

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03190

研究課題名（和文）ダイナクチン構造変化とダイニン運動制御機構の解明

研究課題名（英文）Conformational change of dynactin and regulatory mechanism of dynein motility

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・名誉教授

研究者番号：40158043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ダイナクチン複合体を高速原子間力顕微鏡で観察し、p150サブユニットの2つのドメインが大きくコンフォメーション変化をする姿を捉えた。ダイニン結合部位であるCC1ドメインは折れたたまった構造と伸びた構造の間を繰り返していた。また、微小管結合部位であるN末ドメインは、2又に分かれて2つの微小管結合部位を互いに遠ざけるように大きく伸長する様子が観察された。これらの結果から、ダイナクチンは予想外に大きく伸長した構造とコンパクトな構造を行き来することが明らかとなり、ダイナクチンがダイニンを微小管や微小管結合タンパク質にリクルートする際に、より広い領域でターゲットを捉えることに貢献することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイナクチンは巨大なタンパク質分子複合体で、非対称の複雑な構造をしている。我々はすでに電子顕微鏡観察により、大きく伸長したフォームとコンパクトなフォームがあることを観察していたが、生理的条件下でそれらの間のコンフォメーション変化が起こるものであるかどうかは明らかでなかった。今回、ダイナクチン複合体を高速原子間力顕微鏡で観察することにより、2つのフォームの間の動的なコンフォメーション変化を捉えることができた。天然変性領域が伸びたり縮んだりできることは、他のタンパク質でも示唆されているが、そのコンフォメーション変化の行き来（往復）の現象を直接的に示すことができたことは学術的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：The structure of dynactin has not been fully elucidated due to their highly dynamic nature. Here, we use high-speed atomic force microscopy to visualize the structural dynamics of dynactin and found that the largest subunit p150 showed large conformational changes in the two domains. The dynein-binding domain repeatedly made a transition between the folded form and the extended form. The N-terminal microtubule-binding domain, showed a bifurcated structure with two N-termini that move extensively. Furthermore, the mutant analysis identified that the intrinsically disordered region is responsible for the bifurcated structure and the conformational dynamics. These findings reveal that dynactin in solution takes unexpectedly extended conformation, as well as the previously reported compact conformation, suggesting that conformational changes in dynactin regulate the way it recruits dynein to microtubules or to microtubule-associated proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：ダイナクチン ダイニン 電子顕微鏡観察 高速原子間力顕微鏡観察 構造変化

1. 研究開始当初の背景

ダイナクチンはダイニン結合や微小管結合に関与するタンパク質で、細胞質におけるダイニン(微小管上を運動するモータータンパク質)の機能制御において重要な役割をもっている。ダイナクチンは、アクチンを含む14種類のタンパク質サブユニットから成る巨大な分子複合体を形成し、非対称の複雑な構造をしている。このうち、アクチンを含むロッドの部分は堅い構造をしているため、氷包埋の電子顕微鏡像の単粒子解析法により、ある程度の構造解析が行われていたが、ロッドから突き出したサイドアームの部分は、微小管結合部位やダイニン結合部位などの重要な機能ドメインがあるにもかかわらず、細長く柔軟な構造であるため、構造的な知見は限られていた。すでに我々は、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察を行い、サイドアームの部分の先端に繊維状の構造があり、それが伸長したフォームと折れたたまってコンパクトなフォームがあることを観察していた。しかし、それらのどちらかが何らかの損傷を受けた結果であるのか、それとも、生理的条件下でそれらの間のコンフォメーション変化が起こるものであるかどうかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

ダイナクチン複合体のサイドアーム部分のダイナミックな構造変化をとらえて、機能ドメインの役割を明らかにする目的で、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)によるダイナクチン複合体の観察を行った。溶液中のダイナクチン複合体を経時的に観察することにより、2つのフォームの間で繰り返し動的なコンフォメーション変化をするかどうかを確かめることにした。

3. 研究の方法

ダイナクチン複合体の精製

ダイナクチンサブユニットのp62とp150のcDNAをヒト培養細胞(HEK293)のcDNAライブラリからクローニングし、pcDNA5/FRT/T0ベクターに組み込んだ。SBPタグを含むGFPのDNAをp62またはp150 DNAのN末側の端に挿入し、stable HEK293において発現させたのち、SBPタグとアビジンによるアフィニティ精製を行い、さらにショ糖密度勾配遠心分離(30,000rpm, 20h)により複合体を精製した。p150のN末端付近の天然変性領域(IDR)の構造ダイナミクスに対する効果を調べるために、IDR一部または全部を欠損した変異体を作製した。

