

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2005～2009

課題番号：17107003

研究課題名 (和文) ダイニン組換え体と、その構造・動態に基づくエネルギー変換機構の
解明研究課題名 (英文) Molecular Mechanism of energy transduction of dynein revealed by
genetic engineering, structural and enzyme kinetics studies

研究代表者

須藤 和夫 (SUTOH KAZUO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20111453

研究成果の概要 (和文)：細胞内で物質輸送を駆動したり細胞分裂時の染色体分離を担ったりする細胞質ダイニンがどのようにして ATP の加水分解エネルギーを力学的仕事に変換するか、その分子機構をあきらかにすることが本研究の目的である。本研究の成果としてはつぎのことがあげられる。(1) 遺伝子操作を駆使してダイニンの最小モータードメインを同定し、電子顕微鏡法でその構造をあきらかにした。(2) ATP 加水分解キネティクスをもとに、1 個のダイニンモータードメインは 3 か所の ATP 加水分解部位と 1 か所の ADP 結合部位をもつことをあきらかにした。そして、このうち 1 個の主要な ATP 加水分解部位がダイニンのモーター機能を駆動しており、残りの ATP 加水分解部位は、この主要部位を制御する部位であることもあきらかにした。(3) 主要 ATP 加水分解部位での反応ステップをストップフロー法で詳細に解析した。(4) 主要 ATP 加水分解部位の反応ステップに呼応して、モータードメインから突き出ているリンカーが大きくスイングし、レバーアームとして機能することを FRET 法や電子顕微鏡法であきらかにした(5) 主要 ATP 加水分解部位の加水分解ステップに呼応して、ダイニン上の微小管結合部位に構造変化がおこり、微小管とダイニンが会合と解離を繰り返すことをあきらかにした。このような成果に基づいて、ダイニンの作動機構のモデルを作り上げた。

研究成果の概要 (英文)：Our major goal of this project is to elucidate the molecular mechanism of energy transduction of cytoplasmic dynein by genetic engineering, structural studies and ATPase kinetics analyses. Our major results are: (1) we have identified the minimal motor domain of cytoplasmic dynein and examined its structure by electron microscopy. (2) Based on ATPase kinetics, we have identified three ATPase sites and one ADP-binding site in the minimal motor domain (380kDa), among which one is the primary ATPase site and the others are regulatory sites. (3) We have identified intermediate steps of the ATPase cycle by means of stopped-flow kinetics. (4) We have discovered that the linker protruding from the core ring swings as a lever-arm at specific steps of the ATPase cycle of the primary ATPase site. (5) We have shown that structural changes of the microtubule-binding domain of dynein are induced at specific ATPase steps of the primary ATPase site. Based on these findings, we have proposed a molecular model of energy transduction of cytoplasmic dynein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2006 年度	26,200,000	7,860,000	34,060,000
2007 年度	23,000,000	6,900,000	29,900,000

2008年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2009年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
総計	82,500,000	24,750,000	107,250,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：細胞質ダイニン、AAA+ファミリー、微小管、ATP加水分解酵素、FRET、電子顕微鏡、パワーストローク

1. 研究開始当初の背景

下等真核生物から哺乳動物にいたるまで、微小管を足場とするキネシンと細胞質ダイニンは細胞内物質輸送や細胞分裂に関与しており、両者は微小管上で反対方向に滑り運動する。キネシンについてはその結晶構造も解かれており、1分子レベルでの力学的挙動やATPaseキネティクスも詳細に調べられている。これに対して、細胞質ダイニンはその巨大なサイズのため遺伝子組換え体の作成ができず、キネシンに比べて研究が大きく遅れていた。こうしたなかで、われわれは細胞性粘菌を用いたダイニン発現系作成に成功し、ダイニンもキネシン同様に構造生物学的、生化学的、生物物理的アプローチで研究することを可能にした。

