

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291031

研究課題名(和文)細胞質ダイニンの運動のメカニカル制御機構

研究課題名(英文)Mechanical Regulation of cytoplasmic dynein motility

研究代表者

豊島 陽子 (TOYOSHIMA, Yoko)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：40158043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：モータータンパク質であるダイニンの力学応答を明らかにするために、ヒトダイニン重鎖の組換え体を用いて、微小管上の1分子の運動のようすと電子顕微鏡による分子形態の観察を行った。ダイニンは運搬する荷物を持たない無負荷の状態では、2つの頭部を重ね合わせたスタック構造をとり、微小管上を一方に進まずに拡散運動を行い、自己抑制状態に陥ることがわかった。さらに、頸部の長さや堅さを変調して2つの頭部が重なることができないように制約を与えると、無負荷の状態でも一方に連続的に運動できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular mechanism of dynein motility, we have genetically engineered human dynein heavy chain and observed single molecule behaviors of the recombinant proteins on the microtubule and their molecular shape by electron microscopy. When dynein didn't have the cargo, namely under no load, the ring structure of the two heads overlapped in face-to-face fashion and the dynein molecules fluctuated on the microtubule without showing unidirectional movement, falling in self-inhibited state. When the two heads were restricted not to overlapped, the molecules exhibited the unidirectional and processive movement toward the microtubule minus end under no load.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞質ダイニン 微小管 モーター活性 頭部間距離 メカニカル制御

1. 研究開始当初の背景

ダイニンは微小管上を運動するモータータンパク質であり、巨大で複雑な構造をもつ。細胞内輸送や細胞分裂などに関わるI型細胞質ダイニン（以下、単にダイニンと呼ぶ）は、細胞内小器官や小胞の輸送、紡錘体の配置や染色体分離、神経上皮の細胞運動など、様々な機能を担っている。ダイニンのモータードメインはAAA+タンパク質ファミリーに属し、その結晶構造が明らかになり、構造変化の大筋が理解されるようになった。しかし、ダイニン分子の運動特性については、無負荷状態でのブラウン運動や、負荷をかけたときのキャッチボンド機構、微小管のプラス端方向への力発生など、ミオシンやキネシンとは異なる特徴的な力学応答が見られ、運動機構の本質が明らかにされていない。

2. 研究の目的

以前に我々は、高等動物由来のダイニンは1分子レベルで、負荷のある状態（人工ビーズなどの荷物を背負っているとき）では連続的な一方向性の運動を示す^①が、無負荷の状態では（微小管のマイナス端方向へのバイアスがある）ブラウン運動をする^②ことを明らかにした。本研究では、最近我々が開発したヒトダイニン組換え体を利用して分子デザインを行い、その運動特性と分子形態を観察することにより、特にダイニン分子内の2つの頭部の関係に注目して、運動機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト組換え体ダイニン浮遊細胞培養による大量発現系の開発 以前にヒト培養細胞においてヒトダイニン重鎖の発現系を開発した^③が、安定発現株を構築するための手間と時間が必要であった。本研究では、ヒト細胞を浮遊培養して短時間に大量のダイニン重鎖を効率よく発現・精製するシステムの開発を行った。

(2) 頭部間の構造の長さや堅さを変えたダイニン人工ダイマーの作製 1分子ダイニンの運動において、2つの頭部の連絡がどのように行

われているかを明らかにするために、頭部に続く頸部の長さを変化させ、GSTを利用して人工ダイマーを作製した。また、逆並行のダイマーを形成するアクチニンを繋ぎとして2つの頭部が重なり合わない距離に固定した人工ダイマーを作製した。それらの組換え体には、1分子観察用に蛍光色素を標識するためのSNAPタグを導入した。

(3) 野生型ダイニンと人工ダイマーダイニンの1分子運動観察 作製した組換え体ダイニン1分子が微小管上でどのようなふるまいを示すのかを調べるために、全反射蛍光顕微鏡で観察を行い、ビデオ画像を録画した。揭示変化を示すためにカイモグラフを作製した。

