

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370073

研究課題名(和文) 巨大モーター蛋白質ダイニンのX線結晶構造解析による作動機構の解明

研究課題名(英文) X-ray structural analysis of the 380-kDa motor domain of cytoplasmic dynein

研究代表者

昆 隆英 (KON, Takahide)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：30332620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：ダイニンは、多種多様な細胞運動のエンジンとしてはたらく巨大モータータンパク質複合体である。しかし、このエンジン自身がどのような仕組みで動いているのかという根本的な問いについては、半世紀近い研究にもかかわらず、多くの未解明問題が残されている。研究代表者らは、ダイニンモータードメインの2.8 Å分解能でのX線結晶構造解析を達成し、長年待ち望まれてきたダイニン中核領域の原子構造を明らかにすることに成功した。得られた結晶構造は、今後のダイニンメカニズム研究における重要基盤となるだろう。

研究成果の概要(英文)：Dyneins are huge microtubule-based motor complexes that power a wide variety of biological processes within eukaryotic cells, including cell division, cell migration, and the intracellular trafficking. However, the mechanism by which dynein generates force and movement still remains unclear. Here we have determined the crystal structure of the 380-kDa motor domain of Dictyostelium cytoplasmic dynein at 2.8-Å resolution. This long sought crystal structure, together with the results of our EM and functional analyses, provides a framework for understanding the mechanism underlying dynein-based motility.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：構造生物学 モータータンパク質 X線結晶構造解析 ナノマシン 酵素反応

1. 研究開始当初の背景

本研究課題は、いまだに謎に包まれている巨大分子モーター複合体「細胞質ダイニン」の運動機構を構造生物学的アプローチにより明らかにすることを目指すものである。

ダイニンは、ATP加水分解で得られたエネルギーを利用して微小管上を滑り運動する巨大な蛋白質複合体である。私たちの細胞内では、細胞内物質輸送、細胞分裂、細胞移動、鞭毛・繊毛運動など生命活動の基盤となる運動発生に必須の役割を果たすことが明らかにされてきた。しかし、ダイニン自身がどのような分子メカニズムで動いているのかという根本的な問いについては、半世紀近い研究にもかかわらず、多くの未解決問題が残されており、その解明は生物物理学・細胞生物学分野の重要な研究課題のひとつである。

ダイニンのメカニズム研究を困難にしてきた主要因は、1,000 kDaを超える分子としての巨大さと、多数のサブユニットからなり複数のATP加水分解部位を内包するといった分子としての複雑さである。より小型な細胞骨格系分子モーターであるミオシンやキネシンに比べ、ダイニンのメカニズム研究は大きく遅れており、その運動機構は長い間謎に包まれてきた。

しかし近年、ブレークスルーとなる3つの重要な技術的進展が報告され、ダイニン研究は急展開を迎えつつある。第一の進展は電子顕微鏡観察技術の向上により、ダイニンのヌクレオチド依存的な2つの構造状態が検出され、ダイニン運動機構を構造面から研究する手掛かりが得られたことである (Burgess *Nature* 2003)。第二の進展は、1分子計測技術の進歩により、ダイニンの微小管上の運動追跡が時空間的に高分解能で可能となったことが挙げられる (Toba *PNAS* 2006, Reck-Peterson *Cell* 2006, Gennerich *Cell* 2007)。第三の技術的進展は、運動機構解明に必須なダイニンの遺伝子組換え発現系が、世界に先駆けて申請者らにより確立され、従来不可能であった分子解剖的アプローチによるメカニズム研究が可能となったことである (Kon *Nature Struct. Mol. Biol.* 2005, Kon *Nature Struct. Mol. Biol.* 2009 など)。

このような技術的進展により、ダイニンの運動機構研究は、構造と機能の両面からのアプローチが可能で、新たな段階に入ったといえよう。また、組換え発現系によりダイニンの取り扱いが容易となったことで、複数の欧米研究グループがダイニンの運動機構研究に参入を開始しており、国際的な激しい競争が予想される状況にあった。

2. 研究の目的

ダイニンの運動機構を明らかにするためには、構造と機能の両面からのアプローチが重要である。しかし、ダイニンの構造についてのわたしたちの知見は、主にネガティブ染色

電子顕微鏡像に依存しているのが現状であり、運動機構を議論するためには信頼性及び空間分解能が不十分であった。したがって研究開始時点での最重要研究課題のひとつは、ダイニンの構造的特徴及び、ATP加水分解過程における構造変化を高空間分解能で明らかにすることであった。本研究では、これまでのダイニン研究の成果を基盤とし、X線結晶構造解析と電子顕微鏡像解析を相補的に利用することでこの課題を達成することを目標とした。具体的な目標を以下に示す。

