

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06147

研究課題名(和文)細胞内輸送方向を左右する細胞質ダイニン構造状態のライブイメージング

研究課題名(英文)Imaging of cytoplasmic dynein structural status

研究代表者

島 知弘(Shima, Tomohiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：60631786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物内でおこる多くの生命機能にとって、細胞内で物質が正しい方向へ輸送されることは非常に重要である。そのために、微小管上においてそれぞれ逆方向への輸送を担っているキネシンと細胞質ダイニンの運動活性が適切に調節される必要がある。近年この分子機構として、ダイニン1分子中に2つ存在するモータードメインの配向が変化することによる活性調節モデルが提唱されたが直接的な検証は進んでいない。そこで、本研究ではモータードメイン間の距離・配向を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により計測する手法を構築し検証したところ、モータードメイン間の距離が時間変動しヌクレオチド状態にも依存することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物内でおこる多くの生命機能にとって、細胞内で物質が正しい方向へ輸送されることは非常に重要である。そのためには、微小管上においてそれぞれ逆方向への輸送を担っているキネシンと細胞質ダイニンの運動活性が適切に調節される必要がある。小胞の種類や輸送経路ごとに多種多様なキネシンが存在するのに対し、細胞質ダイニンは1種類でほぼすべての細胞質中での小胞輸送に対応しているため、細胞質ダイニンの活性調節が輸送方向決定の鍵を握ると考えられている。

研究成果の概要(英文)：The appropriate intracellular transport is crucial for many biological functions in eukaryotes. For this purpose, the motor activities of kinesins and cytoplasmic dynein, which are responsible for transporting cargoes in opposite directions on microtubules, need to be properly regulated. Recently, a model has been proposed for the regulation of dynein activity by changing the orientation of the two motor domains in a single dynein molecule, but this has not yet been directly tested. In this study, we developed a method to measure the distance and orientation between the two motor domains by fluorescence resonance energy transfer (FRET), and obtained results suggesting that the distance between the motor domains varies with time and depends on the nucleotide state.

研究分野：生物物理

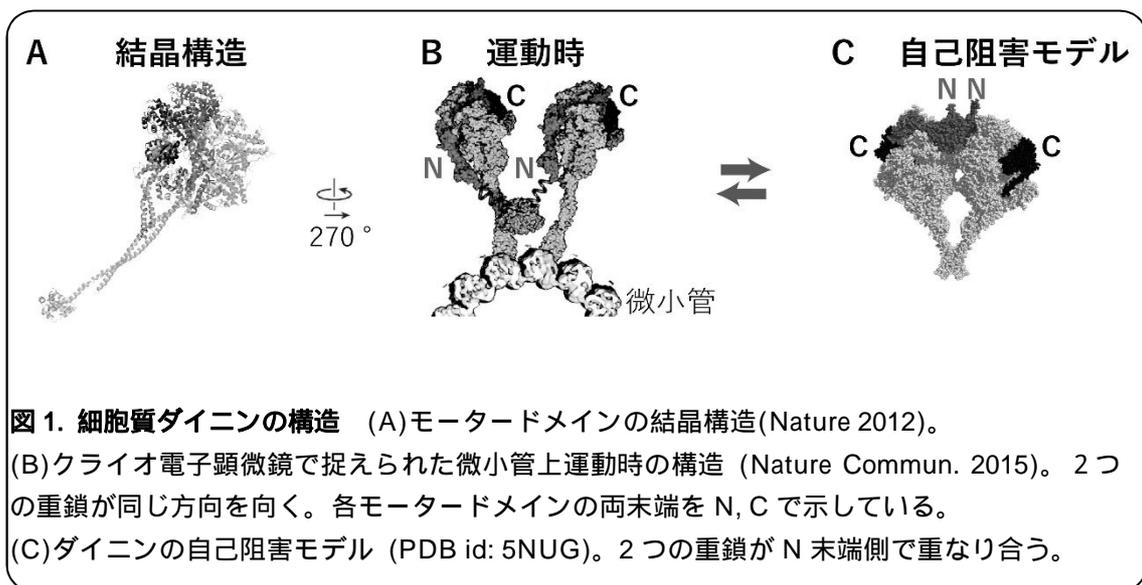
キーワード：自己阻害 蛍光共鳴エネルギー移動 細胞内輸送

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内輸送は、兵站として様々な生命機能の基盤となっている。細胞中心から細胞膜方向への輸送を担うキネシンと、その逆方向への輸送を担う細胞質ダイニンが同定されて 20 年以上が経過し、キネシンの動作・制御機構は分子構造のレベルから詳細な知見が蓄積されている。申請者らは、総分子量が 1 MDa を超える巨大さ故に動作機構研究が立ち遅れていた細胞質ダイニンについて、世界に先駆けて組換えタンパクの発現・精製系を確立し、分子機構研究をリードしてきた(J. Biol. Chem. 2004, J. Struc. Biol. 2006, Proc. Nat. Aca. Sci. USA 2006, FEBS Lett. 2011)。そして、ついにダイニンモータードメインの結晶構造を解明し(図 1 A. Nature 2012)、さらに微小管上を実際に運動しているダイニンのクライオ電子顕微鏡像を得るに至り(図 1 B. Nature Commun. 2015)、ダイニンの動作機構の理解もキネシンに迫るまで進んできた。