高速原子間力顕微鏡観察

内橋貴之博士(名古屋大学・教授)の協力を得て、精製したダイナクチン複合体溶液をマイカに塗布し、高速AFM観察を行った。スキャンスピードは150~300 ms/frameとした。

画像解析

高速AFM観察で得られた画像のいくつかの基準点の位置情報を、対象とする領域のMOIを設定し、その重心座標をImage Jにより求めた。

AlphaFold2による構造予測

p150の一部の領域(CC1, ICDなど)のアミノ酸配列情報を用いて、AlphaFold2によりダイマーという制約条件下で構造予測を行った。

4. 研究成果

(1) ダイナクチンサイドアームのコンフォメーション

ダイナクチン複合体のうち、ロッドから突き出しているサイドアームの突出部は、p150サブユニットのN末側領域で形成されているが、そのうちの3つのドメイン(NTD, CC1, ICD)の構造予測をAlphaFold2により行った。その結果、CC1はヘリックスのコイルドコイルが途中で折れたたまった像が得られ、ICDはAFMで観察された像とよく一致する2つの楕円体が並んだ像が得られた(図1)。

ダイナクチン複合体をAFM観察すると、以前に得られたネガティブ染色電子顕微鏡像と同様にサイドアームがロッドにドックしているものと、ロッドから離れているものの両方が見られた(図2A)。さらに、ロッドから離れているサイドアームの場合、CC1が折れたたまっている状態(CC1-folded)と、多少の折れ曲がりはあるものの伸長した状態(CC1-extended)の両方が観察された(図2)。

(2) P150のCC1領域におけるコンフォメーション変化

ダイナクチン複合体のサイドアーム中のCC1は、高速AFM観察によりfoldedとextendedの両方の形態を示すことが明らかになったが、高速AFMで経時的に観察すると、時折、この2つの