(1) ダイニンの構造情報をX線結晶構造解析法により高空間分解能で得る。研究代表者は、科研費若手研究(A)「ダイニンの構造解析に基づいた、AAA型分子モーター作動機構の解明」(H20-H22)の中核課題として、ダイニンMD(運動活性を発揮する最小単一ポリペプチド鎖;分子量38万)の結晶化とそのX線構造解析を重点的に進めてきた。その結果、最初の構造決定まであと一歩という段階まで研究を進展させることに成功している。本研究では、現状の電子密度マップを改良し、ダイニンMDの結晶構造を3.5 Å以上の高分解能で決定することで、ダイニンの運動機構解明のための構造的基盤を得ることを目標とする。

(2) ダイニンの構造変化をクライオ電子顕微鏡再構成法で捉える。ダイニンのX線結晶構造解析を補完するために、構造解析のもうひとつのアプローチであるクライオ電子顕微鏡再構成法を採用する。本研究の目標は、ダイニンのATP加水分解過程における力と変位を生み出す構造変化を捉えることである。

3. 研究の方法

(1) ダイニンの構造情報をX線結晶構造解析により高空間分解能で得る。本研究では、ダイニンMDの原子分解能(3.5 Å分解能)での構造解析を行うことが目標である。研究代表者は、この目標を達成する過程のうち、次の技術的に困難なステップを既に乗り越えている:ダイニンMDの細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を発現系として用いた大量発現・精製系の構築、ダイニンMDの結晶化、3.2 Å空間分解能の回折データ収集、初期位相の決定。しかし、現在得られている電子密度マップの質は十分ではないため、ダイニンMDの信頼性の高い構造モデルを構築するのは困難である。そこで本研究では、以下に述べる複数のアプローチにより電子密度の改良を行い、達成され次第、ダイニンMDの詳細な構造解析を行うことを計画した。

電子密度マップを改良するためには、より高空間分解能の回折データを取得し、より正確に位相を決定することが重要である。高分解能回折データを取得する目的では、ダイニンMDのさらなる精製、結晶化条件検討、脱

水処理等の結晶化後処理検討，結晶のクライオ凍結条件検討および，大型放射光施設における結晶への放射線損傷を抑制したデータ収集法の検討を並行して行った．また，正確な位相情報を決定するために，研究代表者らが独自に開発した細胞性粘菌発現系におけるセレノメチオニン（SeMet）導入法の適用を試みた．本プロジェクトにおける X 線回折データ収集には，SPring-8 の大阪大学蛋白質研究所専用ビームライン(BL-44XU)及び，高エネルギー加速器研究機構の大型放射光施設を利用した．

(2) ダイニンの構造変化をクライオ電子顕微鏡再構成法で捉える．本研究では，ダイニン MD を ATP 加水分解過程のさまざまな中間状態にトラップし，その構造をクライオ電子顕微鏡再構成法で明らかにする．研究代表者は，ダイニン MD 変異体の ATP 加水分解反応の解析から，ダイニン ATP 加水分解サイクルを，結合ヌクレオチドがない状態，ATP 結合状態，ADP+Pi 結合状態，ADP 結合状態にトラップする変異体あるいはヌクレオチドアナログを同定しており（Kon *Biochemistry* 2004; Mogami *JBC* 2006; Imamura *PNAS* 2007），本研究ではこれらの条件を利用した．本研究は，海外共同研究者である Stan Burgess 博士（英国 Leeds 大学）との共同研究により遂行した．具体的には，ダイニン MD 二量体の設計・発現・精製は研究代表者が行い，電子顕微鏡解析は Burgess 研が行った．

4. 研究成果

(1) ダイニン MD の 4.5 Å 分解能での結晶構造解析

ダイニンは，その巨大さと構造的柔軟さから，従来結晶化がきわめて困難であるとされてきた．しかし申請者は，約 3 万条件のスクリーニングを経てダイニン MD の単結晶を得ることに成功していた．また，さまざまな条件検討により結晶の回折能を大幅に改良し，空間分解能 3.2 Å のデータセットを再現良く取得できる状況にあった．しかし，新規構造を持つダイニン MD の構造解析を成功させるためには，“位相問題”を解決する必要があった．