しかし、細胞内でキネシンとダイニンが協調的に輸送を行っている機構の詳細は未だに謎が多く残されている。例えば輸送中の細胞内小器官・膜小胞は、なめらかに目的地へと進むのではなく、頻りに運動方向や速度が変化する。さらに、キネシンあるいはダイニン一方のみを欠失・阻害した場合、もう一方のモーターが担う方向への輸送も阻害されることが知られている。これらはキネシンとダイニンの両者とも運動に寄与しうる状態で小胞に結合していることが、正常な輸送に必須であることを示している。しかし、いかに両者の活性を調節して、目的の方向への輸送を遂行しているのか、いまだ明らかではない。ここで特筆すべきは、キネシンはヒトにおいては 45 種類以上に多様化することで種々の物質の輸送に対応しているのに対し、細胞質ダイニンは 1 種類でほぼすべての細胞質中の物質輸送に関与していることである。したがって、**細胞質ダイニンはあらゆる状況に対応できるよう巧妙な活性調節機構を有し、それが輸送方向の決定に重要な役割を果たしている**と予想されてきた。

おもに構造解析の結果から、細胞質ダイニンの活性調節機構として、アダプタータンパク質の有無などによりダイニン 1 分子内の**重鎖 2 つ(ホモ二量体)の向きが調節され、それによって運動活性が大きく変化する**というモデルが提唱された(図 1C)。しかし、これまで細胞質ダイニンの構造状態と運動活性の同時計測は困難で、実験的検証は進んでいなかった。



## 2. 研究の目的

本研究は、細胞内輸送方向の決定機構を解明することを大きな目的とした。特にその一端として、細胞質ダイニンの2つの重鎖の向きと、ダイニンの運動活性や輸送方向との関連を明らかにすることに焦点をあてたものである。具体的には、

- i) 細胞内で実際に2つのダイニン重鎖の向きが変化するのか？
- ii) 2つのダイニン重鎖の向きと運動方向の関係は？

という2つの「問い」に答えるべく、ダイニン重鎖に蛍光タンパク質を導入し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)イメージングにより、ダイニン1分子中に含まれる2つの重鎖の構造状態を可視化することを目指した。

### 3. 研究の方法

モータードメイン間の距離・配向を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により計測する手法を構築した。まず、1分子 FRET 計測を実施するため、モータードメインの特定部位に蛍光標識用タグを挿入した細胞性粘菌由来ダイニン重鎖組換え体を設計し発現・精製した。さらに蛍光標識されたダイニンモータードメイン断片の二量体を用いて1分子 FRET 計測を実施し、その時間変動を解析した。同様の実験を、さまざまなヌクレオチド条件下で繰り返した。

### 4. 研究成果

蛍光標識された細胞質ダイニン重鎖組換え体の運動活性を評価したところ、野生型ダイニン重鎖と同レベルの運動活性を保持していることが確認できた。作製した蛍光標識ダイニンを用いて、ダイニン1分子が示す微小管上での運動を計測した結果、細胞性粘菌由来ダイニンが哺乳類ダイニンと同様に単独では一方向運動を示しにくいことを見出した。研究の進んでいる酵母由来の細胞質ダイニンとは異なり、細胞性粘菌由来ダイニンが哺乳類由来ダイニンと同じくなんらかの自己阻害調節機構を持つことを意味する。したがって、今後ダイニンの運動活性調節に対する研究材料として細胞性粘菌由来ダイニンも適していることを示している。

また、蛍光標識されたダイニンモータードメイン断片の二量体を用いた1分子 FRET 計測から、1分子内に2つ存在する細胞質ダイニンモータードメイン間の距離が時間変動していることを示唆する結果を得た。詳しく解析したところ、先行研究による構造学的知見と同様に、モータードメイン間の距離は主として2つの状態を取り、その頻度はダイニンのATP加水分解部位に結合するヌクレオチド状態に依存して変化することが明らかになった。この結果は、ダイニンモータードメインのスタック状態・オープン状態を FRET 効率の変動として可視化できていることを支持するものであり、ダイニンの自己運動制御機構の直接的検証への足掛かりとなるものである。

ダイニンの運動の分子機構を理解するうえで、どのようにダイニンがステップしているのかという詳細な情報と、ATP加水分解サイクルとステップの連関の情報は欠かせない。代表者は、分子科学研究所の飯野教授グループとの共同研究にて、上記の蛍光標識法を応用してダイニンモータードメインに金粒子を結合させ、その運動について暗視野顕微鏡を用いて高速に捉えることに成功し、これまでにない生理的条件に近い高濃度ATP存在下でのダイニンのステップ様式について詳細に記述することができた(Ando et al., *Sci. Rep.*, 2020)。また、京都大学・高田教授グループとの共同研究にて、ダイニンモータードメイン二量体の動きをATP加水分解サイクルから再現良く説明することにも成功した(Kubo et al., *Biophys. J.*, 2020)。これらの研究成果と1分子 FRET による自己阻害モデルの検証を合わせることで、細胞性粘菌由来ダイニンの運動について包括的に説明することができるようになるものと期待される。