形態の間で変換が起こり、それが繰り返されることがわかった (図 3)。

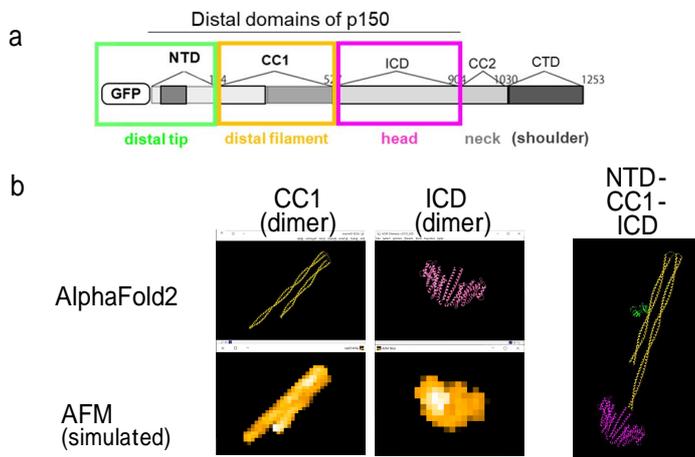


図1 ダイナクチン p150(サイドアーム)の末端側領域の構造シミュレーション
a:p150 のドメイン領域 b:AlphaFold2 によるシミュレーション

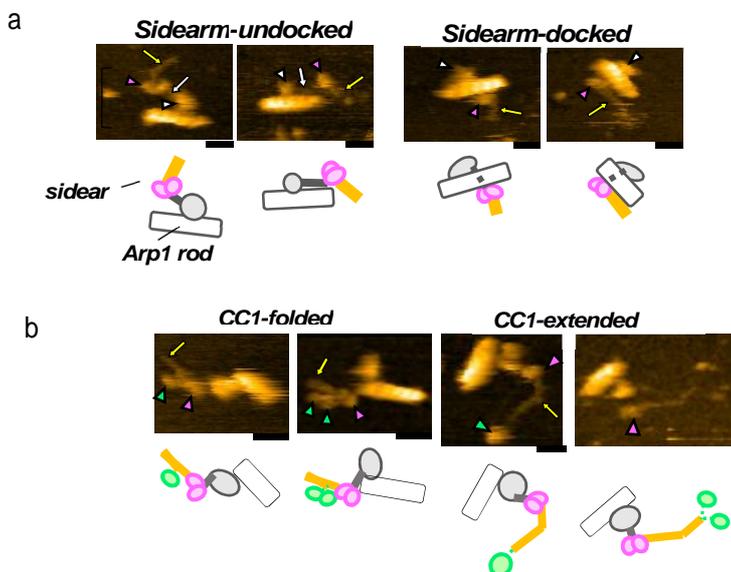


図2 ダイナクチン複合体の AFM 観察
a: Sidearm-undocked と-docked b: CC1-folded と -extended

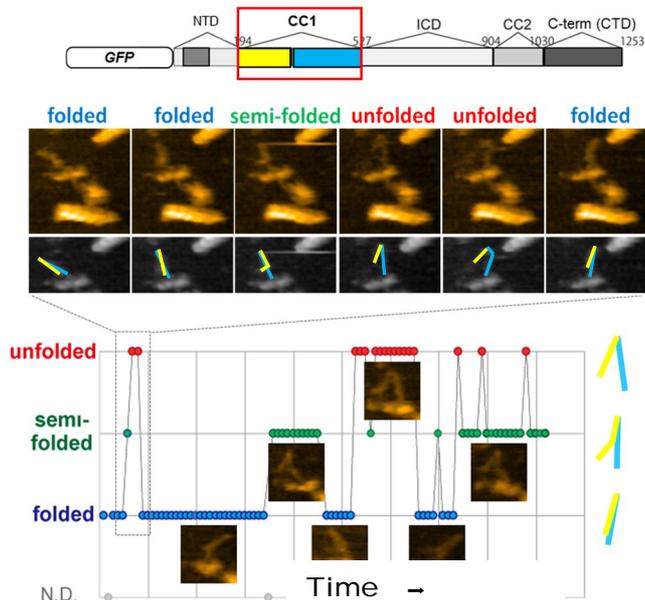


図3 CC1 コンフォメーション変化の過程
CC1 領域は、折れたたまった状態 (folded) と ほどけた状態 (unfolded) を繰り返す。

(3) p150 の N 末端領域のコンフォメーション変化

ダイナクチン複合体のサイドアーム突出部は、2 量体の p150 サブユニットの N 末側領域により構成されるが、最も N 末端に位置する NTD は 2 つに分かれて離れており、それぞれが動き回ることが観察された。2 つの NTD の動きの間に関連性は見られないが、両者の距離は 10 nm 以上離れていることが多い (図 4)

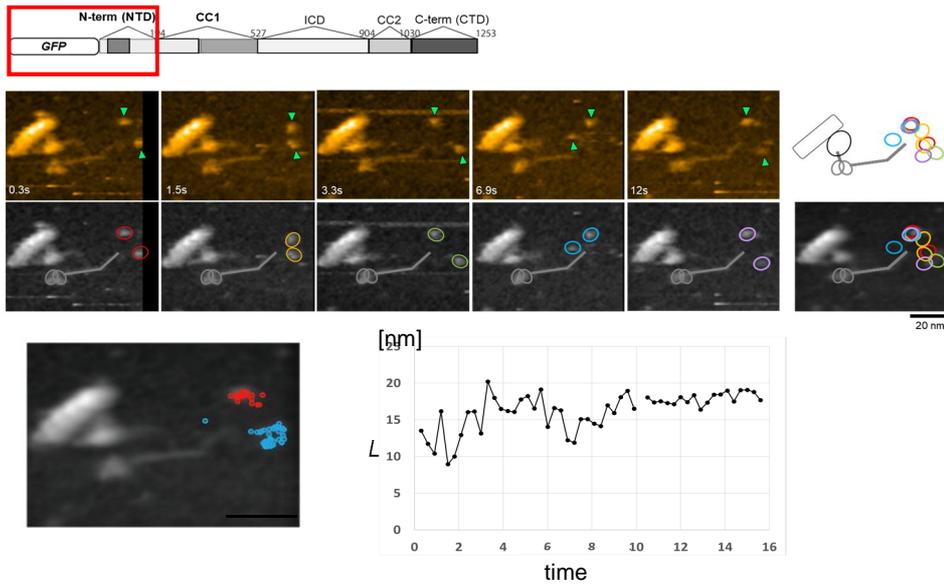


図4 NTD 領域のコンフォメーション変化

上: CC1 領域が伸長した状態 (extended) では、2 つの NTD 領域が分離して観察され、独立に動く。

下: 2 つの NTD 間の距離は 10 nm 以上離れている。

さらに、時折、CC1 領域と NTD 領域をつなぐ部分が大きく伸長して、CC1 領域の分岐点から NTD までの距離が 50 nm 以上離れ、2 つの NTD 間の距離も大きく離れることが観察された (図 5)

