toyoshima, Y.Y., Tanokura, M. (2008) The dynein stalk head, the microtubule binding-domain of dynein: NMR assignment and ligand binding. *J. Biomol. NMR* **41**, 89-96.

⑧

Furuta, K. and Toyoshima, Y. Y. (2008) Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling in vitro *Current Biology* **18**, 152-157.

[学会発表] (計 28 件)

①

鳥澤嵩征、渡辺裕多、中山明子、古田健也、山田正巳、広常真治、豊島陽子 (東京大学、大阪市立大学)、Functional dissection of LIS1 and NDEL1 for understanding the molecular mechanism of cytoplasmic dynein regulation. 米

国 Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore、2011 年 3 月 8 日

②

柴田桂太郎、三浦未知、渡辺裕多、西村敦子、枝松正樹、豊島陽子 (東京大学)、Single protofilament is enough to support unidirectional walking of cytoplasmic dynein, 米国 Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, 2011 年 3 月 8 日

③

渡辺裕多、北井敏幸、小林琢也、村山尚、高萩隆行、豊島陽子 (東京大学、広島大学、順天堂大学)、Structural analysis of cytoplasmic dynein tail domain, 米国 Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, 2011 年 3 月 8 日

④

古田健也、豊島陽子、小島寛明、大岩和弘 (通信総合研究所、東京大学) Reconstitution of collective transport by defined numbers of kinesin-1 and kinesin-14, two opposing motor proteins, 米国 Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, 2011 年 3 月 8 日

⑤

柴田桂太郎、三浦未知、渡辺裕多、西村敦子、枝松正樹、豊島陽子 (東京大学)、Single protofilament is enough to support unidirectional walking of cytoplasmic dynein, 日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 20 日

⑥

北井敏幸、渡辺裕多、豊島陽子、小林琢也、村山尚、坂上浩之、鈴木一志、高萩隆行 (広島大学、東京大学、順天堂大学)、Development of a new method to synthesize functional gold nanoparticles for labeling a protein, 日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 20 日

⑦

渡辺裕多、北井敏幸、小林琢也、村山尚、高萩隆行、豊島陽子 (東京大学、広島大学、順天堂大学)、Electron microscopic observation of cytoplasmic dynein using gold nanoparticles, 日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 20 日

⑧

村山尚、小林琢也、渡辺裕多、豊島陽子、北井敏幸、高萩隆行 (順天堂大学、東京大学、広島大学)、Dynamic behavior of dynein-dynactin in living mammalian cells

visualized by multifunctional GFP tag, 日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 20 日

⑨ 鳥澤嵩征、市川宗蔵、小林琢也、村山尚、豊島陽子 (東京大学、順天堂大学)、Diffusive movement of a single-molecule mammalian cytoplasmic dynein, 日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 22 日

⑩ 井川泰二、塩澤雅人、毛利誠、成田真美子、星野文彦、渡辺修、枝松正樹、豊島陽子 (豊田中央研究所、東京大学)、A sarucomere-mimetic gel: Gelation of astral-shaped actin filaments with their plus end connected on photopolymer beads by myosin filaments, 日本生物物理学会第 48 回年会、仙台、2010 年 9 月 20 日

⑪ 豊島陽子 (東京大学)、Dynein in the coordinated system. 日本生物物理学会第 47 回年会、徳島、2009 年 11 月 1 日

⑫ 柴田桂太郎、古田健也、枝松正樹、豊島陽子 (東京大学、通信総合研究所)、Motility of single molecules of kinesin and cytoplasmic dynein in the presence of many molecules of motor proteins on microtubules. 日本生物物理学会第 47 回年会、徳島、2009 年 10 月 30 日

⑬ 古田健也、豊島陽子、小嶋寛明 (通信総合研究所、東京大学)、DNA-templated assembly of multiple motor protein complexes. 日本生物物理学会第 47 回年会、徳島、2009 年 10 月 30 日

⑭ 鳥澤嵩征、山田正巳、広常真治、豊島陽子 (東京大学、大阪市立大学)、LIS1 regulates dynein motility in a dimerization-dependent manner. 日本生物物理学会第 47 回年会、徳島、2009 年 10 月 30 日

⑮ 豊島陽子 (東京大学)、Properties of dynein motility analyzed with recombinant molecules. 日本生物物理学会第 46 回年会、福岡 2008 年 12 月 4 日

⑯ 岩崎聡、枝松正樹、Nguyen Hoa Anh、古田健也、樋口秀雄、豊島陽子 (東京大学)、

Unbinding force of cytoplasmic dynein-microtubule interaction. 日本生物物理学会第 46 回年会、福岡 2008 年 12 月 3 日

⑰ 鳥澤嵩征、古田健也、枝松正樹、山田正巳、広常真治、豊島陽子 (東京大学、大阪市立大学)、Molecular mechanism of the regulation of cytoplasmic dynein motility by LIS1. 日本生物物理学会第 46 回年会、福岡 2008 年 12 月 3 日

⑱ 柴田桂太郎、古田健也、枝松正樹、井川泰二、塩澤雅人、成田真美子、渡辺修、豊島陽子 (東京大学、豊田中央研究所)、Motility assay of single dynein molecules on immobilized microtubules on azopolymer. 日本生物物理学会第 46 回年会、福岡 2008 年 12 月 3 日

⑲ 古田健也、豊島陽子 (東京大学)、Force production and processive movement by a defined number of nonprocessive motor proteins. 日本生物物理学会第 46 回年会、福岡 2008 年 12 月 5 日

〔図書〕(計 2 件)

① 豊島陽子 (分担執筆)、東京化学同人生物学辞典 (2010) ダイニン、ミオシン、チューブリンなど 20 項目

② 豊島陽子 (分担執筆)、羊土社分子生物学イラストレイテッド (改訂第 3 版) (2009) 「モータータンパク質」 187-191.

〔その他〕

ホームページ等

<http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/labs/toyoshim/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊島 陽子 (TOYOSHIMA YOKO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授  
研究者番号：40158043

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

枝松 正樹 (EDAMATSU MASAKI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教  
研究者番号：60251328

(H20-H21 の間、参加)