

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04772

研究課題名(和文) ダイニンのスタック構造と運動制御機構

研究課題名(英文) Regulation and stack structure and motility of dynein

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：40158043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ダイニン分子内の2つの頭部間の1分子FRET(蛍光エネルギー移動)を計測し、2つの頭部がスタック構造とセパレート構造の2つの状態を遷移する過程を直接的にとらえることができた。さらに、ダイニンのスタック構造(自己阻害状態)を解除してセパレート構造をとり能動的な運動を誘起する制御機構を明らかにするために、ダイニン制御タンパク質であるダイナクチンの構造と機能を調べた結果、ダイナクチンは複雑なドメイン構造と多様なコンフォメーションをとること、分子内の複雑な自己制御機構があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スタック構造と自己阻害状態という知見は、以前に研究代表者のグループが発見した独創的なものであり、本研究において、ダイニン頭部のスタック構造とセパレート構造の間の遷移過程を光学顕微鏡下でモニターし、自己阻害状態のダイニン頭部の構造を直接関連付けることに本研究の学術的意義がある。さらに、ダイニンの制御タンパク質であるダイナクチンの微小管上の動態と多様なコンフォメーションを明らかにし、ダイニンの自己阻害状態を解除して能動的な運動を誘起するための新たな運動制御機構を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：A single molecule FRET (Förster Resonance Energy Transfer) measurement of the two heads of dynein molecule directly indicated that a transition process between the stack structure and the separated structure. To explore the regulatory mechanism to induce an active motion state (separated structure) from an auto-inhibition state (stack structure), we investigated the structure and the function of dynactin molecule which is known as a principle regulatory protein of dynein. The results showed that dynactin has two antagonistic domains to promote or suppress dynein motility within a molecule, and dynactin has a flexible structure and multiple conformations, which suggests an auto-regulation mechanism within a dynactin molecule.

研究分野：生物物理学・分子生理学

キーワード：ダイニン ダイナクチン 微小管 スタック構造 分子内制御機構 1分子FRET観察 電子顕微鏡観察  
高速AFM観察

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ダイニンとは微小管上を運動するモータータンパク質で、小胞輸送、細胞分裂、鞭毛運動など様々な細胞機能に関わっている。ダイニンは分子量が 1.3 M にも及び巨大で複雑な複合体であり、その運動機構や調節機構について未解明の部分が多い。ダイニンのモータードメインについての運動素過程の理解は進んだが、尾部を含めたダイニン分子全体の運動特性や運動制御の機構については、多くの謎が残っている。細胞質ダイニンの 2 つの頭部は互いに independent な振る舞いをしながら微小管上を進むこと、また inch worm 機構により運動ができることなどが報告されたが、ダイニンの 2 つの頭部がどのように連絡をして、互いを制御しているのかについては明らかになっていない。

(2) 我々は、ヒト細胞質ダイニン 1 分子は ATP 存在下で微小管上を 1 次元の拡散運動をすることを見出し、電子顕微鏡による形態観察と拡散係数の計測から、ATP 存在下あるいは ADP・Vi 存在下では 2 つの頭部を向い合せに重ねたスタック構造をとることを明らかにした。ダイニン分子はスタック構造をとる状態では自己阻害状態にあり運動できず、何らかの制御機構により阻害が解除されると能動的な運動ができるようになると考えられるが、運動モードの切り替えに必要な制御機構についてはよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

ダイニンのスタック構造と運動様式を直接関連付け、自己阻害状態から能動的な運動状態に切り替えるための制御機構を明らかにすることを目的とした。

(1) 1 分子 FRET 計測の系を確立し、ダイニン分子内の 2 つの頭部がとるスタック構造とセパレート構造の状態の遷移過程を直接捉え、さらにダイニン分子が微小管上を 1 次元拡散運動あるいは一方向性の能動的運動をしているときの頭部の状態 (スタック構造かセパレート構造か) を明らかにする。

