

平成 30 年 5 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291014

研究課題名(和文) X線解析で迫る鞭毛・繊毛運動を駆動する軸系ダイニンの構造基盤

研究課題名(英文) Structural analysis of the axonemal dynein responsible for ciliary/flagellar beating

研究代表者

栗栖 源嗣 (Kurusu, Genji)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：90294131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダイニンは、ATP加水分解に伴って微小管上を運動する分子モーターであり、重鎖、中間鎖、中間軽鎖、軽鎖といった複数のサブユニットから構成される。通常、軽鎖は、重鎖のN末端領域に結合することが知られているが、クラミドモナス由来の軸系ダイニン軽鎖1が外腕ダイニン重鎖の微小管結合部位に結合することが最近になって示された。本研究では、軸系ダイニン軽鎖1単体の構造と、軽鎖と外腕ダイニン重鎖の微小管結合領域の複合体構造をX線結晶構造解析によって決定し、その構造情報から複合体形成が微小管結合を介して重鎖のATP加水分解活性を調整する仕組みについて考察することができた。

研究成果の概要(英文)：Dynein motors are biologically important bio-nanomachines, and many atomic resolution structures of cytoplasmic dynein components from different organisms have been analyzed by X-ray crystallography, cryo-EM and NMR spectroscopy. However, atomic data are very much focused on cytoplasmic dyneins and remarkably less structural work on axonemal dyneins has been reported. This project provided structural studies of axonemal dynein including accessory proteins. My team performed mutational and structural studies of the interaction between the axonemal dynein light chain-1 (LC1) and the microtubule-binding domain (MTBD) of outer arm dynein gamma (OAD), and tried to overexpress the axonemal dynein motor domain and crystallize the axonemal dynein stalk region. Based on the results mentioned above, we can discuss about the structural basis for the LC1-MTBD complex formation that might regulate the function of axonemal dynein heavy chain in different way from that of cytoplasmic dynein.

研究分野：構造生物化学

キーワード：生体運動 構造生物学 分子モーター

1. 研究開始当初の背景

ダイニンはATP依存的に微小管上を滑り運動するモータータンパク質で、複数のタンパク質鎖で構成される生体超分子複合体である。鞭毛・繊毛運動を駆動する軸系ダイニン、さらに細胞内輸送や染色体分離運動を担う細胞質ダイニンが存在する。細胞質ダイニンの構造解析は急激に原子レベルでの構造情報が蓄積している一方で、軸系ダイニンについては、電子線トモグラフィーによる鞭毛全体の構造解析のみが先行し、結晶構造の報告は極めて少ない。電子顕微鏡ではアミノ酸レベルの高分解能構造は議論できないが、複数ある軸系ダイニンをつなぐリンカー構造が報告されていたり、「9+2」構造に非対称性が生じている事が報告されたりと、巨大な運動器官である鞭毛の中で、どのようにタンパク質複合体の配置し機能しているのか、構造情報が蓄積し始めている。繊毛病を引き起こす軸系ダイニンの変異にまで切り込んで行くためには、巨大な細胞器官のコアとなる軸系ダイニンの高分解能構造の必要性が高まっている状況にあった。

2. 研究の目的

軸系ダイニンの原子レベルでの構造報告は少なく、構造・機能の相関について著しく理解が遅れている。本研究課題では、X線結晶構造解析の手法により、鞭毛・繊毛運動を駆動する軸系ダイニンの分子機構を原子レベルで明らかにすることを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 重鎖全体については、Tail領域など新規構造を含む構造決定を第一優先とする。

(2) モータードメインに関しては、構造決定済の細胞質ダイニンの構造を念頭に、軸系ダイニンに特徴的なAAA4のATPase部位や挿入配列部位に着目して研究を進める。

(3) ストック領域は、実際に微小管との結合・解離が行われる部位に相当する。長いコイルドコイル領域にS-S結合を導入する事で、ヘリックスの相対位置を変化させて微小管親和性を「結合」「解離」のどちらかに固定する事が可能となっている。この“Helix sliding model”と呼ばれる親和性制御の構造基盤を明らかにするために、微小管親和性と構造との相関に着目して研究を遂行する。

4. 研究成果

(1) 重鎖全体の構造解析の視点では、Tail領域のクローニングと発現系の構築を進めた。しかし大変残念なことに、2015年に英国グループからTail領域の電子顕微鏡構造および2量体化ドメインの結晶構造が報告されたため、以降は高分解能構造解析が目標である項目(2)、(3)に注力することとした。

(2) 軸系ダイニンモータードメインの大量発現系の構築を行った。発現系には高度なシャペロン系を有するほ乳類細胞発現系を用いた。いくつかのヒト由来軸系ダイニン(DNAH1, DNAH2, DNAH9)と緑藻クラミドモナス由来軸系ダイニン(DHC9)において、発現系確立後、発現確認を行った。GFP融合タンパク質として発現させた各モータードメインの発現をGFP蛍光にて検出したところ、良好な発現を確認できた。そこで、モータードメインの精製を試みたが、目的タンパク質の多くが不溶性画分へと発現しておりモータードメインの結晶化に向けた大量精製に進むことが出来なかった。