そこで本研究課題では，結晶の同型性と回折能を維持した状態で十分な位相情報を与える重原子導入条件の探索から研究を開始した．ダイニン MD は巨大タンパク質であるため，有効な重原子誘導体を得ることが非常に困難であったが，約 1 年間の検討の結果，タングステンクラスターとタンタルクラスターを導入した誘導体が位相決定に有用であることを見出した．この位相情報を基に構造解析を進めた結果，ダイニン MD 全体について 4.5 Å 分解能での結晶構造を得ることに成功した．

本構造解析で明らかになったのは，3,300

アミノ酸残基におよぶ長大なダイニン MD の主鎖構造の折り畳み様式である．ダイニン MD を構成する主要ドメイン ATP 加水分解を担う「リング」，微小管結合をつかさどる「ストーク」，そして力発生レバーである「リンカー」の主鎖構造が明らかになったことは重要である．また本研究では，従来の電子顕微鏡解析では検出されなかった新たなコイルドコイル構造を見出し，“ストラット”と命名した．この構造は，微小管結合ストークと ATP 加水分解リングの間を橋渡ししているため，ダイニンのモーター活性発揮に重要な役割を担うと推測された．本研究成果は，*Nature Structural & Molecular Biology* 誌に掲載され，同誌の News & Views に取り上げられるなど一定の評価を得た．

(2) ダイニン MD の 2.8 Å 分解能での結晶構造解析

研究成果(1)は，モーター活性を維持した完全長のダイニン MD について，初めて主鎖レベルの 3 次元構造を明らかにしたという点で大きな進展と言えるだろう．しかし，ダイニンの運動機構を原子レベルで議論するためには，より高分解能の構造解析が必要である．

本研究では，まず，ダイニン MD の発現コンストラクト，組換えダイニンの発現・精製条件，結晶化，結晶化後処理，回折データ収集などについてさらなる網羅的な検討を行うことで，2.8 Å 分解能の X 線回折データを取得することに成功した．次に，研究代表者らが独自に開発した細胞性粘菌発現系でのセレノメチオニン導入法を適用することで，良好な位相情報を取得することにも成功した．その結果，2.8 Å 分解能での結晶構造解析を達成し，長年にわたり待ち望まれてきた各アミノ酸残基レベルで運動メカニズムを議論することが可能なダイニン MD の原子モデルを得ることに遂に成功した．

本構造解析によりもたらされた重要知見としては，ATP 加水分解「リング」とエネルギー源である ATP/ADP 分子との結合様式が原子レベルで明らかになったことが挙げられる．また，ATP 加水分解を力発生に変換するうえで重要であると考えられる構造 力発生ユニット「リンカー」や微小管結合ユニット「ストーク」と ATP 加水分解「リング」をつなぐ構造 が原子レベルで明らかになったことも重要である．これらの構造的知見は，今後のダイニン運動機構研究の重要基盤となるだろう．本研究成果は，*Nature* 誌に掲載され，*Nature Structural & Molecular Biology* 誌の News & Views に取り上げられるなど一定の評価を得た．

(3) ダイニン MD の ATP 加水分解に伴う構造変化のクライオ電子顕微鏡による解析

研究成果(1)および(2)におけるダイニン MD の結晶構造解析は，ADP 結合状態，すなわち「力を発生した後」の構造を対象としたもの

である。ダイニンの運動機構を理解するためには、ATP加水分解過程の各中間状態、特に「力を発生する前」の構造を明らかにする必要がある。

しかし、本研究課題では、後者の結晶化には成功しなかったため、信頼性の高いクライオ電子顕微鏡再構成法を用いて「力発生前・後」の両方の中間状態の構造解析を試みた。その結果、ダイニン MD の ATP 加水分解過程における構造変化を低分解能ながら明らかにすることに成功した。また、研究成果(2)で得られた原子構造と統合することで、力発生ユニット「リンカー」の力を生み出す構造変化を、原子レベルでモデル化することができた。

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6件)

Roberts, A.J., Kon, T., Knight, P.J., Sutoh, K., Burgess, S.A.
Functions and mechanics of dynein motor proteins
Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2013, 14:713-726. 査読有.

昆 隆英, 栗栖 源嗣
細胞中心方向輸送エンジン：細胞質ダイニンの構造と運動メカニズム
生化学. 2013, 85(4): 272-275. 査読無.

Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamula, K., Shima, T., Sutoh, K., Kurisu, G.
The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain.
Nature 2012, 484: 345-350. 査読有.

