

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770118

研究課題名（和文） 細胞質ダイニンのストークドメインの構造研究

研究課題名（英文） Structure analysis of cytoplasmic dynein stalk domain

研究代表者

志波 智生 (SHIBA TOMOO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80401206

研究成果の概要（和文）：モータ蛋白質であるダイニンの微小管の認識メカニズムを明らかにするためにマウスダイニンストークドメインの結晶化条件の探索を行ったところ、単結晶を得ることに成功した。セレノメチオニン化した蛋白質を作成し、多波長異常分散法で解析を行ったところ coiled-coil の領域の部分構造を得ることができた。得られた部分構造は、報告されている構造と比較するとセレンの異常分散効果から計算されるメチオニン残基の位置がずれていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In order to reveal the recognition mechanism of the microtubule by motor protein dynein, I have searched the crystallization condition of the mouse dynein stalk domain and could obtain single crystals. I prepared the selenomethionine-substituted protein and collected the diffraction data of the crystals using Synchrotron Radiation (2.8 Å resolution). Initial phase are calculated by the multiwavelength anomalous dispersion (MAD) method, I could obtain the partial model of the protein (coiled-coil region). The model revealed that the positions of the methionine, which are calculated by using the anomalous dispersion signal of the selenium, are shifted those of the reported crystal structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：モーター蛋白質、X線結晶構造解析、多波長異常分散法、セレノメチオニン、ダイニン、微小官

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞質ダイニンは、キネシンやミオシンと同じモータータンパク質の1つで、微小管上をマイナス端方向に移動し、細胞内小胞輸送、細胞分裂時における染色体の分離など、多様な生物学的役割を担っている。ダイニン分子は、モーター活性のある巨大なサイズのダイニン重鎖（分子量約 500kDa）と数種の中間鎖（分子量約 80kDa）、及び軽鎖（分子量約 20kDa）から構成される超分子複合体である。これら 3 種類のモータータンパク質は、微小管またはアクチンフィラメント上を移動するという点で同じであるが、ダイニンのみが、AAA（ATPases Associated with various cellular Activities）ファミリーに属している。また、キネシン、ミオシンに関しては、モータードメインの結晶構造が明らかにされており、モーターの機能発現に関する構造的基盤が確立されている。

(2) ダイニン重鎖はダイニンの骨格を形成し、かつ ATP の加水分解エネルギーを運動に変化する機能を持つ。電子顕微鏡による構造研究や、最近可能になった運動活性を有する組み替え体を用いた変異実験により以下のことが分かっている。

重鎖のアミノ末端が柄の部分（テイル）となり、ダイマー形成や、他のダイニン形成分子との相互作用を担う。中央部からカルボキシル末端にかけてはリング状の頭部を形成し、6 個の AAA ファミリーに属する AAA ドメインと C 末ドメインが真ん中に穴のあいたコアドメインを形成している。AAA ドメイン 4 と 5 の間に存在する数百アミノ酸残基程度の領域がストークとして突き出た部分となって微小管と相互作用する（図 1）。

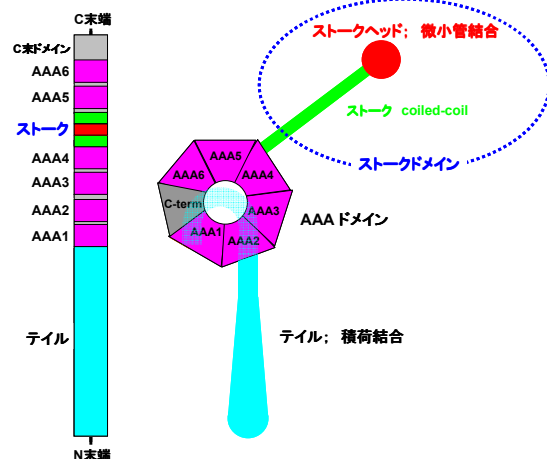


図 1: ダイニン重鎖の模式図

(3) Burgess, Oiwa 等は、ATP の加水分解エネルギーにともなうコアドメインの構造変化によりテイル、ストークの相対配置が繰り返し変化するウインチ機構を提唱している（Burgess *et al.*, *Nature*, 2003）。また、Kon, Sutoh らは、同様の構造変化を FRET 法により確認している（Kon *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005）。このように、ダイニン重鎖のモーター運動について、近年劇的に構造情報が蓄積されてきているが、X 線、NMR などの原子レベルでの構造解析は全く報告されていない（2008 年の終りに明らかになった酵素である SRS (seryl tRNA-synthetase) とダイニンのモータードメインのストークドメインを融合させた蛋白質の構造解析が最初の例である；Carter *et al.* *science*, 2008）。