(2) ダイナクチンは巨大な複合体で微小管結合部位とダイニン結合部位をもち、ダイニンの主要な制御因子として知られている。ダイナクチンがダイニンの自己抑制状態である stack 構造を解除するという仮説にたち、ダイナクチンの微小管結合能とダイナクチンによるダイニンの運動制御機構を明らかにする。

(3) ダイニンが自己阻害状態を解除して能動的な運動を行う機構を解明するために、ダイナクチン複合体中のこれまでに明らかにされていないサイドアームの分子構造とコンフォメーション変化を詳細に調べる。

## 3. 研究の方法

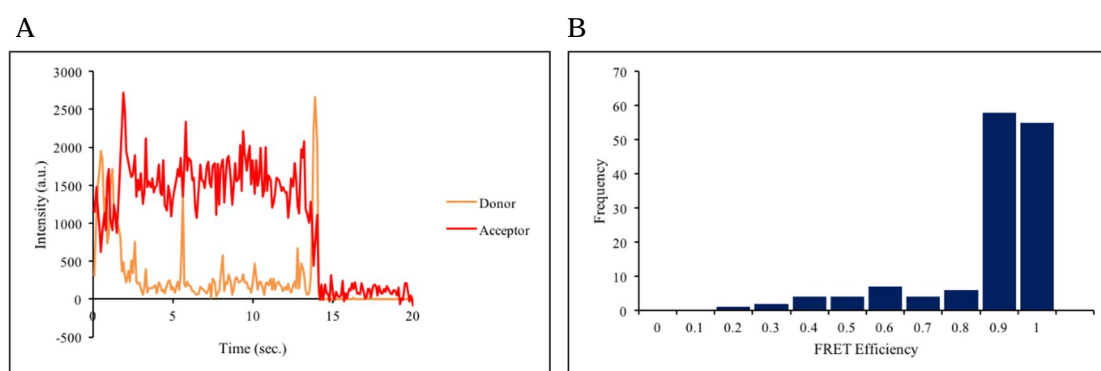
(1) 頭部のスタック構造とセパレート構造の間の遷移実態を捉えるために、ヒト細胞質ダイニン組換え体をヒト培養細胞発現系で作製し、分子内の 2 つの頭部の特定部位にそれぞれ異なる波長の蛍光を標識して、1 分子 FRET 計測を行った。微小管との相互作用において、拡散的な運動をしている状態のダイニンと、能動的な一方向運動を行っている状態のダイニンの 1 分子 FRET を計測し、スタック構造と運動様式を関連付けることを試みた。

(2) ダイナクチン複合体中の p150 サブユニットに着目し、そのスプライシングバリエーション(A 型と B 型)やミュータント(一部のドメインを欠失させたもの)を利用して、微小管との相互作用やダイニンの微小管上の運動性に与える影響を調べた。

(3) ダイニン運動制御や微小管結合に深くかかわるダイナクチン複合体中のサイドアームの構造について、ネガティブ染色法による 1 分子電子顕微鏡観察を行った。また、そのコンフォメーション変化を捉えるために、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)による観察を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ダイニン分子内の頭部間の FRET を観測するために、全反射顕微鏡と CCD カメラの間に 2 光路分岐の光学系を構築した。1 分子 FRET 観察に適したダイニン試料を作製するために、蛍光標識した組換えタンパク質を用意して、その観測系の特性を調べ、観測可能であることを確認した。ダイニンの 2 頭間の相互作用を FRET によって検出するために、それぞれのモータードメインを別の蛍光色素で標識する必要があるため、そのために二量体かタグを用いて単量体のダイニン D425 をヘテロ二量体化させた。このダイニンを電子顕微鏡で観察したところ、stack 構造と separate 構造を観察することができ、資料として適格であることを確認した。この組換え体ダイニンを ADP・Vi 条件下で 1 分子 FRET 観察をしたところ、FRET を起こしていると考えられるデータが得られた。FRET 効率のヒストグラムから、効率が 0.8~1.0 付近と、0.5~0.6 付近の 1 箇所ピークがあり、FRET 効率の異なる 2 つの状態、すなわちダイニンの stack 構造（高 FRET 状態）と separate 構造（低 FRET 状態）の間の遷移過程を捉えることができた（**図 1**）。しかし、微小管上で 1 次元の拡散運動または能動的な運動をしているときの 1 分子 FRET を観測することは困難で、FRET 状態を特定することはできなかった。



