

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770090

研究課題名(和文)細胞質ダイニンの微小管親和性制御機構の解明

研究課題名(英文)Affinity regulation mechanism of microtubule-binding domain of cytoplasmic dynein

研究代表者

西田 紀貴(Nishida, Noritaka)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50456183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質ダイニンの微小管親和性を制御する構造メカニズムを明らかとするため、微小管結合ドメイン(MTBD)の立体構造および微小管との複合体構造の解明を行った。まず、コイルドコイル鎖にS-S結合を導入して低親和性および高親和性状態に固定したコンストラクトMTBD-LowおよびMTBD-Highを構築し、NMRによる構造決定を行った。また、MTBD-Highと微小管複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡により解析し、単粒子解析法に基づく3次元再構成により、分解能9 Å(FSC=0.5)の密度マップを得た。得られたNMR構造と電顕構造に基づいて、MTBDがMTとの親和性を制御するモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic dynein is a motor protein that walks on microtubules (MTs). The microtubule-binding domain (MTBD) is located at the tip of the anti-parallel coiled-coil, which is protruded from the ATPase domain of dynein heavy chain. It has been considered that the change in the association mode of the coiled-coil alters the MT affinity of the MTBD. However, the structural mechanism underlying the affinity regulation of the MTBD remains elusive. Here, we designed two MTBD constructs, termed MTBD-High and MTBD-Low, which are stabilized either in the high or low affinity state for MTs, respectively, by introducing a disulfide bond between the coiled-coil helix. We performed NMR analyses of MTBD-High and MTBD-Low, in order to elucidate differences in the structure and the MT-binding mode in the high and low affinity states. Based on NMR data in combination with the cryoEM analysis of the MTBD-High/MTs complex, we modeled the complex structure of the MTBD and MTs in the strong binding state.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：核磁気共鳴法 クライオ電顕 モーター蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質ダイニンは微小管上を細胞膜側から中心体方向に向かって運動する微小管モータータンパク質である。細胞質ダイニンは、6 個の AAA+モジュールで形成される ATPase ドメインと、微小管結合ドメイン (Microtubule binding domain: MTBD)を有し、末端のステム領域を介して 2 量体を形成する。細胞質ダイニンの微小管結合活性は ATPase ドメインによって制御されており、2 量体中の 2 つの MTBD が ATPase 活性と適切に運動して高親和性状態と低親和性状態の間を交互にスイッチすることにより、細胞質ダイニンは微小管上から脱離することなく運動すると考えられている (Fig. 1)。

ダイニンの MTBD と ATPase ドメインは逆平行のコイルドコイルによって連結されており、親和性制御の情報伝達を担っていると考えられる。Gibbons らは好熱菌の SRS (seryl-tRNA synthetase)由来のコイルドコイル鎖に、ダイニンのコイルドコイル鎖 (CC1, CC2)を含む MTBD 融合した発現系を作製し、融合するコイルドコイル鎖の長さを調節することで MTBD の微小管親和性が変化することを示した (J Biol Chem, 280, 23960(2005))。さらに近年、低親和性状態を反映する SRS 融合 MTBD の X 線結晶構造が発表された (Science, 322, 1691 (2008))。しかし、高親和性状態を反映した MTBD の構造は明らかになっておらず、また微小管との高分解能の複合体構造も明らかではないため、コイルドコイル鎖の会合状態の変化が MTBD の親和性を変化させる機構は不明である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞質ダイニンのコイルドコイル鎖に S-S 結合を導入して、MTBD を低親和性状態・高親和性状態に制御し、これらの立体構造および微小管との複合体構造を NMR 法とクライオ電子顕微鏡法によって原子レベルで解明することにより、ダイニンの微小管親和性制御機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高親和性状態・低親和性状態の MTBD の立体構造決定

高親和性状態・低親和性状態を模倣した MTBD (high), MTBD (low)の溶液構造の決定を行う。手順としては、まず全ての主鎖・側鎖原子の NMR シグナルの帰属を行う。得られた帰属をもとに、MTBD (high), MTBD (low)内のプロトン間の距離情報を NOESY スペクトルから収集し、C $\alpha$ 周りの二面角、水素結合などの拘束条件を加えて、Cyana2.1 を用いた構造計算を行う。MTBD は 137 残基と比較的小さく、試料も 0.5 mM 程度の高濃度において安定であることから、上記の手法で構造決定が可能と予測されるが、十分な構造収束が得られない場合は、バイセルや Pf1 ファージで配向さ