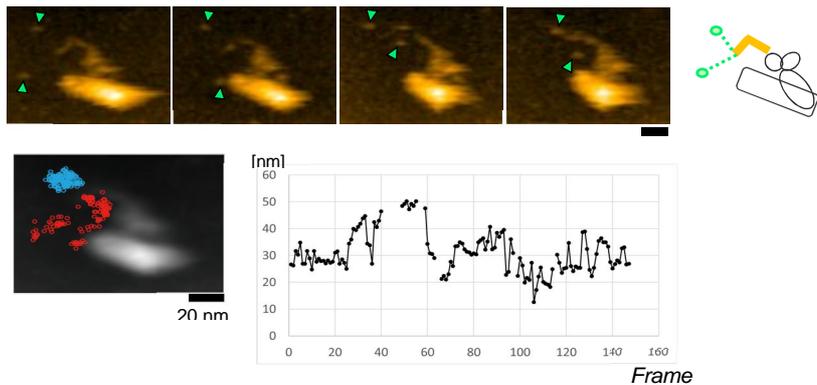


図5 CC1 と NTD をつなぐ領域のコンフォメーション変化

上: CC1 の端と 2 つの NTD の間の距離と、2 つの NTD 間の距離が大きく伸長する。

下: 2 つの NTD 間の距離は大きく離れる。

(4)

NTD 領域内の天然変性領域 (IDR) のコンフォメーション変化

P150 サブユニットの最も N 末に位置する CAP-gly とよばれる領域と CC1 間には天然変性領域 (IDR) があり、この部分が 2 つの NTD が分かれて距離を維持することに関与するかどうかを調べるために、この部分を欠損する変異体のシリーズを作製して調べた結果、IDR (94 アミノ酸残基) のうちの N 末側 3 分の 1 の塩基性アミノ酸に富む領域が、2 つの NTD 間の距離を離すことに寄与していることが明らかになった (図 6)

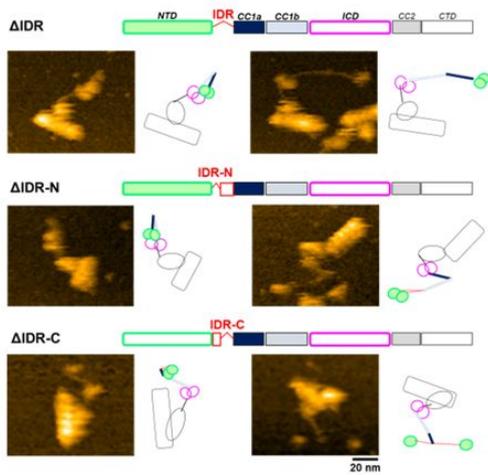


図6 2つのNTD間の距離を維持するために必要な領域
 上: IDR 変異体では、2つのNTDが接近している。中: IDR-N 変異体では、2つのNTDが接近している。下: IDR-C 変異体では、2つのNTDが大きく離れている。

さらに、C末側3分の2のIDRを欠損した変異体においても、CC1の分岐点からNTDまでの距離が70 nm以上もある大幅な伸長が観察された(図7)。このことは、この変異体における30数残基程度のアミノ酸がランダムにほどけたとしても到達できる距離ではないので、CC1のN末側の領域のコイルドコイル構造の一部(CC1A)がほどけることを強く示唆している。

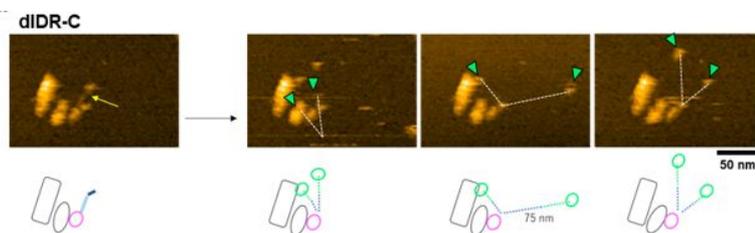


図7 IDR-C 変異体におけるNTDの伸長
 IDRのC末側アミノ酸(63残基)を欠損しても、2つのNTDは離れて、かつ、CC1領域からの距離は、野生型と同様に大きく伸長している。