2. 研究の目的

細胞質ダイニンが微小管上で力を出す機構を分子レベルで明らかにすることが、本研究の目的である。そのため、(1)細胞質ダイニンの組換え体を駆使して、ダイニンの構造をあきらかにするとともに、ATP加水分解にともなう構造変化の詳細を解析する。(2)ATP加水分解反応の反応ステップの詳細を、ATP加水分解キネティクス解析であきらかにする。(3)こうしたATP加水分解反応ステップとダイニンの構造変化の共役を分

子レベルであきらかにすることで、ダイニンの力発生過程の分子機構に迫る。

3. 研究の方法

ダイニンモータードメインの構造解析は、主に電子顕微鏡法を用いた。モータードメインのATPase依存的構造変化は、FRET法により追跡した。またモータードメインのATPaseサイクルの詳細は、多数の変異体を用い、ストップフロー装置を用いて解析した。こうした構造生物学的、生化学的アプローチにより、ダイニンモータードメインの構造機能相関をあきらかにした。

4. 研究成果

(1)リンカー末端にGFPを融合し、AAAリングにBFPを融合したダイニンモータードメインを用い、ATP加水分解サイクルにともなうリンカーの動きをFRETシグナルの変化として追った。この結果、ATP加水分解にともないリンカーが2つの位置の間を行き来することがわかった。ダイニンモータードメインのAAA1, AAA3, AAA4モジュール3箇所ATP加水分解部位のうち、AAA1モジュールにある部位がこのリンカーの動きを支配していることがあきらかとなった (Kon et al., Nature Structural & Molecular Biology, 2005)。

(2)クライオ電子顕微鏡像3次元再構成によりダイニンモータードメイン-微小管複合体の3次元クライオ電子顕微鏡像を得ることに

成功した。微小管に結合したダイニンのはじめの3次元像である (Mizuno et al., PNAS 2007)。また、遊離のモータードメインの3次元クライオ像を2.4 Å分解能で得ることに成功した (Anthony et al., 論文準備中)。ATP加水分解ステップのふたつの状態 (パワーストローク前後) でのクライオEM像は (3) に述べる負染色像とよい一致を示し、リンカーがATP加水分解に伴い、大きくスイングすることをあきらかにした。

(3) ダイニンモータードメインの電子顕微鏡負染色像の解析から、ダイニンコアリングが、いままで考えられていた7員環ではなく、他のAAA+ファミリータンパク質同様に6個のAAAモジュールからなる6員環であることがわかった。また、電子顕微鏡プローブを駆使して、コアリング中のAAAモジュールの並び方も決定した。さらに、ATP加水分解にともなうリンカードメインの大きなスイングも見出した (Roberts et al., Cell 2009)。このスイングの状態は、FRET法で見出したリンカーの動きと一致し、両者の結果から、ATP加水分解が実際におこっている溶液中で、パワーストロークがどのような機構で引き起こされるか、その詳細があきらかとなった。

(4) リンカーの動きがパワーストロークとなってダイニンの動きを駆動するというモデルの当否を確かめるため、ダイニンモータードメインのさまざまな位置にビオチンタグを挿入し、これをストレプトアビジンでガラス基板上に固定した。リンカー末端近くで固定されたダイニンモータードメインは速い微小管滑りを駆動したが、リンカー末端から離れると、しだいに滑り速度は低下し、最後には数十分の一にまでなった。このことは、リンカー末端がレバーアームのように動いているというモデルを支持する。一方、リングを固定してもゆっくりした微小管滑り運動は停止しな

かった。この滑り運動は速い滑り運動と同じ方向性をもっていた。このことは、ダイニンモータードメインによる微小管滑り運動には、パワーストローク機構によるものと、それとはまったく異なる機構によるものがあることを示している (Shima et al., PNAS 2006)。

(5) ダイニンモータードメインと微小管はATP加水分解にともない解離会合を繰り返している。これとパワーストロークの位相があうことが微小管滑り運動には必須である。そこでダイニンモータードメインと微小管の相互作用を定量的に測定し、これがATP加水分解サイクルでどのように調節されているかを検討した。その結果、パワーストローク前には微小管に弱く結合していたダイニンモータードメインがパワーストローク後には強く結合することが分かった。またこの結合の強さの変化はリンカーの動きと同様にAAA1モジュールのATP加水分解と共役していることがあきらかとなった (Imamura et al., PNAS 2007)。