(4) 研究開始当初、coiled-coil 領域を含むマウスダイニンストークドメインを大腸菌で大量発現・精製・結晶化には成功していたが、構造決定にはいたっていなかった。構造決定には、結晶化条件の精密化や結晶の凍結法などの改良、効率の良い X 線回折強度データの収集、位相決定法の改良などが必要であり、これらのことを踏まえて研究を開始した。

(4) 研究開始当初、coiled-coil 領域を含むマウスダイニンストークドメインを大腸菌で大量発現・精製・結晶化には成功していたが、構造決定にはいたっていなかった。構造決定には、結晶化条件の精密化や結晶の凍結法などの改良、効率の良い X 線回折強度データの収集、位相決定法の改良などが必要であり、これらのことを踏まえて研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、coiled-coil 領域を含むマウスダイニンストークドメインの結晶構造を原子レベルで明らかにすることを目的としている。

(2) 微小管に結合しているストークヘッドの電子顕微鏡の像と決定した結晶構造を重ね合わせて、微小管との相互作用様式を明らかにする。得られた構造に基づく変異体タンパク質を作成し、微小管との結合実験などから、ダイニンの微小管に対する詳細な認識メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) coiled-coil 領域を含むマウスダイニンストークドメインの結晶化条件の精密化を行う。また同時に結晶の凍結法などについても検討する。

(2) 位相決定のために、様々な重原子誘導体結晶を作成すると同時に、セレノメチオン化した蛋白質の結晶も作成する。

(3) シンクロトロン放射光を用いて、native 体、重原子誘導体、セレノメチオン体の結

晶の X 線回折強度データを収集する。

(4) 様々なプログラムを用いて、位相を決定し、構造解析を行う。

(5) 得られた構造と今までに得られている知見からダイニンの運動メカニズムを考察する。

4. 研究成果

(1) マウスダイニンストロドメインの精製・結晶化の改良

結晶を改良するために様々な長さのマウスダイニン微小官結合領域(図 2 の赤色の領域)を含むコンストラクトを発現・精製したところ(1-277, 58-211, 72-207, 1-258, 1-262, 1-269; 最初に作成した 1-277 の N 末端のリジン残基を 1 とした)、結晶を得ることができたものは 1-269 と 1-277 のコンストラクトだけであった。

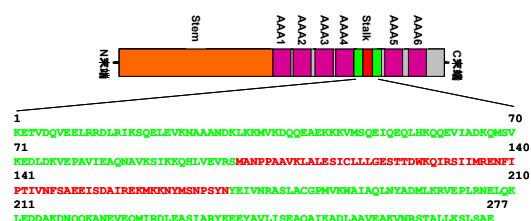


図 2: 結晶化に用いたコンストラクト

1-277 の方が結晶化の再現性が良いためにこのサンプルを用いて実験を行うことにした。位相決定の事を考えて、1-277 のセレノメチオニン(SeMet)体蛋白質を作成して様々な結晶化条件を探索したところ、結晶化条件の探索を行ったところ、以下の条件で図 3 のような結晶を再現性良く得ることに成功した。

結晶化条件

リザーバーの組成: 14% ポリエチレングリコール 4000, 0.2 M ギ酸カリウム, 5% エチレングリコール, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH=5.0)

蛋白質濃度: 10 mg/ml

サンプル緩衝液: 10 mM Tris 緩衝液 (pH=8.0), 500 mM NaCl, 5 mM DTT

結晶化温度: 4°C

結晶化に要する時間: 5 日

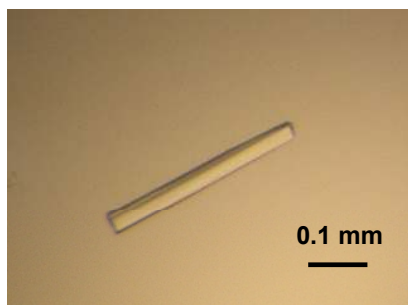


図 3: セレノメチオニン体蛋白質の結晶

(2) X 線回折強度データの収集

得られた結晶の X 線回折強度データの収集

のために、抗凍結剤の検討を行った。得られた結晶は、非常にもろく様々な条件(抗凍結剤の種類と濃度を変えた)の抗凍結剤入りの結晶化溶液に移しかえると結晶が割れたり曲がったりして良好な回折イメージを得ることができなかつた。そこで、結晶をドロップの状態ですべて脱水処理することで比較的良好な回折イメージを得ることができた。