(4) 野生型ダイニンと人工ダイマーダイニンの電子顕微鏡観察 作製した組換え体ダイニンがどのような分子形態をとっているのかを調べるために、酢酸ウラニルによるネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察を行った。頭部の形態を明らかにするために、単粒子解析を行った。

4. 研究成果

(1) ダイニン1分子の2つの頭部間距離と微小管上の運動 ヒト組換え体ダイニン野生型（重鎖全長）は、ブタ脳から精製したネイティブダイニンと同様の分子形態を示し、2つの頭部が閉じているもの、それぞれの頭部が識別できる程度に離れているものから、約40 nmほど離れているものが混在していることが、電子顕微鏡により観察された。一方、頸部の長さを変えた人工ダイマーのシリーズでは、頸部が短いものは頭部が識別できるように離れていたが、頸部が長いものは閉じているものと離れているものの両方が観察された。これらのダイニンのうち、頸部が短い人工ダイマーはATP存在下で微小管上を連続的に一方向に運動したが、野生型と長い頸部をもつ人工ダイマーにおいては、ややマイナス端方向にバイアスがかかったブラウン運動を示し、一方向性の運動はほとんど見られなかった。野生型ダイニンにおい

て頭部が閉じている電子顕微鏡像を多数集めて、単粒子解析を行ったところ、結晶構造から明らかにされた 2 つの頭部が向き合って重なっている状態であることが明らかになり、この状態をスタック構造と名づけた。

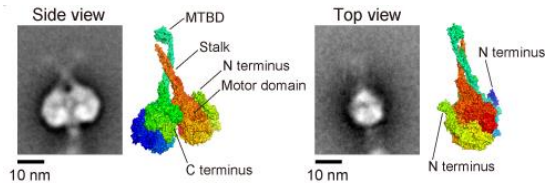


図 1 ダイニン頭部のスタック構造

(2) ヌクレオチド状態を変化させたときのダイニンの分子形態と微小管上の挙動 ATP の非存在下(apo)、ATP の代わりに非加水分解性のアナログである AMPPNP、また、ADP・Pi 状態を模倣する ADP・Vi、あるいは ADP の存在下における 1 分子ダイニンの微小管上の挙動を観察した。ADP・Vi 存在下ではブラウン運動が多く見られ、その拡散係数は他の条件より 10 倍近く大きかった。同じ条件における分子形態を電子顕微鏡で観察したところ、スタック構造をとる割合が ADP・Vi 存在下で最も高く、次いで ATP が高く、apo、AMPPNP、ADP の状態では低い割合であった。この割合は拡散係数の大きさと強い相関があった。

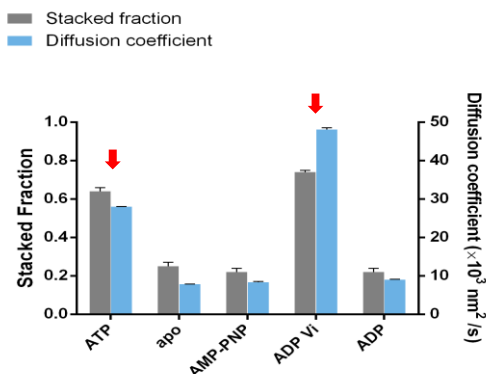


図 2 ダイニン頭部のスタック割合と拡散係数

以上の結果から、ダイニンは ATP 存在下で、そのクロスブリッジサイクルのうち ADP・Pi 状態が占める時間割合がもっとも大きいこと

がわかる。さらに、拡散係数はブラウン運動の程度と相関が高いことから、ダイニンが微小管上を連続的に一方向運動できずにブラウン運動をしている状態では、2 つの頭部がスタック構造をとっていることが強く示唆され、この状態はダイニンが荷物を運ばずに運動をしてしまうことを阻止するための自己抑制状態であると想定される。

(3) アクチニンを利用した人工ダイマーの頭部間距離と運動 ダイニン頭部の遺伝子にアクチニンの一部の遺伝子を繋いで作製した人工ダイマーは、アクチニンの逆並行ダイマーのロッドの両端にダイニン頭部が位置した形態を示し、その頭部間距離は平均 38nm ほど隔っていた。このアクチニン人工ダイマーのダイニンは、微小管上を連続的にマイナス端に向かう一方向性の運動を示した。