Roberts, A.J., Malkova, B., Walker, M.L., Sakakibara, H., Numata, N., Kon, T., Ohkura, R., Edwards, T.A., Knight, P.J., Sutoh, K., Oiwa, K., Burgess, S.A.
ATP-Driven Remodeling of the Linker Domain in the Dynein Motor.
Structure 2012, 20:1670-1680. 査読有.

Kon, T., Sutoh, K., Kurisu, G.
X-ray structure of a functional full-length dynein motor domain.
Nature Struct Mol Biol. 2011 18(6):638-642. 査読有.

島 知弘, 須藤 和夫, 昆 隆英
細胞質ダイニンの構造と機能のモジュール性
生物物理. 2011, 51(3): 118-123. 査読無.

[学会発表](計13件)

Takahide Kon
“Structural and functional analysis of dynein motors”
International work shop Dynein2013, KOBE FASHION MUSEUM, Hyogo, Japan. 2013.11.1. 招待講演.

Takahide Kon
“Structural and functional analysis of dynein motors”
Alpbach Workshop on Molecular Motors 2013, Congress Centrum Alpbach, Tyrol, Austria. 2013.3.16-22. 招待講演.

Takahide Kon
“Structural basis of dynein motility”
第50回日本生物物理学会年會. 名古屋大学. 2012.9.22. シンポジウム講演.

昆 隆英
“結晶化後処理等による分解能向上例 - 12 から 2.8 Å へ, 巨大分子モーターの場合”
蛋白研セミナー「高難度結晶の分解能向上に秘策はあるか?」. 大阪大学. 2012.9.21. 口頭発表.

Takahide Kon
“Structural and functional analysis of dynein motors”
UK-Japan Symposium for Mechanochemical Cell Biology, Scarman House, University of Warwick, Coventry, UK. 2012.8.23-24. 招待講演.

Takahide Kon, Takuji Oyama, Rieko Shimo-Kon, Kazuo Sutoh, Genji Kurisu
“The 2.8-Å crystal structure of the dynein motor domain”
第12回日本蛋白質科学会年會. 名古屋国際会議場. 2012.6.20. ポスター発表.

昆 隆英
“結晶構造から見えてきたダイニンの力発生機構”
第2回分子モーター討論会. 東京大学本郷キャンパス. 2012.6.7. 口頭発表.

Takahide Kon
“Structural and functional analysis of dynein motors”
6th International Conference on Structural Analysis of Supramolecular Assemblies by Hybrid Methods, Granlibakken Conference Center Lodge, Lake Tahoe, CA, USA.

2012.3.14-18. 招待講演.

昆 隆英, 大山 拓次, 下・昆 理恵子, 須藤 和夫, 栗栖 源嗣

“ダイニンモータードメインの 2.8Å 結晶構造”

生体運動研究合同班会議. 筑波大学.

2012.1.7. 口頭発表.

Takahide Kon, Takuji Oyama, Rieko

Shimo-Kon, Kazuo Sutoh, Genji

Kurisu

“The 2.8-Å crystal structure of the dynein motor domain”

The American Society for Cell Biology

51th Annual Meeting. Colorado

Convention Center, Denver, CO, USA.

2011.12.5. ポスター発表.

昆 隆英

“ダイニンモータードメインの結晶構造”

第 6 回鞭毛・ダイニン機能研究会. 東京

大学理学部 2 号館. 2011.10.1. 口頭発表.

Takahide Kon

“Crystal Structure of the Dynein

Motor Domain at 5 Å Resolution”

第 49 回日本生物物理学会. 兵庫県立

大書写キャンパス. 2011.9.16. 口頭発表.

(ポスター発表に選抜).

Takahide Kon

“Crystal Structure of the Dynein

Motor Domain at 5 Å Resolution”

Gordon Research Conference-Muscle

& Motors. Colby-Sawyer College, New

London, NH, USA. 2011. 7.10-15. 招待

講演.

〔図書〕(計 1 件)

Kon, T., Shima, T., Sutoh, K.

Dynein | Cytoplasmic Dynein: its

ATPase Cycle and ATPase-dependent Structural Changes.

Comprehensive Biophysics, 1st

Edition (Editor in Chief: Edward

Egelman), 2012, vol 4: 4.19. Elsevier

6 . 研究組織

(1)研究代表者

昆 隆英 (KON, Takahide)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号 : 3 0 3 3 2 6 2 0

(3)連携研究者

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