具体的には、リザーバー内の PEG4000 とエチレングリコール (EG) の組成を (14% PEG4000, 5% EG→20% PEG4000, 10% EG→25% PEG4000, 15% EG→30% PEG4000, 20% EG) のように徐々に高めていき(各段階で約 1 日間かけて処理を行った)、ドロップ中の水分を減少させていき、最終的にはドロップから直接結晶を取り出して X 線回折実験に用いた。

得られた X 線回折イメージを図 4 に示す。

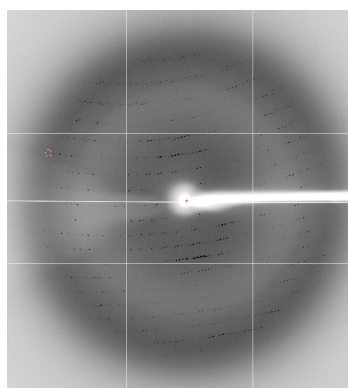


図 4: SeMet 体結晶の X 線回折イメージ

これまでに数百個の結晶を用いてデータを測定してきたが、その中で最高分解能の結晶学的データとデータ測定の統計値を表 1 に示す。

Space group	$P3_1$	
Cell dimensions		
$a/b/c$ (Å)	180.1/180.1/48.5	
Beam line	KEK PF BL-5A	
Wave length (Å)	0.97909	
Resolution	2.8	(2.86-2.8)
R_{merge} (%)	5.9	(46.8)
Completeness (%)	98.9	(97.5)
I/σ	21.8	(2.4)

表 1: SeMet 体のデータ測定の統計値

(3) 位相決定の試み

様々な条件下(ビームライン、結晶化条件、脱水方法、露光時間、振動角度、波長、測定方法などを変えた)で測定した約 50 種類の SeMet 体結晶の回折強度データを用いて、位相決定を試みた。位相決定には、多波長異常分散法 (MAD 法) や単波長異常分散法 (SAD 法) で様々な解析ソフト (SOLVE/RESOLVE, SHARP, SHELEX C/D/E) を用いて計算を行った。(2) で述べたドロップの脱水方法で処理

した結晶を用いて、inverse beam setting (MAD 法で測定するとき、測定波長と測定角度を以下のように変えて測定する ; peak: 0-5° →peak: 180-185° →edge: 0-5° →edge: 180-185° →rH: 0-5° →rH: 180-185° →...) で測定を行った場合の MAD 法で計算したときのみで coiled-coil の領域と思われる棒状の電子密度を得ることができた。これは SeMet 体の結晶は非常に X 線損傷が激しく、inverse beam setting で効率よく異常分散の効果が増大するように測定したことが良好な結果を与えたものと考えられる。

coiled-coil 状の電子密度が得られた MAD データの統計値を表 2 に示す (測定したビームラインは、KEK-PF-NW12)。

Peak ($\lambda=0.97923\text{\AA}$)		
<i>a/b/c</i>	179.4/179.4/49.5	
Resolution (\AA)	2.9	(3.0-2.9)
Rmerge (%)	7.6	(74.1)
Completeness (%)	99.9	(99.2)
<i>I</i> / σ	10.8	(1.7)
Edge ($\lambda=0.97934\text{\AA}$)		
<i>a/b/c</i>	179.4/179.4/49.5	
Resolution (\AA)	2.9	(3.0-2.9)
Rmerge (%)	7.5	(72.5)
Completeness (%)	99.9	(99.4)
<i>I</i> / σ	10.9	(1.8)
Remote H ($\lambda=0.96411\text{\AA}$)		
<i>a/b/c</i>	179.4/179.4/49.5	
Resolution (\AA)	2.9	(3.0-2.9)
Rmerge (%)	7.3	(70.9)
Completeness (%)	100.0	(99.8)
<i>I</i> / σ	11.2	(1.9)

表 2 : SeMet 体の MAD データの統計値

表 2 のデータを用いて、SHELEX C/D/E を用いて計算した電子密度図の 1 部分を図 5(A) に示す。

図 5(A) の青色で示されているのは、(2*F*₀-*F*_c) を係数とする電子密度図 (1 σ レベル) で、紫色で示されているのは、セレンの吸収端の波長で計算された異常分散差フーリエ電子密度図 (6 σ レベル) でセレン原子の位置に対応している。このように、coiled-coil の領域では比較的明瞭な電子密度を得ることができたが、その他の領域 (微小官結合部位など) では電子密度は不明瞭であり、分子全体の構造決定を行うことはできなかった。