せた状態において残余双極子カップリング (RDC)を測定し、構造計算に組み入れる。

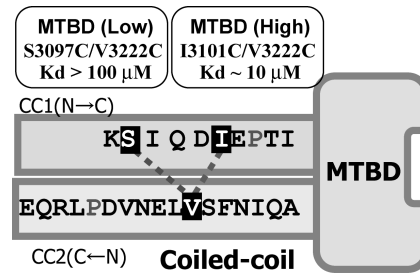


Fig.1 親和性を制御したコンストラクトの作製。CC1とCC2のCys変異を導入し、微小管に対して高親和性、低親和性のMTBD変異体を得た(図中に点線で示す)。

#### (2) NMR 法による MTBD 上の微小管相互作用部位の決定

転移交差飽和 (TCS) 法により MTBD 上の微小管結合部位を決定する。TCS 法では、微小管結合状態に受けた飽和の影響を遊離状態の NMR シグナルの強度減少として観測することにより結合部位を同定する。本手法は、結晶化が困難な微小管複合体における結合部位を原子レベルで同定する唯一の手法である。高親和性状態および低親和性状態それぞれにおける微小管相互作用面を同定し、それらを前項で得られた構造上にマッピングすることにより親和性の違いを決定する構造基盤を明らかにする。

#### (3) クライオ電子顕微鏡を用いた MTBD・微小管複合体構造の決定

クライオ電子顕微鏡を用いて、高分解能の MTBD・微小管複合体構造を取得する。この研究は、東京大学大学院医学系研究科・生体構造学分野 吉川雅英教授と共同で行う。微小管と高い親和性を示した野生型 MTBD を用いて、以下の手順で微小管複合体構造を解析する。

MTBD と微小管を吸着させたグリッドを液体エタンで急速凍結し、ヘリウムステージを搭載したクライオ電子顕微鏡を用いて MTBD 結合状態の微小管像を多数取得する。

吉川らの開発した asymmetric helical reconstruction 法 (J Struct Biol, 2007) を用いて、14 本のプロトフィラメントからなる微小管の周期性を利用したデータ解析を行い、三次元再構成像を取得する。

得られた複数の三次元構造のセグメント分割および平均化を行い、高分解能の MTBD・微小管複合体構造を取得する。微小管および MTBD の二次構造が明確に観測できる 10 Å 以上の分解能の構造の取得を目指す。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高親和性状態・低親和性状態の MTBD の立体構造決定

分子内 S-S 結合を導入して、高親和性状態・低親和性状態を模倣した MTBD-High, MTBD-Low の構造を NMR 法により決定した。その結果、MTBD-High, MTBD-Low はともに 6 本のヘリックス (H1-H6) と逆平行コイルドコイル鎖 (CC1・CC2) からなる構造をとることが明らかとなった。両者の構造を比較すると、顕著な構造変化が S-S 結合を導入した C 末端側のコイルドコイル領域、H1 ヘリックスの領域に存在することが分かった。

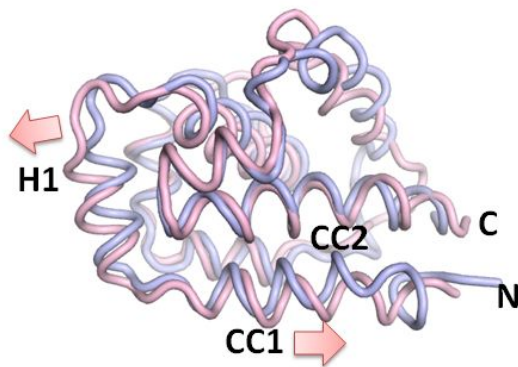


Fig.2 MTBD-High, MTBD-Low の NMR 構造。

MTBD-High(薄赤)と MTBD-Low(薄青)の構造の重ね合わせ。両者で構造が異なる部位(H1とCC1)の位置を示す。

##### (2) NMR 法による MTBD 上の微小管相互作用部位の決定

また、転移交差飽和法により、MTBD 上の微小管結合部位を同定した。その結果、MTBD-Low では H1, H6 のみが相互作用していたのに対して、MTBD-High では H1 と H6 に加えて H3 を含めたより広い結合界面が形成されていることが明らかとなった。以上より、MTBD はコイルドコイル鎖の会合状態の変化に伴って、微小管結合部位の構造が変化し、微小管に対する親和性が制御されていることが示唆された。

##### (3) クライオ電子顕微鏡を用いた MTBD・微小管複合体構造の決定

MTBD-High と微小管複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡により解析し、単粒子解析法に基づく 3 次元再構成により、分解能 9 (FSC=0.5) の密度マップを得た。得られた密度マップに tubulin dimer および MTBD-High の立体構造を MDFF を用いたフレキシブルフィッティングによりドッキングし、複合体構造を得た。

