

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20687011

研究課題名（和文）ダイニンの構造解析に基づいた、AAA 型分子モーター作動機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of AAA-type molecular motors, based on structural analysis of the dynein heavy chain

研究代表者

昆 隆英 (KON TAKAHIDE)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：30332620

研究成果の概要（和文）：

ダイニンは、多種多様な細胞運動のエンジンとしてはたらく巨大モータータンパク質複合体である。しかし、このエンジン自身がどのような仕組みで動いているのかという根本的な問いについては、半世紀近い研究にもかかわらず、多くの未解決問題が残されているのが現状である。研究代表者は、本研究課題においてダイニン分子の結晶化を達成し、X 線結晶構造解析法により 5 Å 分解能での構造情報を得ることに成功し、この巨大な分子モーターの運動機構について、その仕組みの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Dyneins are enormous motor complexes that power a wide variety of cellular motility. However, the mechanism by which dynein generates force and movement still remains unclear. Here, we have succeeded in crystallizing dynein molecules and obtained dynein's structural information at 5 Å resolution. This study provides a structural basis for understanding the mechanism of action of the dynein motor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	19,300,000	5,790,000	25,090,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：分子モーター、ナノマシン、酵素反応、生物物理学、構造生物学

1. 研究開始当初の背景

本研究課題は、いまだに謎に包まれている、分子モーター「ダイニン」の運動機構を明らかにすることを目標としたものである。ダイニンは分子量 1,000 kDa を超える巨大タンパク質複合体で、ATP 加水分解を利用することで微小管上を滑り運動する分子モーターである。この分子モーターは分子シャペロンやヘリカーゼを含む AAA+ (ATPases

associated with diverse cellular activities) ファミリーに属し、G タンパク質型分子モーターであるミオシンやキネシンとは全く異なる進化的・分子形態的特徴を示す。

1960 年代に鞭毛運動を担う分子モーターとして同定されて以来、ダイニンは、微小管に依存した様々な細胞内運動—細胞分裂、細胞運動、細胞内物質輸送、鞭毛・繊毛運動等—に重要な役割を果たすことが明らかにされ

てきた。このように多種多様な細胞機能に関与するダイニンの運動活性は、どのような分子機構により発揮されるのだろうか？この本質的な疑問に答えるために、ダイニンの発見以来 40 年以上にわたり精力的な研究が継続されてきたが、いまだにわたしたちの知識は不十分である。他の細胞骨格系分子モーターであるミオシンやキネシンに比べて、ダイニンの運動機構研究は大きく遅れている。しかし、ごく近年になって、そのブレークスルーとなる 2 つの大きな技術的進展が報告された。ひとつは電子顕微鏡観察技術の向上により、ダイニンのヌクレオチド依存的な 2 つの構造状態が検出され (Burgess et al., *Nature* 421, 715 (2003))、力を生み出すダイニンの構造変化について重要なヒントが得られたことである。もうひとつの進展は、運動機構解明に必須なダイニンの遺伝子組換え発現系が、世界に先駆けて研究代表者らにより確立され (Nishiura et al., *J. Biol. Chem.*, 279, 4696 (2004))、従来は不可能であった分子解剖的手法による運動機構研究が可能となったことである。このような技術的進展により、ダイニンの運動機構研究は、構造と機能の両面からのアプローチが可能で、新たな段階に入ったといえよう。また、組換え発現系によりダイニンの取り扱いが容易となったことで、複数の欧米研究グループがダイニンの運動機構研究に参入を開始しており、国際的な激しい競争が予想される状況にあった。

2. 研究の目的

ダイニンの運動機構を明らかにするためには、構造と機能の両面からのアプローチが重要である。しかし、ダイニンの構造についてのわたしたちの知見は、主にネガティブ染色電子顕微鏡像に依存しているのが現状であり、運動機構を議論するためには信頼性及び分解能が不十分であった。したがって研究開始時点での最重要課題のひとつは、ダイニンの構造的特徴及び、ATP 加水分解過程における構造変化をより高分解能で明らかにすることであった。本研究では、これまでのダイニン研究の成果を発展させ、機能面での解析を進めるとともに、構造面での研究を強力に推進することで、ダイニンの滑り運動機構を明らかにすることを目的とした。具体的目標を以下に述べる。