(3) マウスの細胞質ダイニンと緑藻クラミドモナスの軸系ダイニン(dynein-c)のストック領域を組換え体として調製し構造解析を行った。S-S結合を導入することによって、それぞれの微小管親和性を高・低2種類に固定することに成功した合計4種類のサンプルを用いて、非還元SDS-PAGE解析、CD測定による二次構造解析(図1)、SAXS (small-angle X-ray scattering)測定による溶液構造解析、さらに²H-¹⁵Nあるいは¹³Cにラベルした組換え体を用いたNMR測定を行った[①, ②]。

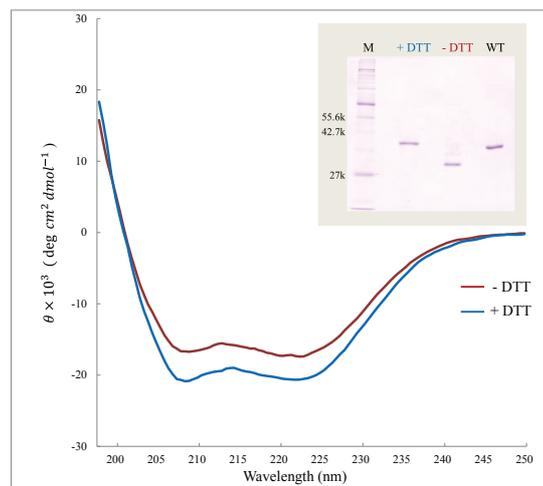


図1. 微小管への親和性を変化させた時の2次構造変化. 赤: 高親和性, 青: 低親和性

微小管親和性が高い状態に固定した試料では、2種類のダイニン双方で二次構造含量の低下が観測され、SAXS測定とNMR測定ではストック領域の2量体化が示唆された。これは、細胞質ダイニンモータードメインのADP結合型結晶構造中に存在するストックの二量体構造と整合しており、ストックを用いた微小管相互作用解析に向け足がかりとする事が出来た。

次に、軸系ダイニン外腕 γ 重鎖(OAD γ)の微小管結合領域(MTBD)に結合するダイニン軽鎖(LC1)の結晶化を行ったところ、LC1の結晶構造を1.55Å分解能で決定することに成功した。LC1の結晶構造は、NMR溶液構造と二次構造レベルで異なっており、LC1の高

い構造的柔軟性が示唆された。さらに、TLS-refinement の結果得られる各原子の異方性温度因子と NMR 構造と結晶構造との構造変化の方向性との間に相関が見られたことから、LC1 自身が持つ柔軟性によってこのような構造変化が起きることが示唆された (図 2) [③].

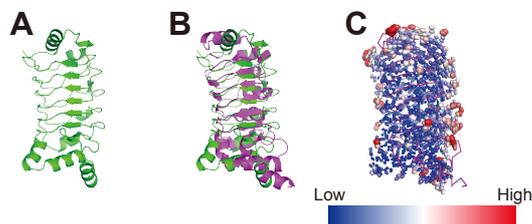


図 2. LC1 の構造特性 (A) 結晶構造, (B) NMR 構造, (C) 温度因子を異方性を含めて描画した図

最後に、LC1 と OAD γ の MTBD 領域の複合体構造を X 線結晶構造解析によって決定し、LC1 による OAD γ 制御機構の構造基盤を解明することを目指した。大腸菌発現系を用いて LC1-MTBD 複合体を調製し、LC1-MTBD 複合体の結晶構造を 1.7 Å 分解能で決定した。その結晶構造から、LC1 結合状態の MTBD が微小管親和性の低い状態に固定されていることが判った。さらに、MTBD の H5 ヘリックスと軸糸ダイニンに特徴的な Flap 領域が主に LC1 との相互作用に用いられていることも判明した。Protein Data Bank にある MTBD と微小管 (チューブリン) との低分解能構造を参照することで、微小管結合構造を推測したところ、LC1, MTBD, tubulin が立体障害なく結合する予想複合体を得ることができた。この予想構造では、LC1 が微小管とは逆側に位置しており、MTBD 結合状態の LC1 は微小管結合に直接関与していないことが示唆された。これまで考えられてきた LC1 の機能的役割と大きく異なる発見であり、軸糸ダイニンの機能制御の分子メカニズムを考える上で非常に重要な情報となった。