**図 1** ダイニン分子の 2 つの頭部間の 1 分子 FRET 計測  
A : 蛍光強度の時間変化 B : A から求めた FRET 効率

(2) ダイニンの細胞内での制御因子としてダイナクチンが知られているが、ダイニンの自己抑制状態である stack 構造をダイナクチンが解除するという仮説にたち、ダイナクチンによるダイニンの運動制御機構を明らかにすることを試みた。ダイナクチンの主要サブユニットである p150(DCTN1)には、スプライシングアイソフォームである A 型と B 型がある。両者にはダイニン結合部位である CC1 ドメインが存在するが、B 型は A 型に存在する K-rich ドメインを欠いている。これらのドメインの有無とダイナクチン自身の微小管結合能、およびダイニンの微小管結合に対するダイナクチンの影響について、1 分子観察と共沈実験から結合能力を評価した。A 型ダイナクチンは微小管上を diffusive に動く微小管との結合性を示したが、B 型ダイナクチン自身はほとんど微小管との相互作用を示さなかった。CC1 ドメイン欠くダイナクチンにおいて、A 型はダイニンの結合を高めたが、B 型はダイニンの微小管結合を阻害した。また、CC1 ドメインのフラグメントにより、ダイニンの微小管結合は阻害された。これらの結果から、K-rich ドメインはダイニンおよびダイナクチンの微小管結合を促進すること、ダイナクチンの CC1 ドメインはダイニンの微小管結合を阻害すること、K-rich ドメインはその阻害効果を弱めて微小管結合を可能にしていることが判明し、ダイナクチンに 1 分子内にダイニンの運動機構を促進するドメインと阻害するドメインの両方を保持していることが明らかになった（**図 2**）。

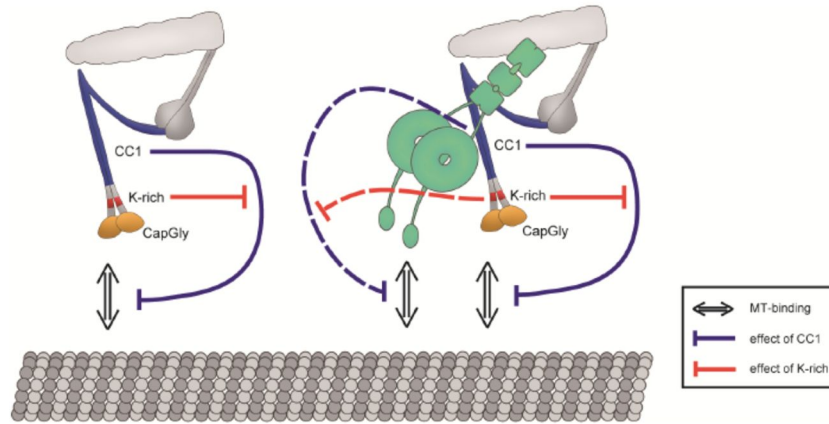


図2 ダイナクチン p150 サブユニットの微小管結合とダイニンの制御機構

(3) ダイナクチンはユニークな非対称の構造をもつ巨大なタンパク質複合体である。ダイニンや微小管をはじめ、様々な微小管結合タンパク質やカーゴ結合タンパク質と相互作用するが、その相互作用の主体となるダイナクチンサイドアームのコンフォメーションについて詳細に調べた。ダイナクチン分子を電子顕微鏡と高速 AFM で観察することにより、サイドアームが多様なコンフォメーションをとることがわかった。サイドアームが Arp1 ロッドと結合したコンパクトなフォームと、ロッドから解離した伸びたフォームをとること、その割合が溶液条件等により変化すること、さらにサイドアーム内のダイニン結合部位の CC1 が開閉すること、などがわかった(図3)。こうした多段階のコンフォメーション変化が、ダイニンや微小管結合との結合やダイニンの微小管上の運動の制御において重要な役割をもつことが示唆され、クライオ電子顕微鏡観察により報告されたダイナクチンの Arp1 ロッド部位でダイニンと結合するという描像とは異なる制御の様態が明らかになった。