(1) X 線結晶構造解析によりダイニンの構造情報を高分解能で得る。ダイニンは、巨大なタンパク質複合体であること、構造の一部が比較的柔軟であることから、結晶化が非常に困難であるとされてきた。しかし、研究代表者らはこの問題に取り組み、ダイニンモータードメイン (分子量 380 kDa) の結晶化に最近成功した。本研究では、その構造解析を成功させ、運動機構の議論が可能な構造情報

を得ることを目標とする。

(2) 電子顕微鏡像再構成法によりダイニンの構造変化を捉える。ダイニンの X 線結晶構造解析を補完するために、構造解析のもうひとつのアプローチである電子顕微鏡像再構成法によるアプローチを採用する。本プロジェクトの目標は、ダイニンの ATP 加水分解過程における構造変化を捉えることである。ダイニンを構成する各サブドメインの位置関係がどのように変化するかを明らかにすることが重要課題である。

(3) 分子解剖的アプローチによりダイニンモーターの機能解析を行う。ダイニン変異体と 1 分子・多分子運動活性評価系を組み合わせることで、ダイニンの運動機構に重要であると考えられるサブドメインの機能解析を行う。本研究はプロジェクト(1)、(2)と密接に関連しており、構造解析の結果得られた情報を基に変異体のデザインを行うことで、ダイニン運動機構の構造機能相関を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) ダイニン重鎖の結晶構造解析

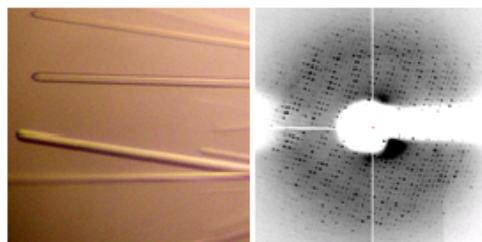


図 1. ダイニン重鎖の結晶と X 線回折像

研究代表者は、細胞性粘菌由来の細胞質ダイニンを細胞性粘菌細胞で高発現させることで、組換えダイニンを得ることに成功しており、本研究の予備検討により、実際にその結晶化に成功している (図 1)。しかし、得られている結晶の X 線回折能は限定的で、現段階では 6.3 Å のデータセットが取得可能な状態にある。2 次構造レベルの構造解析を行うためには 4-6 Å、全原子モデルを構築するためには 3.5 Å 以上のデータが要求されるため、構造解析を成功させるためには分解能の大幅な改善が必要である。本研究では、発見・精製、結晶化、結晶化後処理、クライオ条件、X 線回折データ収集の各ステップについてさらなる検討を重点的に行い、分解能向上をめざす。このプロジェクトはタンパク質結晶構造解析の専門家である栗栖源嗣博士 (阪大・蛋白研) から支援を受ける。具体的には、ダイニン発見精製・結晶化は研究代表者が行い、X 線構造解析は栗栖博士から支援を受けつつ研究代表者が遂行する。

(2) ダイニン重鎖の電子顕微鏡解析
結晶構造解析による構造情報を補完する目的で、ダイニン重鎖構造解析を電子顕微鏡像再構成法により行う。このプロジェクトは、研究協力者である Stan Burgess 博士 (英国 Leeds 大学) との共同研究により遂行する。具体的には、ダイニン重鎖の設計・発現・精製は研究代表者が行い、電子顕微鏡解析は Burgess 研で行う。まず、apo (ヌクレオチドなし)状態を対象とした解析を行い、ダイニン重鎖内のサブドメインと一次配列との対応をつける。次に、apo 状態とは構造が大きく異なると予想される ADP/Vi 状態の構造解析を行い、ダイニンを構成する各サブドメインの位置関係が ATP 加水分解過程においてどのように変化するかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ダイニン組換え体の発現精製系改良
ダイニンはその巨大さから、組換え体発現系を構築することが従来非常に困難であった。研究代表者らは細胞性粘菌発現系を利用することで、モーター活性を維持した組換えダイニンを得ることに初めて成功している。本研究ではこの発現・精製系の全面的改良を行い、十分なモーター活性 (90%以上の分子がアクティブ) をもつモータードメインを大量 (2-10mg) かつ安定して得ることが可能なシステムを確立した。また、代謝工学的手法を適用することで、セレノメチオニン等の非天然アミノ酸を導入したダイニンの発現系構築にも成功した。これらの系は後述するダイニン構造研究の重要な基盤技術となった。