In vitro 再構成系を用いたダイニンの運動活性評価は、これまでガラス表面上に微小管またはダイニン分子を固定した系で行われてきた。上記の成果も同様の手法を用いている。しかし、細胞内においては微小管・ダイニンの両者とも動くことができる状態が主である。したがって再構成系の結果から細胞内での動きを考察する上では、この状態の違いが微小管・ダイニンの運動に与える影響を考慮する必要がある。この影響を評価するため、研究代表者らはフランス・ジャックモノー研究所の Minc 博士らと共同研究を進め、微小管・ダイニンの両者が動ける状態での in vitro 再構成系の運動評価システムを構築した(Palenzuela et al., *Current Biology*, 2020)。この評価系によって、ダイニンの発揮した力によって微小管・ダイニンそれぞれがどのような動きをするのか、微小管や小胞の大きさをパラメータとして定式化することに成功した。本成果は、これまでの再構成系での知見から細胞内での運動を考察するうえで、重要な発見といえる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ando Jun, Shima Tomohiro, Kanazawa Riko, Shimo-Kon Rieko, Nakamura Akihiko, Yamamoto Mayuko, Kon Takahide, Iino Ryota	4. 巻 10
2. 論文標題 Small stepping motion of processive dynein revealed by load-free high-speed single-particle tracking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58070-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kubo Shintaroh, Shima Tomohiro, Takada Shoji	4. 巻 118
2. 論文標題 How Cytoplasmic Dynein Couples ATP Hydrolysis Cycle to Diverse Stepping Motions: Kinetic Modeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1930 ~ 1945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.03.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Narita Haruka, Ebata Hiroshi, Sakai Karibu, Minami Katsuhiko, Uemura Sotaro, Shima Tomohiro	4. 巻 2020.04.13.039537
2. 論文標題 Implementation of single molecule FRET for visualizing intramolecular movement in CRISPR-Cas9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.04.13.039537	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Palenzuela Heliciane, Lacroix Benjamin, Salle Jeremy, Minami Katsuhiko, Shima Tomohiro, Jegou Antoine, Romet-Lemonne Guillaume, Minc Nicolas	4. 巻 30
2. 論文標題 In Vitro Reconstitution of Dynein Force Exertion in Bulk Cytoplasm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 4534-4540.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.08.078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaneshiro Junichi, Okada Yasushi, Shima Tomohiro, Tsujii Mika, Imada Katsumi, Ichimura Taro, Watanabe Tomonobu M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Second harmonic generation polarization microscopy as a tool for protein structure analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 147 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.16.0_147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shintaroh Kubo, Tomohiro Shima, Shoji Takada	4. 巻 516179
2. 論文標題 Diverse stepping motions of cytoplasmic dynein revealed by kinetic modeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/516179	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 成田 晴香、桑原 誠、小森 智貴、村上 僚、島 知弘、塩見 美喜子、上村 想太郎
2. 発表標題 N- terminal region of Drosophila Argonaute2 can form amyloid fibrils
3. 学会等名 第19回日本蛋白質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田 晴香、桑原 誠、小森 智貴、村上 僚、島 知弘、塩見 美喜子、上村 想太郎
2. 発表標題 N- terminal region of Drosophila Argonaute2 can form amyloid fibrils
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaroh Kubo, Tomohiro Shima, Takahide Kon, Shoji Takada
2. 発表標題 Key residues on cytoplasmic dynein for asymmetric unbinding from microtubule
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Karibu Sakai, Tomotaka Komori, Tomohiro Shima, Sotaro Uemura
2. 発表標題 Synthesis of fluorescent ATP to elucidate coordination of multiple ATPase sites in cytoplasmic dynein
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Ando, Tomohiro Shima, Akihiko Nakamura, Akasit Visootsat, Mayuko Yamamoto, Takahide Kon, Ryota Iino
2. 発表標題 Single-particle tracking of motor domain of a processive dynein at microsecond time resolution and nanometer localization precision
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shintaroh Kubo, Tomohiro Shima, Shoji Takada
2. 発表標題 Bi-pedal motions of cytoplasmic dynein via Markov state modeling
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 Tomohiro Shima, Takahide Kon	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 420
3. 書名 Handbook of Dynein (Second Edition)	

1. 著者名 Tomohiro Shima, Sotaro Uemura	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 292
3. 書名 Make Life Visible	

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	南 克彦  (Minami Katsuhiko)	東京大学・理学系研究科・大学院生	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

## 〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オランダ	Delft University of Technology			
フランス	Institut Jacques-Monod			