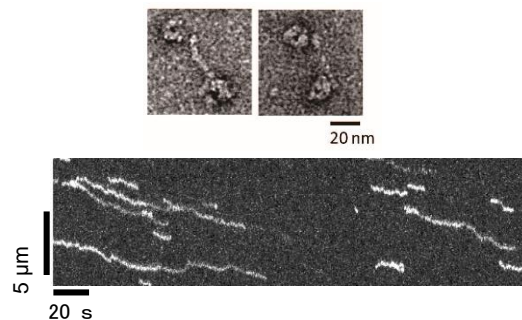


図 3 アクチニンによる人工ダイマーの分子形態と微小管上の運動

さらに、この人工ダイマーは、チューブリンを亜鉛の存在下で重合させて作製した Zinc シート (微小管とは異なり、ダイニンが利用できるプロトフィラメントが 1 本のみである) の上を連続的に一方向に運動できることが明らかになった。これらの結果により、ダイニン 1 分子の連続的な一方向性の運動には、2 つの頭部が直接に接触する相互作用が必要ないこと、さらに、2 つの頭部が相互に前に出るキネシンのようなハンド・オーバー・ハンド型の前進機構が必要ないこと、が明らかになった。

<引用文献>

- ① Toba, S., Watanabe, T.M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y. Y. & Higuchi, H. (2006) Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5741-5745.
- ② Miura, M., Matsubara, A., Kobayashi, T., Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y. (2010) Nucleotide-dependent behavior of single molecules of cytoplasmic dynein on microtubules in vitro. *FEBS Lett.* **584**, 2351-2355.
- ③ Ichikawa, M., Watanabe, Y., Murayama, T. & Toyoshima, Y. Y. (2011) Recombinant human cytoplasmic dynein heavy chain 1 and 2: Observation of dynein-2 motor activity in vitro. *FEBS Lett.* **585**, 2419-2423.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Ichikawa M., Saito K., Yanagisawa H., Yagi, T., Kamiya, R., Yamaguchi S., Yajima, J., Kushida Y., Nakano, K., Numata, O. and Toyoshima, Y. Y. (2015) Axonemal dynein light chain-1 locates at the microtubule binding domain of the γ heavy chain *MBoC* **26**, 4236-4247. DOI:10.1091/mbc.E15-05-0289, 査読有
- ② Maheshwari, A., Obbineni, J. M., Bui, K. H., Shibata, K., Toyoshima, Y. Y. & Ishikawa, T. (2015) α - and β -tubulin lattice arrangement of the axonemal microtubule doublet and binding proteins revealed by single particle cryo-electron microscopy and tomography. *Structure* **23**, 1584-1595. DOI:10.1016/j.str.2015.06.017, 査読有
- ③ 鳥澤嵩征、古田健也、豊島陽子 (2015) 細胞質ダイニンの運動制御機構 *生物物理*

55, 127-132. DOI:

10.2142/biophys.55.127, 査読有

- ④ Yamaguchi, S., Saito, K., Sutoh, M., Nishizaka, T., Toyoshima, Y. Y. & Yajima, J. (2015) Torque generation by axonemal outer-arm dynein *Biophys. J.* **108**, 872-879. DOI:10.1016/j.bpj.2014.12.038, 査読有
- ⑤ Torisawa, T., Ichikawa, M., Furuta, A., Saito, K., Oiwa, K., Kojima, H., Toyoshima, Y. Y. & Furuta, K. (2014) Autoinhibition and cooperative activation mechanisms of cytoplasmic dynein. *Nature Cell Biol.* **16(11)** 1118-1124. DOI:10.1038/ncb3048, 査読有
- ⑥ Nishikawa, Y., Oyama, T., Kamiya, N., Kon, T., Toyoshima, Y. Y., Nakamura, H. & Kuris, G. (2014) Structure of the entire stalk region of the dynein motor domain. *J. Mol. Biol.* **426**, 3232-3245. DOI:10.1016/j.jmb.2014.06.023, 査読有
- ⑦ 古田健也、鳥澤嵩征、豊島陽子 (2014) バイオイメージングと光ピンセットを用いた微小管系モータータンパク質の協働的活性化に関する働き. *生化学* **86**, 184-191. <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/11/86-02-09.pdf>, 査読有
- ⑧ Obinata, T., Amemiya, S., Takai, R., Ichikawa, M., Toyoshima, Y. Y., & Sato, N. (2014) Sea lily muscle lacks a troponin-regulatory system, while it contains paramyosin. *Zool. Sci.* **31**, 122-128. DOI:10.2108/zsj.31.122, 査読有
- ⑨ Ito, M., Arif Md. Rashedul Kabir, A., M., R. Inoue, D., Torisawa, T., Toyoshima, Y. Y., Sada, K. & Kakugo, A. (2014) Formation of ring-shaped microtubule assemblies through active self-organization on dynein. *Polymer J.* **46**, 220-225. DOI:10.1038/pj.2013.89, 査読有