(2) 電子顕微鏡像再構成法によるダイニン重鎖内のサブドメインマッピングと構造変化検出

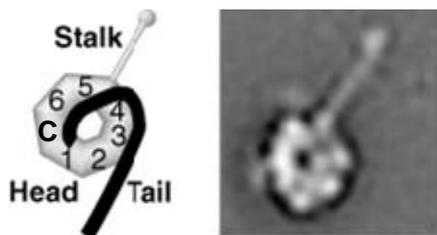


図 2. ダイニン重鎖の模式図と電顕像

図 2 はダイニン重鎖の電子顕微鏡像とその模式図を示したものであるが、ヘッド内のサブドメイン AAA1-AAA6 の位置関係は実際には不明であり、その相対的位置関係を明らかにすることは運動機構を理解する上で重要である。本研究では、ダイニン内のさまざまな位置に GFP を挿入することで、モーター活性を維持したまま、空間的目印を持つ組換えダイニンを 7 種類作成した。これらに対してネガティブ染色電顕・2D 単粒子解析を行うことで、6 個の ATP 加水分解ユニットの位置

を確定した。その結果は、従来の構造モデル

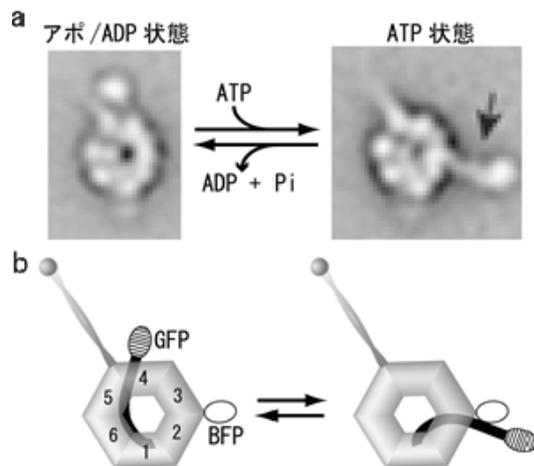


図 3. ダイニンドメイン構造と構造変化

雑誌論文④より複製©2009 Elsevier Inc.

を否定し、ダイニンのリング構造が 6 個の AAA+モジュールのみで構成され、これらが図 3 に示す位置関係にあることを明らかにした。また、ATP 加水分解過程でテール部位が AAA2 近傍から AAA4 近傍へと大きくスイングすることも明らかにした。これらの結果は、低分解能レベルでのダイニンの構造と構造変化について、現在幅広く受け入れられているモデルの基盤となっている。

(3) 分子解剖的アプローチによるダイニンモーターの機能解析

本研究課題ではダイニンの機能解析についてふたつの成果を上げた。ひとつは、ダイニン内の ATP 加水分解部位と微小管結合部位との間の分子内情報伝達機構を明らかにしたことである。細胞骨格系分子モーターが運動するためには、その ATP 加水分解過程とトラックへの結合解離を共役させること重要である。本研究では、ダイニン内でこの共役を担うのはストークと呼ばれる長い (10-15 nm) コイルドコイルであり (図 2 参照)、コイルドコイル内のわずかな構造変化により情報が伝達されることを直接示した。

もうひとつの研究成果は、ダイニンのリング構造を裏打ちしている C-sequence と呼ばれるサブドメインの機能を明らかにしたことである。ダイニンが微小管上を連続歩行する際に 2 個のモータードメインが協同的に機能することが必須であるが、本研究では、この協同性に C-sequence が重要であることを直接示した。

(4) ダイニン重鎖の結晶構造解析

ダイニンモータードメインは分子量約 38 万の巨大モーターユニットであり、その巨大さと分子としての柔軟さから、従来、高分解能構造解析に必須な結晶化がきわめて困難であ

