

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370075

研究課題名(和文) ダイニン は リンカー スイング で 力 を 出す か？

研究課題名(英文) Does dynein generate force by the linker swing?

研究代表者

須藤 和夫 (Sutoh, Kazuo)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20111453

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)：本研究は、「ダイニンは、ATP加水分解に伴いリンカードメインを大きく振って力を出す」という仮説を1分子計測技術により検証することを目的としている。これまでに、1)開始時に最終段階にあったダイニン・モータードメインの高分解能X線結晶解析に成功し、1分子計測用コンストラクトに必要な構造を得ることができた。これを基礎に、微小ビーズ回転の計測に最適な変異ダイニンを設計・構築した。2)この変異ダイニンをスライドガラス上に固定し、リンカーに固定した微小ビーズの動きをATP/AMPPNP存在下、実時間で記録するシステムを構築した。3)現在は、ATPase依存的ビーズ回転のデータを収集中である。

研究成果の概要(英文)：The question addressed here is whether dynein generates force by ATPase-dependent linker swing. The following system has been set up for observing the linker swing at a single molecule level. The motor domain was attached on glass surface through interactions between His-tags and anti-His-tag antibodies. A small bead was attached at the end of the linker through the avidin-biotin interaction. Bead motions were observed in the presence of ATP under a microscope. Some beads (~0.1%) showed ~90 degree rotation as expected for the ATPase-dependent linker swing. To check if these rotations correspond to linker swings, ATP was quickly exchanged to AMPPNP, which should stop the linker swing. Each rotating beads were checked immediately after the solution exchange. Rotation of each bead examined so far did not stop. Further data collection is required to pick up beads motions reflecting the linker swing.

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：生物物理 運動・輸送 1分子計測 構造解析 ダイニン

1. 研究開始当初の背景

原生動物鞭毛から精製した軸系ダイニンを用いた先行研究から、1)ダイニンは AAA+ファミリータンパク質に属すること、2)モータードメインは AAA+ファミリータンパク質に特徴的なリング状構造をとること、3)リング構造からリンカーとよばれる長い棒状ドメインが突き出していること、そして4)リング構造内での ATP 加水分解にともないリンカーが大きくスイングすること、などが明らかにされ、この ATP 加水分解に伴うリンカーのスイングがダイニンのパワーstroke に対応するという仮説が提案された (Burgess et al., *Nature* 2003). 我々は細胞性粘菌・細胞質ダイニン由来である 380kDa モータードメイン (以下 MD と略記) の大量発現系の構築に世界に先駆けて成功し (Nishiura et al. *JBC* 2004), 複数の ATP 加水分解部位をもつ巨大で複雑な分子モーターの作動機構解明に向けた研究を開始した。そして複数の ATP 加水分解部位への変異導入などを介して、複数の ATP 加水分解部位のうち特定部位での ATP 加水分解がリンカーのスイングと共役していること (Kon et al., *Biochem.* 2004, Kon et al. *NSMB* 2005), あるいはこの加水分解反応の特定のステップがリンカーのスイングと共役していること (Mogami et al. *JBC* 2007, Imamura et al. *PNAS* 2007) を明らかにし、またリンカーのスイングの電子顕微鏡による構造解析 (Roberts et al., *Cell* 2009) を進め、「リンカーのスイング=パワーstroke」モデルの検証に努めてきた。こうした研究の結果、ダイニンの力発生機構研究は大きく進展したが、「リンカーのスイング=パワーstroke」モデルの最終的検証に至るには、MD の高分解能結晶構造解析という極めて困難な課題が残されていた。ダイニン自身は 1Mda を超える巨大分子であり、モータードメインだけでも 400kDa 近いので、結晶化から構造解析までの道のりには困難が予想されたが、幸いなことに本研究開始時には結晶解析がかなり進行しており、本研究初年度には 4.8 (Kon et al., *NSMB* 2011), そして 2.8 (Kon et al., *Nature* 2012) という高分解能構造を発表することができた。こうした X 線結晶構造解析の途中経過や、これまでに蓄積したダイニンの ATP 加水分解キネティックスのデータあるいは変異ダイニンの機能解析データを参考にしつつ、1 分子計測技術を用いて「リンカーのスイング=パワーstroke」モデルの実験的検証をおこなうという本研究を開始することになった。

2. 研究の目的

こうした背景のもと、「ダイニンはリンカーのスイングで力を出すか?」というダイニン作動機構の基本に関する問いに答えるべく、ATP 加水分解に伴うリンカーのスイングを 1 分子レベル、実時間で可視化し、その動きを定量化することを本研究の目的とした。こうしたデータを蓄積することで、ATP 加水分解依存的にリンカーが力を出しながらスイングするかどうか判断できれば、上記の問いに対する答えが得られよう。

3. 研究の方法

MD では、AAA+モジュール 6 個からなるリング状 ATPase ドメインが構造的中心となっている。この ATPase リングの第一 ATPase モジュール (リンカーのスイングを駆動する ATPase モジュール) から長い棒状リンカーが突き出しており、リングを横断している。ATP 加水分解サイクルに伴い、1) このリンカーがリング表面で 90° ほどスイングすること (Roberts et al., *Cell* 2009), そして 2) ATP 加水分解サイクルのサブステップにおいて、パワーstroke の前後で 90° リンカーのスイングがおこること (Kon et al. *NSMB* 2005) が、これまでの我々の研究で明らかになっている。そこで、本研究では、このリンカーの動きを顕微鏡下で可視化すべく、まずモータードメインをリンカーのスイングの邪魔にならないような配向でガラス基板上に固定し、次に固定されたモータードメインのリンカーに 290nm ビーズを固着させる。そして ATP 存在下でリンカーのスイングに伴うビーズの動きを実測し、リンカーのスイングを可視化するというアプローチをとることにした。こうした実験系で、観察チャンバー溶液の粘性抵抗を増すなどして、ビーズの動きの変化を調べることができれば、リンカーのスイングで力が出ているかどうか検証することが可能になる。

4. 研究成果

(1) まず、ガラス基板上に MD を特定の配向 (リンカーのスイングがガラス基板で邪魔されない向き) で固定し、固定した MD のリンカー先端に 290nm ビーズを固着するという実験系を構築した。こうした実験系のデザインとしては、ガラス基板への固定は複数個の His タグを MD に導入し、ガラス基板には抗 His タグ抗体を敷き詰める。また、リンカーにビーズを固着するには、リンカー先端部にビオチンタグを複数導入し、ストレプトアビジンで被覆したビーズを結合させる、といった方法が考えられる。このように多数の異なるタグ配列を MD に導入した変異体を作成する場合、ATP 加水分解依存的リンカーのスイングに影響が出

ないようにタグ挿入部位を慎重に選択する必要がある。このためには MD の原子レベルの構造が必要である。幸いなことに、我々は本研究開始後すぐに中分解能 (4.8 Å) の結晶構造を得ており、これに基づいて、次のような全長 20kb の Tet-off 発現コンストラクトを設計した。まず、ガラス基板に MD を固定するため、MD 一次構造の C 末端部分にある鎖に富む平面状構造の表面に出ている、なるべく柔軟性をもった領域 4 か所を選び、そこに His タグを挿入した。この C 末端平面構造はリング状 ATP 加水分解ドメインとは独立した別のドメインで、リングの片面を覆っており、リンカーが結合している面とはちょうど反対にある。つまり、ここで MD をガラス基板に固定すると、リンカーはちょうどリングの上向きに出ているので、ガラス基板に邪魔されることなくスイングすることが可能となる。さらに、リンカー末端に近く、かつリング構造との接触面とは反対方向に向いている 2 か所にビオチンタグを挿入した。このような配向であれば、リング構造上でビオチンタグに結合したストレプトアビジン・ビーズは自由にスイングできると期待される。なお、こうした変異体設計後、結晶構造分解能を 2.8 Å まで上げることができ、設計に改善すべき点が出たので、それに基づいて計測用変異体を再設計し、発現用コンストラクトの再構築をおこなった。この変異体を発現・精製し、ATP 加水分解活性や GFP-BFP/FRET 計測によるリンカースイングを測ったところ、野生型とほとんど差が見られず、複数のタグの挿入によってもリンカースイングが正常におこることが確かめられた。

(2) ATP 加水分解サイクル 1 回でリンカーは 90° の往復スイングを 1 回おこなう。我々がこれまでに明らかにした ATP 加水分解に伴うリンカースイングの反応キネティクスによると、ATP 加水分解後のリン酸放出ステップでパワーstroke に対応すると予想されるリンカースイングがおこり、その後の ATP 結合ステップでリカバリーストロークに対応すると予想されるリンカースイングがおこってリンカーの位置が元に戻る。1 分子計測では、このパワーstroke とリカバリーストロークに対応すると予想されるリンカースイングを反映するビーズの動きを顕微鏡下、実時間で可視化する。こうした実験系で、多数のビーズの中から、リンカースイングに対応する動きを示すものの候補を拾い出すには、パワーstroke とリカバリーストロークの間隔が十分に離れていることが望ましいので、そうした溶液条件の検討をおこなった。条件検討には

変異 MD に挿入した GFP-BFP ペアによる FRET 法を用いた。微小管が存在しない条件下では、1 サイクルのリンカースイングにサブミリ秒オーダーの時間がかかる。生理的 ATP 濃度では、ATP 結合速度がきわめて速く ( $> \sim 1000/s$ )、そのままではリカバリーストロークが瞬時にして終わってしまう。FRET 強度がこの半分になるような条件だと、パワーstroke とリカバリーストローク行き来が同じ速度で進行していることになる。ATP 濃度を下げて  $\sim 1\mu M$  ATP にすると、こうした条件が実現できる。ATP の拮抗阻害剤である AMPPNP を共存させて、見かけの ATP 濃度を低下させても (たとえば  $100\mu M$  ATP +  $30\mu M$  AMPPNP) この条件が実現できる。前者の場合は、そのままでは長時間の観察には適さず、ATP 再生系を併用しないとイケない。そこで、クレアチンリン酸とクレアチンキナーゼを用い、低濃度 ATP 存在下で FRET 計測をおこなったところ、クレアチンリン酸がダイニンに結合すると考えられるシグナルが得られた。こうしたことから、リンカースイングの 1 分子計測では、ATP と AMPPNP の混合溶液を用いて、パワーstroke とリカバリーストロークの間隔を広げることにした。

(3) 1 分子計測用のセットアップは次のようにした。ガラス基板上に作成したチェンバー内に抗 His タグ抗体を敷き詰め、カゼインでブロックしたのちに変異 MD を流し込む。MD は、C 末端サブドメイン内の 4 か所の His タグでガラス基板上の抗 His タグ抗体に結合する。MD 内の 4 個の His タグは MD・リング構造の片面を覆う C 端サブドメインに散在しているので、MD は抗 His 抗体を介して片面だけでしっかりとガラス基板上に結合していると期待できる。リンカーは、ガラス基板に付着した C 端サブドメインとは反対の面に結合しているため、この末端に位置している 2 個のビオチンタグにストレプトアビジン被覆した 290nm ビーズを固定する。2 個のビオチンタグはリングに結合したリンカーの上面に露出しているため、ビーズ上のストレプトアビジンに結合できる。こうしてガラス基板上に並んだ MD のリンカーにビーズを結合させ、ここに  $100\mu M$  ATP と  $30\mu M$  AMPPNP を含んだ溶液を流し込み、100 倍対物レンズを用いて明視野で直ちにビーズを観察した。このような実験系のコントロールとして、まったく同じ手順で、His タグを鎖にビオチンタグを鎖に挿入した F1ATPase を用い、ATP 存在下での鎖の回転をビーズ回転で検出した。チェンバー内の 1% ほどのビーズが毎秒数十回の速度で長時間 ( $> 10$  秒) 回転し続けるのが観察された。このことから、ここ

で用いているセットアップでリンカー  
スイングが検出可能と考えられる。MD  
を用いた実験では、多数のビーズは全く  
動かないが、数%のビーズは様々な動き  
をする。多くは長時間観察 (> 30 秒) で  
90° を大きく超える回転運動をするこ  
とから、ビーズ固定が完全でないサンプ  
ルのブラウン運動と思われる。少数のビ  
ーズ (~1/1000) は 90° 前後の回転運動  
をサブミリ秒で繰り返し、リンカースイ  
ングに対応しているものの候補である。  
これが本当にリンカースイングに対応  
しているかどうかを確認するため、  
90° スイングをしているビーズひとつ  
ひとつについて、チェンバー溶液を  
100uM AMPPNP に置きかえ、ビーズの動き  
が直ちに止まるかどうかを確認してい  
った。FRET 計測によると、この条件下  
では仮に少量の ATP がチェンバー内に残っ  
ても、リンカーはパワーストロークを終  
えた状態で停止しないとはいけない。これ  
までに数十個のビーズについて確認を  
したが、残念ながら AMPPNP で回転が停  
止するものはなかった。つまり、90° 回  
転しているものもビーズとリンカーと  
の結合が十分でなく、自由度が残ってい  
るためブラウン運動をしており、たまた  
ま 90° 位の回転が見えているというこ  
とである。今後は、回転観察するビーズ  
の個数を増やすとともに、バックグラウ  
ンドとなっているブラウン運動を抑え  
る工夫が必要となっている。具体的には、  
現在は 2 個のピオチンタグをリンカー N  
末端に挿入しているが、これを 3 個ある  
いは 4 個に増やして、リンカーとビーズ  
との結合をもっとしっかりしたものに  
することなどが必要となろう。

#### 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 4 件)

Anthony J. Roberts, Takahide Kon,  
Peter J. Knight, Kazuo Sutoh & Stan A.  
Burgess, Functions and Mechanics of  
dynein motor proteins, *Nature Reviews  
Molecular Cell Biology*, 査読あり,  
Vol.14, 2013, DOI:10.1038/nrm3667

Takahide Kon, Takuji Oyama, Reiko  
Shimo-Kon, Kenji Imamula, Tomohiro  
Shima, Kazuo Sutoh & Genji Kurisu, The  
2.8 Å crystal structure of the dynein  
motor domain, *Nature*, 査読あり,  
Vol.484, p345-p350, 2012,  
DOI:10.1038:nature10955

Antony J. Roberts, Bara Malkova, Matt  
Walker, Hitoshi Sakakibara, Naoki  
Numata, Peter J. Knight, Kazuo Sutoh,  
Kazuhiro Oiwa, Stan A. Burgess,

ATP-Driven Remodeling of the Linker  
Domain in the Dynein Motor, *Structure*,  
査読あり, Vol.20, p1670-p1680, 2012,  
DOI:10.1016/j.str.2012.07.003

Takahide Kon, Kazuo Sutoh Genji Kurisu,  
X-ray structure of a functional  
full-length dynein motor domain,  
*Nature Structural & Molecular Biology*,  
査読あり, Vol.18, p638-p642, 2011,  
DOI:10.1038/nsmb.2074

[学会発表](計 1 件)

S.A. Burgess, T. Kon, P.J. Knight & K.  
Sutoh, Mechanic insights of dynein  
motor action from electron microscopy  
studies, The 58<sup>th</sup> annual meeting of  
Biophysical Society (San Francisco,  
USA), Feb. 15-19 (2014)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 和夫 (Sutoh Kazuo)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号: 20111453

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木下一彦 (Kinosita Kazuhiko)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号: 30124366