[学会発表] (計 26 件)

- ① Ichikawa M., Saito K., Yanagisawa H., Yagi, T., Kamiya, R., Yamaguchi S., Yajima, J., Kushida Y., Nakano, K., Numata, O. and Toyoshima, Y. Y., Axonemal Dynein Light Chain-1 Locates at the Microtubule Binding Domain of the γ Heavy Chain. 第 53 回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15., 金沢大学 (石川県、金沢市)
- ② Sugawa, M., Yamaguchi, S., Takagi, H., Shibata, K., Toyoshima, Y. Y., Yajima, J., Off-axis motion of yeast cytoplasmic dynein takes a biased random walk. 第 53 回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15., 金沢大学 (石川県、金沢市)
- ③ Kobayashi, K., Miyashita, K., Kajita, H., Saito, K., Murayama, T., Toyoshima, Y. Y., Dynactin is a biphasic regulator to promote and inhibit dynein motility. 第 53 回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15., 金沢大学 (石川県、金沢市)
- ④ T. Kobayashi, T. Miyashita, H. Kajita, K. Saito, T. Murayama, Y.Y. Toyoshima, Regulation of dynein motility by the antenna structure of dynactin p150. The 2014 ASCB/IFCB Meeting, 2014.12.6-10., Philadelphia, USA.
- ⑤ M. Ichikawa, K. Saito, H. Yanagisawa, T. Yagi, R. Kamiya, Y. Kushida, K. Nakano, O. Numata, Y. Y. Toyoshima, Dynein light chain 1 locates at the stalk of the outer arm dynein. The 2014 ASCB/IFCB Meeting, 2014.12.6-10., Philadelphia, USA
- ⑥ Hatsuha Kajita, Takuya Kobayashi, Kei Saito, Yoko Y. Toyoshima, Antenna structure of dynactin complex. 第 52 回日本生物物理学会 2014.9.13-15., 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
- ⑦ Muneyoshi Ichikawa, kei Saito, Haru-aki Yanagisawa, Toshiki Yagi, Ritsu Kamiya, Yasuharu Kushida, Kentaro Nakano, Osamu Numata, and Yoko Y. Toyoshima, as LC1 binds to the stalk of the outer arm dynein. 第 52 回日本生物物理学会年会 2014.9.13-15., 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
- ⑧ Takuya Kobayashi, Hatsuha Kajita, Kei Saito, Yoko Y. Toyoshima, A novel role of dynactin for dynein motility revealed by gliding assay. 第 52 回日本生物物理学会年会 2014.9.13-15., 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
- ⑨ Takuya Miyashita, Takuya Kobayashi, Hatsuha Kajita, Yoko Y. Toyoshima, A novel role of dynactin for dynein motility revealed by single-molecule assay. 第 52 回日本生物物理学会年会 2014.9.13-15., 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
- ⑩ Takayuki Torisawa, Ken'ya Furuta, Muneyoshi Ichikawa, Akane Furuta, Kei Saito, Kazuhiro Oiwa, Hiroaki Kojima, Yoko Y. Toyoshima, Autoinhibitor and cooperative activation mechanisms of Cyto-plasmic dynein. 第 52 回日本生物物理学会年会 2014.9.13-9.15., 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
- ⑪ Kei Saito, Takashi Murayama, Tomonori Hata, Takuya Kobayashi, Yoko Y. Toyoshima, New Folding Pattern of p150 and "antenna" for dynein binding. Biophysical Society 58th Annual Meeting 2014.2.15-19. San Francisco, USA
- ⑫ Takayuki Torisawa, Ken'ya Furuta, Akane Furuta, Muneyoshi Ichikawa, Kei Saito, Kazuhiro Oiwa, Hiroaki Kojima, Yoko Y. Toyoshima, Self-regulation of cytoplasmic dynein through its unconventional force response. Biophysical Society 58th Annual Meeting 2014.2.15-19. San Francisco, USA
- ⑬ Ken'ya Furuta, Takayuki Torisawa,