るとされてきた。研究代表者らは、本研究課題において、モータードメイン全領域について良質な結晶を得ることに成功し、X線結晶

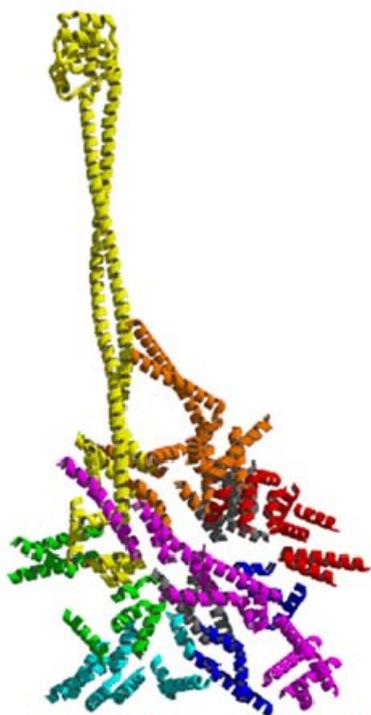


図4. ダイニンモータードメインの全体構造

構造解析法により 5 Å 分解能での構造情報を得ることに成功した (図 4)。また、この構造情報を基に、ダイニンが微小管上を運動する際に鍵となるメカニズム—微小管結合部位と ATP 加水分解部位との間の分子内情報伝達機構—について詳細な構造モデルを構築した。これらの研究成果は、新規かつ重要な研究成果を発表する場である米国 Biophysical Society の”New and Notable” symposium において招待講演として発表した。ダイニンの運動メカニズムを解明するためには、原子分解能 (3.5 Å 以上) でその構造を決定する必要があるが、本研究によってこの課題を達成するための基盤は確立されたと言えよう。

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)

- ① Numata, N., Shima, T., Ohkura, R., Kon, T., Sutoh, K.
C-sequence of the Dictyostelium cytoplasmic dynein participates in processivity modulation
FEBS Lett. 2011, 585:1185-1190, 査読有
- ② Kon, T., Shima, T., Sutoh, K.

Protein engineering approaches to study the dynein mechanism using a *Dictyostelium* expression system.
Methods Cell Biol. 2009, 92:65-82.
査読無

- ③ Kon, T., Imamula, K., Roberts, A.J., Ohkura, R., Knight, P.J., Gibbons, I.R., Burgess, S.A., Sutoh, K.
Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding.
Nature Struct. Mol. Biol. 2009, 16(3):325-333, 査読有
- ④ Roberts, A.J., Numata, N., Walker, M.L., Malkova, B., Kon, T., Ohkura, R., Arisaka, F., Knight, P.J., Sutoh, K., Burgess, S.A.
AAA+ ring and linker swing mechanism in the dynein motor.
Cell. 2009, 136(3):485-495, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takahide Kon
“Crystal Structure of the Dynein Motor Domain at 5 Å Resolution”
“New and Notable” Symposium at the Biophysical Society 55th Annual Meeting, March 6, 2011, in Baltimore, Maryland. 招待講演.
- ② Takahide Kon
“ATPase kinetics and processivity of cytoplasmic dynein”
International Symposium on Single Molecule Nano Detection and Its Application to Life Science. Awaji Yumebutai International Conference Center. 2010.4.17. 招待講演.
- ③ 昆 隆英
“細胞性粘菌を用いたダイニンの運動メカニズム研究”
日本農芸化学会 2010 年度大会. 東京大学. 2010.3.30 招待講演.
- ④ Takahide Kon
“Dissection of intramolecular communications between the catalytic head and microtubule-binding domains in the dynein heavy chain”
ional Workshop Dynein 2009. 神戸ファッション美術館オルビスホール. 2009.11.2 招待講演.
- ⑤ Takahide Kon

“Molecular dissection of cytoplasmic dynein”

第 46 回 日本生物物理学会年會. 福岡国際會議場. 2008.12.4 口頭発表.

⑥ Takahide Kon

“Structure and mechanochemical cycle of cytoplasmic dynein”

2nd International Symposium on Bio-nanosystems. Koshiba Hall, the University of Tokyo, Hongo, Tokyo, Japan. 2008.11.1 招待講演.

[図書] (計 1 件)

① Shima, T., Sutoh, K., Kon, T.,

Functional analysis of the dynein motor domain.

In Handbook of Dynein (Amos, L and Hirose, K., Eds), Pan Stanford Publishing Pte Ltd. In press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

昆 隆英 (KON TAKAHIDE)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号 : 30332620