(6) ダイニンモータードメイン上の微小管結合部位はAAAリング構造と12nmにもなるコイルドコイルで隔てられているが、両者の緊密なコミュニケーションなしにはダイニンは微小管滑り運動を駆動できない。コイルドコイルを構成する2本の α らせんにCys残基を導入し、ジスルフィド結合で2本のらせんを固定するという実験をおこなった。この結果、2本のらせんは1ヘプタドリピート分(7残基)揺らいでおり、この揺らぎがATP加水分解部位と微小管結合部位のコミュニケーションを支配していることがあきらかとなった (Kon et al., Nature Structural and Molecular Biology 2009)。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計13件)

1. Satoshi Hiyama, Riho Gojo, Tomohiro

- Shima, Shoji Takeuchi and Kazuo Sutoh. Biomolecular-Motor-Based Nano- or Microscale Particle Translocations on DNA Microarrays. *Nano Letters*. Publication on Web on April 30, 2009.
2. Anthony J. Roberts, Naoki Numata, Matt L. Walker, Yusuke S. Kato, Bara Malkova, Takahide Kon, Reiko Ohkura, Fumio Arisaka, Peter J. Knight, Kazuo Sutoh, and Stan A. Burgess. "AAA+ Ring and Linker Swing Mechanism in the Dynein Motor" *Cell* 136, 485-595 (2009)
 3. Takahide Kon, Kenji Imamula, Anthony J Roberts, Reiko Ohkura, Peter J Knight, I R Gibbons, Stan A Burgess and Kazuo Sutoh. Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding" . *Nature Structural and Molecular Biology* 16, 325-333 (2009)
 4. Hiyama, S., Inoue, T., Shima, T., Moritani, Y., Suda, T., Sutoh, K. Autonomous Loading/Unloading and Transport of Specified Cargoes Using DNA Hybridization and Biological Motor-Based Motility. *Small* 4, 410-415 (2008)
 5. Naoko Mizuno, Akihiro Narita, Takahide Kon, Kazuo Sutoh, and Masahide Kikkawa. Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules. *PNAS* 104, 20832-20837 (2007).
 6. Kenji Imamula, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh. The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein. *PNAS* 104, 16134 (2007).
 7. Toshifumi Mogami, Takahide Kon*, Kohji Ito, Kazuo Sutoh. Kinetic characterization of tail swing steps in the ATPase cycle of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein. *J. Bio. Chem* 282, 21639 (2007).
 8. Tomohiro Shima, Takahide Kon, Kenji Imamula, Reiko Ohkura and Kazuo Sutoh. Two modes of microtubule sliding driven by cytoplasmic dynein. *PNAS* 103, 17736-17740 (2006).
 9. Setsuko Fujita-Becker, Georgios Tsiavaliaris, Reiko Ohkura, Takashi Shimada, Dietmar Manstein, and Kazuo Sutoh. Functional characterization of the amino-terminal region of myosin 2. *J. Bio. Chem.* 281, 36102-36109 (2006).
 10. Tomohiro Shima, Kenji Imamula, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh. Head-head coordination is required for the processive motion of cytoplasmic dynein, an AAA+ molecular motor. *J. Struc. Biol.* 156, 182-189 (2006)
 11. Takahide Kon, Toshifumi Mogami, Reiko Ohkura, Masaya Nishiura & Kazuo Sutoh. ATP-hydrolysis cycle-dependent stem motions in cytoplasmic dynein. *Nature Structural and Molecular Biology* 12, 513-519 (2005).
 12. Takahide Kon, Masaya Nishiura, Reiko Ohkura, Yoko Y. Toyoshima, and Kazuo Sutoh. Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein, as revealed by biochemical characterizations of recombinant fragments. *Biochemistry* 43, 11266-11274 (2004)

13. Nishiura, M., Kon, T., Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima, Y. Y., Sutoh, K. A single-headed recombinant fragment of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of microtubules. *J. Biol. Chem.* 279, 22799-22802 (2004)