以上の結果より、ダイナクチン複合体のサイドアームの突出部の構造は大きくコンフォメーション変化を行うことが明らかとなった(図8)。この領域は、微小管結合部位(NTD)とダイニン結合部位(CC1)に相当するので、細胞内で両者のリクルートに大きく寄与することが考えられる。

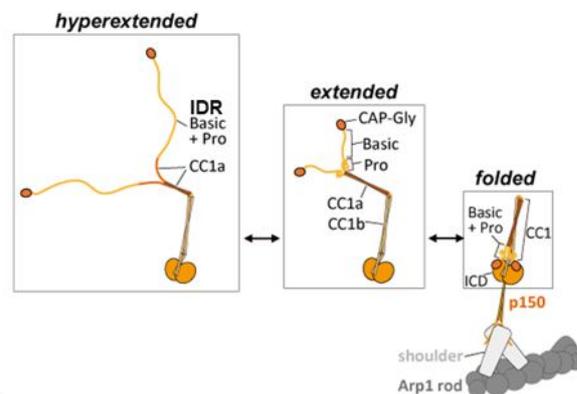


図8 ダイナクチンサイドアーム先端のコンフォメーション変化
 2つのNTDが大きく離れCC1の一部がほどけた構造(hyperextended)、IDRがほどけた構造(extended)、IDRがコンパクトになりCC1が閉じた構造(folded)の3つの状態のあいだでトランジエントにコンフォメーション変化を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saito Kei, Murayama Takashi, Hata Tomone, Kobayashi Takuya, Shibata Keitaro, Kazuno Saiko, Fujimura Tsutomu, Sakurai Takashi, Toyoshima Yoko Y.	4. 巻 31
2. 論文標題 Conformational diversity of dynactin sidearm and domain organization of its subunit p150	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1218 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-01-0031	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 Yamagishi Masahiko, Maruyama Yohei, Sugawa Mitsuhiro, Yajima Junichiro	4. 巻 555
2. 論文標題 Characterization of the motility of monomeric kinesin-5/Cin8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 115 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.134	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 Saito, K., Murayama, T., Hata, T., Kobayashi, T., Shibata, K., Kazuno, S., Fujimura, T., Sakurai, T., Toyoshima, Y. Y.	4. 巻 31
2. 論文標題 Conformational diversity of dynactin sidearm and domain organization of its subunit p150	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1218-1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-01-0031.	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 Yamaguchi Shin, Yamagishi Masahiko, Yajima Junichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Torque generating properties of Tetrahymena ciliary three-headed outer-arm dynein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21001-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugawa Mitsuhiro, Maruyama Yohei, Yamagishi Masahiko, Cross Robert A., Yajima Junichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Motor generated torque drives coupled yawing and orbital rotations of kinesin coated gold nanorods	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04304-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yoko Y. Toyoshima
2. 発表標題 Regulation of dynein motility -Autoinhibition of cytoplasmic dynein and the regulatory mechanism
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei Saito, Christian Ganser, Takuya Kobayashi, Takashi Murayama, Takayuki Uchihashi, Yoko Y. Toyoshima
2. 発表標題 Visualization of conformational dynamics of dynactin sidearms by high-speed AFM and negative stain EM
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiko Yamagishi, Junichiro Yajima
2. 発表標題 Plus-end directionality is present in the catalytic core of kinesin-14 minus-end directed motors
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusei Sato, Kohei Yoshimura, Kyohei Matsuda, Takeshi Haraguchi, Msahiko Yamagishi, Mitsuhiro Sugawa, Kohji Ito, Junichiro Yajima
2. 発表標題 Corkscrew motion of F-actin driven by myosin-1c observed via three-dimensional optical tracking microscope
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Saito, Takuya Kobayashi, Takashi Murayama, Yoko Y Toyoshima
2. 発表標題 Conformational diversity of dynactin sidearm
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	矢島 潤一郎 (Yajima Junichiro) (00453499)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授 (12601)	
研究分担者	須河 光弘 (Sugawa Mitsuhiro) (80626383)	東京大学・大学院総合文化研究科・助教 (12601)	2022年7月退職により共同研究を終了

	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	内橋 貴之 (Uchihashi Takayuki)		

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
---------	---------