<引用文献>

- ① Nishikawa Y., Oyama T., Kamiya N., Kon T., Toyoshima Y.Y., Nakamura H., Kurusu G. Structure of the Entire Stalk Region of the Dynein Motor Domain. *J. Mol. Biol.*, **426**, 3232-3245, 2014, DOI:10.1016/j.jmb.2014.06.023.
 - ② Nishikawa Y., Inatomi M., Iwasaki H., Kurusu G. Structural Change in the Dynein Stalk Region Associated with Two Different Affinities for the Microtubule. *J. Mol. Biol.*, **428**, 1886-1896, 2016, DOI:10.1016/j.jmb.2015.11.008.
 - ③ Toda A., Tanaka H., Kurusu G. Structural atlas of dynein motors at atomic resolution. *Biophys. Rev.*, **10**, 677-686, 2018, DOI:10.1007/s12551-018-0402-y.
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)
- ① Nishikawa Y., Oyama T., Kamiya N., Kon T., Toyoshima Y.Y., Nakamura H., Kurusu G. Structure of the Entire Stalk Region of the Dynein Motor Domain. *J. Mol. Biol.*, **426**, 3232-3245, 2014, DOI:10.1016/j.jmb.2014.06.023.
 - ② Nishikawa Y., Inatomi M., Iwasaki H., Kurusu G. Structural Change in the Dynein Stalk Region Associated with Two Different Affinities for the Microtubule. *J. Mol. Biol.*, **428**, 1886-1896, 2016, DOI:10.1016/j.jmb.2015.11.008.
 - ③ Kamiya N., Mashimo T., Takano Y., Kon T., Kurusu G., Nakamura H., Elastic properties of dynein motor domain obtained from all-atom molecular dynamics simulations. *Protein Eng. Des. Sel.*, **29**, 317-325, 2016, DOI:10.1093/protein/gzw022.
 - ④ 栗栖源嗣, 昆隆英, 細胞質ダイニンのモータードメインの結晶構造, *領域融合レビュー*, **5**, e001, 2016, DOI:10.7875/leading.author.5.e001
 - ⑤ Toda A., Tanaka H., Kurusu G. Structural atlas of dynein motors at atomic resolution. *Biophys. Rev.*, **10**, 677-686, 2018, DOI:10.1007/s12551-018-0402-y.
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Nishikawa Y., Oyama T., Kamiya N., Kon T., Toyoshima Y.Y., Nakamura H., Kurusu G. Structure of the entire stalk region of dynein motor domain. Asia Pacific Protein Association, 2014/5/17-20, Jeju, Korea
 - ② Kurusu G. Structure and function of the dynein motor domain, 9th International Symposium of the Protein Society of Thailand, 2014/8/6-8, Bangkok, Thailand.
 - ③ 岩崎遥華, 西河洋祐, 稲富桃子, 田中秀明, 栗栖源嗣, レジストリーの異なるダイニンストーク領域の 2 次構造解析. 日本生物物理学会, 2015/9/13-15, 金沢大学, 石川県金沢市
 - ④ Kurusu G. Structure and function of the cytoplasmic dynein motor, Molecular and Cellular Life Sciences 2015, 2015/5/7-8, Surabaya, Indonesia

- ⑤ Nishikawa Y., Inatomi M., Iwasaki H., Kurisu G. Updated structure of the dynein stalk region from the Mus Musculus cytoplasmic dynein. Asian Crystallographic Association, 2015/12/5-8, Kolkata, India
- ⑥ 戸田暁之, 田中秀明, 西河洋祐, 八木俊樹, 栗栖源嗣, 軸糸ダイニン軽鎖1の結晶構造と構造評価, 日本結晶学会, 2016/11/17-18, 水戸, 茨城県水戸市
- ⑦ 戸田暁之, 田中秀明, 西河洋祐, 八木俊樹, 栗栖源嗣. X線結晶構造解析による軸糸ダイニン軽鎖1の構造評価, 日本生物物理学会, 2016/11/25-27, つくば, 茨城県つくば市
- ⑧ 飯田慎仁, Hanson B., 神谷成敏, 栗栖源嗣, 昆隆英, 中村春木, Harris S. 細胞質ダイニンのマルチスケールシミュレーション: 全原子から連続体へ, 日本生物物理学会, 2017/9/19-21, 熊本大学, 熊本市
- ⑨ Toda A., Tanaka H., Nishikawa Y., Yagi T., Kurisu G. Structural insights into complex formation of the axonemal dynein light chain-1 and OAD γ stalk. International Workshop Dynein 2017, 2017/10/29-11/1, 淡路夢舞台, 兵庫県淡路市
- ⑩ Toda A., Tanaka H., Nishikawa Y., Yagi T., Kurisu G. Structural insights into complex formation of the axonemal dynein light chain-1 and OAD γ stalk. 62th Annual Meeting Biophysical Society, 2018/2/17-21, San Francisco, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗栖 源嗣 (KURISU, Genji)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号: 9 0 2 9 4 1 3 1

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者
なし ()