[学会発表]

(招待講演) (計 6 件)

1. Sutoh K. Dynein-The old but still mysterious motor protein. The Biophysical Society subgroup meeting (2009)
2. Sutoh K. Communication of multiple ATPase sites of the dynein motor domain. Gordon Conference on Muscle and Molecular Motors (2008)
3. Sutoh K. Biochemical Dissection of Motor Functions of Cytoplasmic Dynein. The Biophysical Society annual meeting (2007)
4. Sutoh K. Force generation by cytoplasmic dynein, a microtubule-based motor protein that belongs to the AAA⁺ family. The 6th International Conference on AAA proteins (2007)
5. Sutoh K. Structure and Function of Dynein, A Huge Microtubule-based AAA⁺ Motor. The Biophysical Society annual meeting (2006)
6. Sutoh K. Molecular mechanism of force generation by cytoplasmic dynein as revealed by fully active recombinant motor domain. Gordon Conference on Muscle and Molecular Motors (2005)

(国外学会ポスター発表) (計 13 件)

1. Hasegawa Y., Shima T., Kon T., Sutoh K., Sutoh K. Elucidation of structural states of dimeric motor domain of dynein using Cys-light construct. The Biophysical Society annual meeting (USA)(2009)
2. Shima T., Numata N., Kon T., Ohkura R., Higuchi H., Sutoh K. How does the two-headed dynein processively walk on a microtubule? The Biophysical Society annual meeting (USA)(2009)
3. Mogami T., Imamula K., Ohkura R., Sutoh K., Kon T. Dissection of Inter-modular Communication among Multiple Nucleotide-binding/hydrolysis Sites of Cytoplasmic Dynein. The American Society of Cell Biology annual meeting (2008)
4. Imamula K, Kon T., Ohkura R, Sutoh K. Kinetic analysis of dynein-MT interaction. Biophysical Society annual meeting (USA) (2007)
5. Shima T, Kon T., Imamula K, Ohkura R., Sutoh K. Two modes of microtubule-sliding driven by cytoplasmic dynein. The Biophysical Society annual meeting (USA) (2007)
6. Numata N, Roberts A, Burgess SA, Kon, T., Ohkura, R., Knight, P. Sutoh, K. Are six AAA modules sufficient to form the AAA ring of dynein? The Biophysical Society annual meeting (USA) (2007)
7. Kon T., Imamura K., Okura R., Sutoh K. Dissection of Intra-molecular Communications

- between the Catalytic Head and Microtubule-binding Site in the Dynein Heavy Chain. The American Society of Cell Biology annual meeting (2006)
8. Sutoh K., Mogami T., Imamula K., Ohkura R., Kon T. Roles of multiple nucleotide-binding/hydrolysis sites of the cytoplasmic dynein motor domain in microtubule sliding. The Biophysical Society Discussion Meeting (USA) (2006)
9. Kon T., Imamura K., Okura R., and Sutoh K. Dissection of Intra-molecular Communications between the Catalytic Head and Microtubule-binding Site in the Dynein Heavy Chain. The Biophysical Society Discussion Meeting (USA) (2006)
10. Okura R, Kon T., Shima T., Sutoh K. Active participation of the stalk coiled-coil in communication between ATPase and MT-binding sites of cytoplasmic dynein. The Biophysical Society annual meeting (USA) (2005)
11. Kon T., Mogami T, Ohkura R, Sutoh K. ATP-hydrolysis cycle dependent stem motions in cytoplasmic dynein. Biophysical Society annual meeting (USA) (2005)
12. Mogami T, Kon T., Ohkura R, Sutoh K. Kinetic analysis of FRET changes of recombinant dynein motor domain. The Biophysical Society annual meeting (USA) (2005)
13. Kon T., Mogami T, Nishiura M, Sutoh K. Distinct roles of the four nucleotide-binding/hydrolysis sites in

the motor activities of cytoplasmic dynein. The American Society of Cell Biology annual meeting (2004)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 和夫 (SUTOH KAZUO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：1260192520

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

昆 隆英 (KON TAKAHIDE)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30332620