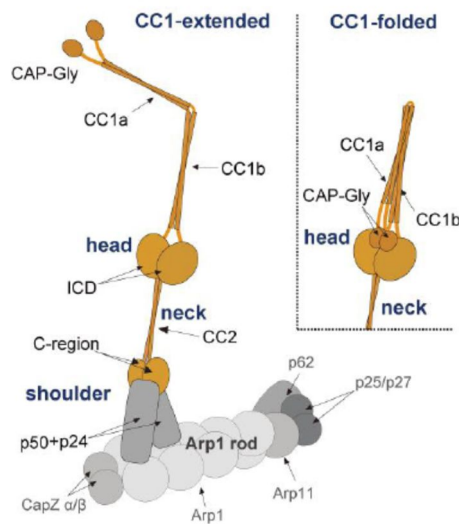


図3 ダイナクチンサイドアームのドメイン構造と CC1 の開閉コンフォメーション

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 3 件)

Mitsuhiro Sugawa, Tomoko Masaike, Nagisa Mikami, Shin Yamaguchi, Keitaro

Shibata, Kei Saito, Fumihiko Fujii, Yoko Y. Toyoshima, Takayuki Nishizaka, Junichiro Yajima, Circular orientation fluorescence emitter imaging (COFEI) of rotational motion of motor proteins, *Biochem Biophys Res Commun.* 2018, 504:709-714. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.178.)

Kobayashi T., Miyashita, T., Murayama, T. and Toyoshima, Y. Y., Dynactin has two antagonistic regulatory domains and exerts opposing effects on dynein motility. *PLOS One* 2017, 12(8):e0183672, 1-16. (DOI: 10.1371/journal.pone.0183672.)

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  $\gamma$  Heavy Chain. 2016, *MBoC* **26**, 4236-4247. (DOI: 10.1091/mbc.E15-05-0289.)

[学会発表](計9件)

Kyohei Matsuda, Takuya Kobayashi, Mitushiro Sugawa, Yoko Y. Toyoshima, Junichiro Yajima, Myosin minifilament-driven fragmentation of actin filaments triggers contraction of a disordered actin network. 2018年9月, 日本生物物理学会第56回年会, 岡山.

Yoko Y. Toyoshima, How does dynactin regulate dynein motility? 2017年10月, International Worksyp “Dynein 2017”. 淡路島.

Toshiaki Saito, Takuya Kobayashi, Takayuki Torisawa, Takashi Murayama, Yoko Y. Toyoshima, Regulation of dynein motility by NDEL1. 2017年9月, 日本生物物理学会第55回年会, 熊本.

Kei Saito, Takuya Kobayashi, Takashi Murayama, Yoko Y. Toyoshima, Interaction of dynactin complex with dynein. 2017年9月, 日本生物物理学会第55回年会, 熊本.

Takuya Kobayashi, Kei Saito, Takuya Miyashita, Takashi Murayama, Yoko Y. Toyoshima, Two antagonistic regulatory domain of DCTN1 modulate the microtubule-binding affinities of both dynein and dynactin. 2017年9月, 日本生物物理学会第55回年会, 熊本.

Mikiya Sakata, Takuya Kobayashi, Mitushiro Sugawa, Tomohiro Shima, Junichiro Yajima, Yoko Y. Toyoshima, Single molecule FRET observation of cytoplasmic dynein's conformational change. 2016年11月, 日本生物物理学会第54回年会, つくば.

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
- (2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。