- Akane Furuta, Muneyoshi Ichikawa, Kei Saito, Kazuhiro Oiwa, Hiroaki Kojima, Yoko Y. Toyoshima, Self-regulation of cytoplasmic dynein. American Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting, 2013.12.14.-18. New Orleans, USA
- ⑭ Kei Saito, Tomonori Hata, Takuya Kobayashi, Takashi Murayama, Yoko Y. Toyoshima, Submolecular structure of dynactin sidearm: a new folding pattern of p150. American Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting, 2013.12.14.-18., New Orleans, USA
- ⑮ Toyoshima, Y. Y. Submolecular structure of cytoplasmic dynein tail and dynactin sidearm. "International Workshop: Dynein 2013", 2013.11.1.-11.3., オルビスホール (兵庫県、神戸市)
- ⑯ Muneyoshi Ichikawa, Yasuharu Kushida, Kentaro Nakano, Osamu Numata, Takuya Kobayashi, Yoko Y. Toyoshima, Manipulating Tetrahymena outer dynein arm components. "International Workshop: Dynein 2013", 2013.11.1.-11.3., オルビスホール (兵庫県、神戸市)
- ⑰ Takayuki Torisawa, Ken'ya Furuta, Akane Furuta, Muneyoshi Ichikawa, Kei Saito, Kazuhiro Oiwa, Hiroaki Kojima, Yoko Y. Toyoshima, Self-regulation of cytoplasmic dynein. "International Workshop: Dynein 2013", 2013.11.1.-11.3., オルビスホール (兵庫県、神戸市)
- ⑱ Takuya Miyashita, Keitaro Shibata, Yoko Y. Toyoshima, Changes in yeast dynein motility on GMPCPP microtubules, "International Workshop: Dynein 2013", 2013.11.1.-11.3., オルビスホール (兵庫県、神戸市)
- ⑲ Takayuki Torisawa, Ken'ya Furuta, Akane Furuta, Muneyoshi Ichikawa, Yoko Y. Toyoshima, Autoinhibition and synergistid activation of cytoplasmic

dynein 日本生物物理学会第 51 回年会
2013.10.28.-30., 京都国際会議場 (京都府、京都市)

- ⑳ Kei Saito, Takashi Murayama, Tomonori Hata, Yoko Y. Toyoshima, Molecular architecture of dynactin p150 日本生物物理学会第 51 回年会 2013.10.28.-30., 京都国際会議場 (京都府、京都市)

[その他]

ホームページ : <http://toyoshima-lab.c.u-tokyo.ac.jp/index.html>

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 : 4 0 1 5 8 0 4 3

(2) 研究分担者

矢島 潤一郎 (YAJIMA, Junichiro)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号 : 0 0 4 5 3 4 9 9

(3) 研究協力者

小林 琢也 (KOBAYASHI, Takuya)
須河 光弘 (SUGAWA, Mitsuhiro)
鳥澤 嵩征 (TORISAWA, Takayuki)
市川 宗厳 (ICHIKAWA, Munenori)
斎藤 慧 (SAITO, Kei)
梶田 初葉 (KAJITA, Hatsuha)
宮下 拓也 (MIYASHITA, Takuya)
柴田 桂太郎 (SHIBATA, Keitaro)
内海 唯 (UTSUMI, Yui)
古田 健也 (FURUTA, Ken'ya)