(4) 得られた部分構造からの考察

得られた coiled-coil の領域の電子密度からヘリックスの向きとセレンの吸収端の波長で計算された異常分散差フーリエ電子密度からメチオニン残基の位置が分かったため、メチオニンに対応する位置を推定した。図 5 (A) に電子密度とヘリックスの向きを、

(B) に coiled-coil 上での対応するメチオニンの位置を示した。

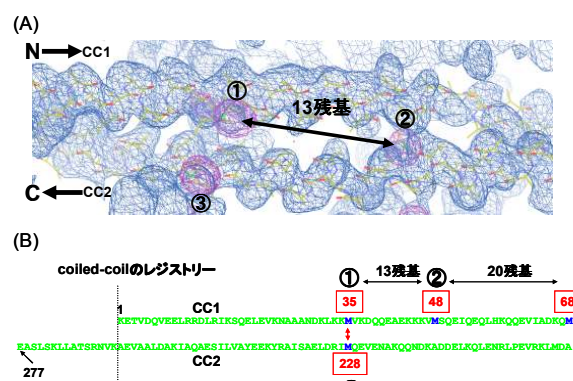


図 5 : coiled-coil でのメチオニンの位置

図 5 (A) で上のヘリックスは、左の方が N 末端で CC1 に対応しており、そのヘリックス上に 2 つのメチオニン残基が位置しており (①と②)、その 2 つのメチオニンの間には 13 残基のアミノ酸があることが分かった。また、下の方のヘリックスは、左の方が C 末端で CC2 に対応しており、1 つのメチオニン③が位置していることと、①と③がほぼ同じ位置にあることから①のメチオニンが 35 番目で②が 48 番目であり、③が 228 番目のメチオニンであることが分かった (図 5 (B))。

この coiled-coil のレジストリーを 2008 年の末に報告された SRS とダイニンのモータードメインのストロークドメインを融合させた蛋白質の結晶構造のものと比較すると図 6 のようになる。

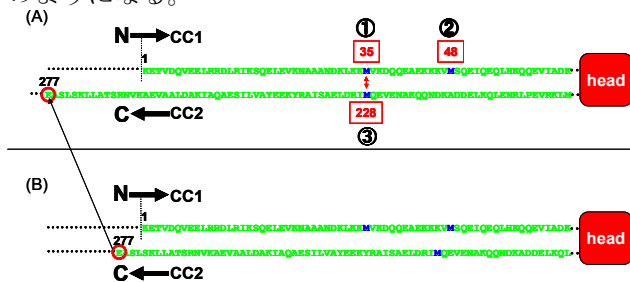


図 6 : coiled-coil のレジストリーの比較

図 6(A) は、本研究で明らかになったもので (B) は、報告された結晶構造の coiled-coil のレジストリーである。これらと比較すると本研究で得られたものでは、CC2 を C 末端の方に 10 残基引っ張ったようなレジストリーになっており、coiled-coil の領域が異なる 2 状態をとりうる可能性を示すことができた。

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 5 件)

①Balogun, E. O., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, Michels, P. S., Harada, S., Kita, K.: "Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase" *Acta Cryst. F* **66**, 304-308 (2010) 査読有

②Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S., Kita, K.: "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*" *Acta Cryst. F* **66**, 275-278 (2010) 査読有

③Yoshinari, S., Shiba, T., Inaoka, D. K., Itoh, T., Kurisu, G., Harada, S., Kita, K., Watanabe, Y.: "Functional importance of Crenarchaea-specific extra-loop revealed by an X-ray structure of a hetero-tetrameric crenarchaeal splicing endonuclease" *Nucleic. Acids Res.*, **37**, 4787-4798 (2009) 査読有

④Narikawa, R., Muraki, N., Shiba, T., Ikeuchi, M., Kurisu, G.: "Crystallization and preliminary X-ray studies of the chromophore-binding domain of cyanobacteriochrome AnPixJ from *Anabaena* sp. PCC 7120" *Acta Cryst. F* **65**, 159-162 (2009) 査読有

⑤Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba, T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki, T., Kita, K., Harada, S.: "Structures of *Trypanosoma cruzi* Dihydroorotate Dehydrogenase Complexed with Substrates and Products: Atomic Resolution Insights into Mechanisms of Dihydroorotate Oxidation and Fumarate Reduction" *Biochemistry*, **47**, 10881-10891 (2008) 査読有

〔学会発表〕 (計 1 件)

①Shiba, T., Muraki, N., Seo, D., Sakurai, T., Kurisu, G.: "Crystallographic studies of ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase from *Chlorobium tepidum*" 第 21 回国際結晶学会議, 2008 年 8 月 29 日, 大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志波 智生 (SHIBA TOMOO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80401206

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし