

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291034

研究課題名(和文)ダイニン運動制御機構の構造基盤解明

研究課題名(英文)Structural basis for cytoplasmic dynein regulation

研究代表者

昆 隆英 (Kon, Takahide)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30332620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ダイニンは、ATP加水分解を利用して微小管上を滑り運動する巨大なモーター蛋白質複合体で、そのモーター活性は細胞内物質輸送、細胞移動、細胞分裂、鞭毛・繊毛運動など広範な細胞運動の駆動に必須である。しかし、これら多様な細胞内機能を発揮するために重要な「ダイニンの運動活性を制御するメカニズム」はいまだに謎に包まれている。研究代表者らは、本研究課題において、ダイニン不活性化複合体の構造解析を行い、この巨大分子モーターの制御機構について、その仕組みの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dynein is a huge microtubule-based motor complex that powers a wide variety of biological processes within eukaryotic cells, including cell division, cell migration, and the intracellular trafficking. However, the regulatory mechanism of dynein, which is critical for exerting these diverse cellular functions, still remains unclear. Here, we have performed electron microscopic analysis of dynein inactivated complex. This study provides a structural basis for understanding the mechanism underlying dynein-based motility.

研究分野：生物物理学・生化学・構造生物学

キーワード：分子モーター 構造生物学 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モータータンパク質複合体「ダイニン」の「運動制御機構」を構造生物学的アプローチにより明らかにすることを旨とするものである。

私たちの体を構成する細胞の中では、細胞骨格系分子モーターとよばれる3種類のタンパク質群 ミオシン、キネシン、ダイニンが ATP 加水分解で得られた化学エネルギーを力学的運動へと変換することで、生命活動に必要な様々な細胞運動を駆動している。主に筋肉の収縮を駆動するミオシンと、細胞の周辺方向（微小管プラス端方向）への物質輸送を主に担うキネシンについては、その運動機構と運動制御機構を原子レベルで議論することが可能な段階にまで研究が進展している。対照的に、細胞の中心方向（微小管マイナス端方向）への物質輸送を担う『ダイニン』の運動発生・制御機構については、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。

ダイニン研究の進展を阻んできた主要因のひとつは、その原子構造が明らかにされていないことにある。1990年代に結晶構造が決定されたミオシンやキネシンとは異なり、ダイニンの構造についての私たちの知見は、最近まで主にネガティブ染色電子顕微鏡像に依存している状況にあり、その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。ダイニンの原子構造を決定するためには、X線結晶構造解析法が現時点では最良の方法である。しかし、ダイニンは、巨大で複雑なタンパク質分子であること（運動活性を発揮する最小領域「モータードメイン (MD)」で 380 kDa と、その分子質量はミオシンの~4倍、キネシンの~10倍である）、柔軟性に富む構造を持つと予測されることなどから、その結晶化と高分解能構造解析は非常に困難であると言われてきた。

こうした状況の中、研究代表者らはこの問題に取り組み、過去半世紀にわたり待ち望まれてきたダイニン MD の結晶構造解析を遂に成功させた。まず、構造・機能解析の鍵となる組換えダイニンの大量発現系を世界に先駆けて開発した (Kon 2004 *Biochemistry*)。次に、ダイニン MD 全体の結晶化と 4.5 Å 分解能での解析を行うことで、二次構造レベルでその構造を明らかにした (Kon 2011 *Nature Struct. Mol. Biol.*)。さらに、翌年には、2.8 Å 分解能での結晶構造解析を行うことに成功し、各アミノ酸残基レベルで運動機構の議論が可能なダイニン MD の原子構造を決定した (Kon 2012 *Nature*)。一方で、UCSF (米国) および MRC/LMB (英国) の研究グループも 6 Å 分解能 (Carter 2011 *Science*)、続いて 3.3 Å 分解能 (Schmidt 2012 *Nature Struct. Mol. Biol.*) のダイニン

MD 結晶構造を研究代表者らとほぼ同時期に報告した。これら一連の研究の結果、ダイニンのメカニズム研究は原子レベルで議論することが可能な段階に達することとなった。

2. 研究の目的

ダイニン中核領域の原子構造が明らかになり、運動機構研究が急速に進展しつつある現在、その「運動活性を制御するメカニズム」の構造基盤を明らかにすることが次に求められる最重要課題のひとつであると言えるだろう。私たちの細胞内では、ただ1種類の細胞質ダイニンが、広範な細胞内機能 細胞内物質輸送、細胞分裂、細胞移動などを駆動している。そのため、ダイニンの運動活性を細胞内の特定の場所で特定のタイミングにオンあるいはオフにする制御機構は極めて重要であり、その解明はダイニンにより駆動される細胞運動の仕組みを理解するための鍵となるだろう。

ダイニン運動活性のオン・オフ制御は様々な階層で起こるが、特に重要だと考えられるのは次の2点である：(1) ダイニン MD 内の複数の ATP 加水分解部位による制御；(2) ダイニン複合体の中核をなす2個のMD間の相互作用による制御。本研究課題では、研究代表者らが独自に開発した組換えダイニン大量発現系とこれまで培ってきたダイニン構造・機能解析のノウハウを基盤として、これら重要なオン・オフ制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題は、X線構造解析を中心とし、電子顕微鏡解析と一分子機能解析を相補的に利用するハイブリッドアプローチによるダイニンのメカニズム研究である。

組換え細胞質ダイニンについては、研究代表者等が確立した細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* 大量発現・精製系を用いて調製した。本系を用いることで運動活性を維持した単分散の組換えダイニンタンパク質をミリグラムオーダーで得ることができる。

ダイニンの X 線結晶構造解析については、研究代表者 (昆 隆英) が、組換えダイニンの設計、発現、精製、結晶化および、X 線結晶構造解析を行った。構造解析計算については、蛋白質結晶構造解析の専門家である栗栖源嗣博士 (大阪大学蛋白質研究所) の支援を受けつつ行った。昆と栗栖は、科研費補助金基盤研究(B)「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」(H23-H25)において共同研究を行い、ダイニン MD の最初の結晶構造解析を成功させた実績があり、本研究においてもそのノウハウを最大限利用した。本研究課題における 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。

クライオ電子顕微鏡法を用いるアプローチについては、モータータンパク質の電子顕微鏡構造解析の専門家である Stan Burgess 博士 (英国 Leeds 大学) との共同研究により遂行した。昆と Burgess は、Human Frontier Science Program (HFSP) grant 「Structure and mechanism of cytoplasmic dynein」 (H20-H24) において国際共同研究体制を構築して以来、ダイニンの構造研究において深い連携関係を継続しており、本研究においてもこれまで蓄積したノウハウを最大限利用した。

ダイニンの機能解析については、ダイニンを対象とした 1 分子蛍光、暗視野、力学の各計測系を確立している古田健也博士 (情報通信研究機構) との共同研究により遂行した。

4. 研究成果

(1) ダイニン MD 内の複数の ATP 加水分解部位による制御機構の解明

細胞質ダイニン MD は、3 個の ATP 加水分解部位 (AAA1, AAA3, AAA4) を内包するが、ダイニンの微小管上の運動を直接駆動するのは AAA1 の ATP 加水分解過程である。これまでの研究により AAA3 と AAA4 の ATP 加水分解過程もダイニンモーター活性に重要であることが示され、これらの ATP 加水分解部位は直接もしくは間接的に AAA1 を制御していると考えられている。しかし、その制御メカニズムの実体については全く不明であった。

本研究では、AAA3 もしくは AAA4 の ATP 加水分解過程を点変異導入によりブロックし、その機能的・構造的影響を評価することで、制御機構を明らかにすることを目指した。まず、AAA3 もしくは AAA4 について一連の ATP 加水分解過程変異体を作成し、それらの影響を一分子計測および前定常状態速度論解析により評価した。その結果、AAA3 および AAA4 は、結合ヌクレオチドなし/ATP 結合状態ではモーター活性をオフ状態にし、ADP-Pi/ADP 結合状態ではモーター活性をオン状態にする、特殊な ATP 加水分解部位であることを強く示唆する生化学的証拠を得ることに成功した。

次に、制御機構の構造基盤を明らかにするために、一連の ATP 加水分解過程変異体について結晶構造解析を試みた。発現精製系の最適化と結晶化条件の網羅的な探索を行うことで、異なるヌクレオチド結合状態にトラップしたダイニン変異体について、各々の結晶化条件を複数確立することに成功した。しかし、得られた単結晶の回折分解能はいずれも 10 程度にとどまっている。構造解析が可能な 4 以上の回折データを得るためには、本研究で得られた条件を基盤として、結晶化条件およびクライオ凍結や脱水など結晶化後処理条件のさらなる検討を行い、結晶の質

を改善していくことが必要であろう。

(2) ダイニン MD 間の相互作用による制御機構の解明

近年の一連の研究により、細胞質ダイニン複合体を構成する 2 個のダイニン MD が互いにスタックすることでモーター活性がオフ状態になること、また、細胞内では大部分のダイニン分子がこの不活性化状態にあることが示唆されている。

本研究では、ダイニン二量体不活性化複合体の電子顕微鏡法による構造解析を進めることで、2 個のダイニン MD はどのような相互作用によりスタックしているのか、どのような仕組みによりモーター活性がオフ状態になるのか、そして不活性化状態から活性化状態にどのような仕組みで遷移するのかを明らかにすることを目指した。

まず、二量体ダイニンの発現・精製系の集中的な検討を行うことで、構造解析に必要な量 (ミリグラムオーダー) の複合体を高純度で得ることのできる系を確立した。次に、不活性化複合体の形成条件検討の過程で、ダイニンの二量体不活性化状態を強く安定化する新規タンパク質因子の同定に成功した。この因子とダイニン二量体の複合体を形成させることで、従来よりもはるかに高い効率で不活性化複合体を調製することが可能となった。

さらにこれらの系を用いて電子顕微鏡像を大量に取得し、二次元および三次元での単粒子解析を行った結果、二量体不活性化複合体には著しい構造多形が存在することを見出した。さらに、得られた構造情報を基に、ダイニン分子が、どのような仕組みで不活性化状態から、微小管上を歩行運動し積荷を輸送する活性化状態へと遷移するかについて、新たな構造モデルを構築することに成功した。

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)

Yamamoto, R., Obbineni, J.M., Alford, L.M., Ide, T., Owa, M., Hwang, J., Kon, T., Inaba, K., James, N., King, S.M., Ishikawa, T., Sale, W.S., Dutcher, S.K. *Chlamydomonas* DYX1C1/PF23 is essential for axonemal assembly and proper morphology of inner dynein arms. *PLoS Genet.* 2017, 13: e1007063. | DOI: 10.1371/journal.pgen.1006996. 査読有。

Kamiya, N., Mashimo, T., Takano, Y., Kon, T., Kurisu, G., Nakamura, H. Elastic properties of dynein motor

domain obtained from all-atom molecular dynamics simulations. *Protein Engineering, Design, and Selection* 2016, 1-9. | DOI: 10.1093/protein/gzw022
査読有.

Imai, H., Shima, T., Sutoh, K., Walker, M.L., Knight, P.J., Kon, T., Burgess, S.A.
Direct observation shows superposition and large scale flexibility within cytoplasmic dynein motors moving along microtubules. *Nature Commun.* 2015, 6: 8179. | DOI: 10.1038/ncomms9179.
査読有.

Uchimura, S., Fujii, T., Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y., Kurisu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K., Muto, E.
A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation. *J. Cell Biol.* 2015, 208: 211-222 | DOI: 10.1083/jcb.201407039.
査読有.

Nishikawa, Y., Oyama, T., Kamiya, N., Kon, T., Toyoshima, Y.Y., Nakamura, H., Kurisu, G.
Structure of the Entire Stalk Region of the Dynein Motor Domain *J. Mol. Biol.* 2014, 426:3232-3245 | DOI: 10.1016/j.jmb.2014.06.023.
査読有.

Ikuta, J., Kamisetty, N.K., Shitaku, H., Kotera, H., Kon, T., Yokokawa, R.
Tug-of-war of microtubule filaments at the boundary of a kinesin- and dynein-patterned surface *Sci. Rep.* 2014, 4: 5281 | DOI: 10.1038/srep05281
査読有.

[学会発表](計 12 件)

Kon, T.
“Structure and mechanism of dynein motors”
第 55 回日本生物物理学会年会. 熊本大学. 2017. シンポジウム講演.

Iida, S., Hanson, B., Kamiya, N., Kurisu, G., Kon, T., Nakamura, H., Harris, S.
Multiscale Simulations of Cytoplasmic Dynein: From All-atom

to Continuum Mechanics
第 55 回日本生物物理学会年会. 熊本大学. 2017.

Imai, H. and Kon, T.
How does cytoplasmic dynein look like while dynein stepping along microtubules?
Dynein International Workshop 2017. Awaji Yumebutai International Conference Center. 2017. 招待講演

Kon, T.
Trafficking toward the center of the cell: structure & mechanism of dynein
第 39 回日本分子生物学会大会. パシフィコ横浜. 2016. シンポジウム講演

Imai, H., Shima, T., Kon, T., Burgess, S.A., Kamimura, S., Knight, P.J.
Detection of difference between intra- and inter-tubulin dimer densities of GMPCPP-microtubules by cryo-EM using dynein as a marker.
第 54 回日本生物物理学会年会. つくば国際会議場. 2016.

細胞内の物質輸送を行う分子モーター「細胞質ダイニン」が動いているときの構造及び揺らぎのクライオ電子顕微鏡による直接観察
今井 洋、島 知弘、須藤 和夫、ML Walker、PJ Knight、昆 隆英、SA Burgess
生体運動研究合同班会議 2016. キャンパスプラザ京都. 2016

Imai, H., Shima, T., Sutoh, K., Walker, M.L., Knight, P.J., Kon, T. & Burgess, S.A.
Direct observation of cytoplasmic dynein stepping on microtubules by cryo-EM reveals novel hinge at stalk-stalkhead junction.
第 53 回日本生物物理学会年会. 金沢大学. 2015.

Kamiya, N., Mashimo, T., Takano, Y., Kon, T., Kurisu, G., Nakamura, H.
ELASTIC PROPERTY OF DYNEIN MOTOR DOMAIN OBTAINED FROM ALL-ATOM MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS IN EXPLICIT WATER
BIOPHYSICAL SOCIETY 59 T H ANNUAL MEETING. BALTIMORE CONVENTION CENTER. 2015

Imai, H., Shima, T., Sutoh, K., Walker, M.L., Knight, P.J., Kon, T. & Burgess,

S.A.
Direct observation by cryo-EM of
cytoplasmic dynein motors stepping
along microtubules.
The 2014 ascb/ifcb meeting.
Pennsylvania Convention Center.
2014

昆 隆英

細胞中心方向への輸送エンジン:細胞質
ダイニンの構造とその運動機構”
蛋白研セミナー・包括脳ネットワーク研
究会「第5回神経科学と構造生物学の
融合研究会」大阪大学. 2014.

昆 隆英

細胞中心方向への輸送エンジン:ダイニ
ンの構造とその作動メカニズム”
第87回日本生化学会大会. 国立京都国
際会館. 2014. シンポジウム講演.

Kamiya, N., Mashimo, N., Takano, Y.,
Kon, T., Kurisu, G., Nakamura, H.
Elastic property of dynein motor
domain obtained from all-atom
molecular dynamic simulations in
explicit water
第52回日本生物物理学会年会. 札幌コ
ンベンションセンター. 2014.

〔図書〕(計5件)

昆 隆英

リング型 ATP 加水分解モーター「ダイ
ニン」の構造と力発生機構
CSJ Current Review 26 分子マシンの
科学(日本化学会 編), 化学同人, 2017,
ISBN: 9784759813869, pp178-182

Oyama, T., Kurisu, G., Kon, T.
細胞内の巨大な分子モーター「ダイニ
ン」の構造解析
日本放射光学会誌「放射光」, 2016, 29:
1-8.

Kurisu, G., Kon, T.

Crystal structure of the cytoplasmic
dynein motor domain.
ライフサイエンス領域融合レビュー,
2016, 5, e001 | DOI:
10.7875/leading.author.5.e001

昆 隆英

「ダイニン」

1 分子生物学(原田慶恵, 石渡信一 編),
5 章, 63-73
化学同人
2014 年 10 月 10 日 発行 B5 判 304 ペ
ージ ISBN 9784759815184

昆 隆英

細胞中心方向への輸送エンジン「ダイニ
ン」の構造と運動機構
「構造生命科学で何がわかるのか,何が
できるのか」
田中啓二, 若槻壮市 / 編
実験医学増刊 32: 221-224.
2014 年 06 月 発行 B5 判 230 ページ
ISBN 978-4-7581-0339-8

6. 研究組織

(1)研究代表者

昆 隆英 (KON, Takahide)
大阪大学・理学研究科・教授
研究者番号: 3 0 3 3 2 6 2 0

(2)研究分担者

なし

(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

古田 健也 (FURUTA, Kenya)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT 研
究所・主任研究員
研究者番号: 4 0 5 7 1 8 3 1