得られた複合体において、MTBD は tubulin dimer の サブユニットと サブユニットの界面を跨るように結合しておいた。MTBD 側にはこの結合界面には塩基性残基が、tubulin 側には多くの酸性残基が存在し、両者には多

数の塩橋が形成されていた。特筆すべきことに、MTBD 側の界面には唯一の酸性残基 E3122 が存在し、tubulin サブユニットの R402 と塩橋を形成していた。以上の結果より、MTBD の低親和性から高親和性状態への変化においては、CC1 のおよび H1 の構造変化が誘起され、その結果 MTBD に微小管に対して相補的な表面が形成されることにより高い親和性を獲得するというモデルを新たに提唱した。

## 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 7 件)

1: Ueda T, Takeuchi K, Nishida N, Stampoulis P, Kofuku Y, Osawa M, Shimada I. Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments., *Q Rev Biophys.* 2014 May;47(2):143-87. doi: 10.1017/S0033583514000043.

2: Nishida N, Osawa M, Takeuchi K, Imai S, Stampoulis P, Kofuku Y, Ueda T, Shimada I. Functional dynamics of cell surface membrane proteins., *J Magn Reson.* 2014 Apr;241:86-96. doi: 10.1016/j.jmr.2013.11.007.

3: Takarada O, Nishida N, Kikkawa M, Shimada I. Backbone and side-chain (1)H, (15)N and (13)C resonance assignments of the microtubule-binding domain of yeast cytoplasmic dynein in the high and low-affinity states., *Biomol NMR Assign.* 2013 印刷中.

4: Nishida N, Yagi-Utsumi M, Motojima F, Yoshida M, Shimada I, Kato K. Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins., *J Biosci Bioeng.* 2013 Aug;116(2):160-4. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.012.

5: Kubo S, Nishida N, Udagawa Y, Takarada O, Ogino S, Shimada I. A Gel-Encapsulated Bioreactor System for NMR Studies of Protein-Protein Interactions in Living Mammalian Cells., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013 Jan 21;52(4):1208-11. doi: 10.1002/anie.201207243.

6: Osawa M, Takeuchi K, Ueda T, Nishida N, Shimada I. Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR., *Curr Opin Struct Biol.* 2012 Oct;22(5):660-9. doi: 10.1016/j.sbi.2012.08.007.

7: Nishida N, Shimada I. An NMR method to study protein-protein interactions., *Methods Mol Biol.* 2012;757:129-37. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6\_10.

〔学会発表〕(計 6 件)

1: 西田紀貴、嶋田一夫  
NMR observation of protein-protein interactions in living mammalian cells using a gel encapsulated bioreactor system  
第 36 回分子生物学会年会  
2013 年 12 月 3-5 日  
兵庫県神戸市

2: 西田紀貴、宝田理、吉川雅英、嶋田一夫  
Affinity regulation mechanism of microtubule-binding domain of cytoplasmic dynein  
Dynein2013  
2013 年 11 月 1-3 日  
兵庫県神戸市

3: 西田紀貴、嶋田一夫  
A gel-encapsulated bioreactor system for NMR studies of protein-protein interactions in living mammalian cells.  
ゲル包埋型バイオリアクターを用いた生細胞内蛋白質間相互作用の NMR 観測  
日本生物物理学会 第 51 回年会  
2013 年 10 月 28-30 日  
京都府京都市

4: 西田紀貴、嶋田一夫  
バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法による細胞内タンパク質間相互作用の観測  
日本薬学会第 133 回年会  
2013 年 3 月 27-30 日  
神奈川県横浜市

5: 宝田理、西田紀貴、吉川雅英、嶋田一夫  
Elucidation of the affinity switching mechanism of the microtubule-binding domain of cytoplasmic dynein  
25th ICMRBS  
2012 年 8 月 19-24 日  
リヨン、フランス

6: 久保智史、西田紀貴、宇田川侑子、宝田理、荻野新治、嶋田一夫  
An NMR method to observe protein-protein interactions in living mammalian cells using the gel encapsulated bioreactor system  
25th ICMRBS  
2012 年 8 月 19 日-24 日  
リヨン、フランス

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
東京大学薬学部生命物理化学教室  
[http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public\\_html/index\\_j.html](http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西田紀貴(Nishida, Noritaka)  
東京大学大学院薬学系研究科  
研究者番号：50456183

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

嶋田 一夫(Shimada, Ichio)  
東京大学大学院薬学系研究科  
研究者番号：70196476