

ダイニン組換え体発現と、その構造・動態に基づくエネルギー  
変換機構の解明ー生物分子モーター研究の新たなフロンティアの展開ー  
Molecular studies on force generation of recombinant  
dynein based on its structure and dynamics

須藤 和夫 (SUTOH, Kazuo)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授



研究の概要

世界に先駆けて構築した組換えダイニンモータードメインを用い、構造解析(3次元クライオ電子顕微鏡法とX線結晶解析)と1分子機能解析(1分子FRET, 1分子力学計測, 1分子TIRFトラッキング)を駆使して、微小管上でのダイニン滑り運動の分子機構をあきらかにする。

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: モータータンパク質・ダイニン・微小管・滑り運動機構

1. 研究開始当初の背景・動機

ダイニンの構造・機能研究は、ミオシン、キネシンに比べて大きく遅れていた。これはその巨大なサイズゆえに機能を維持した組換えダイニン発現が困難だったためである。我々は、細胞性粘菌を発現系として完全なモーター活性をもった380kDaダイニンモータードメインの発現に世界に先駆けて成功し、ダイニン研究にあらたな地平を切り開いた。ダイニンはAAA+ファミリーに属するモータータンパク質であり、キネシンやミオシンとはまったく異なる構造をもつ。ダイニンの力発生にかかわる分子機構を解明できれば、シャペロンやヘリカーゼといった分子モーターをふくむAAA+ファミリータンパク質に共通する化学・力学共役機構が見えてくる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) ダイニンモータードメインの構造を電子顕微鏡レベル、そして最終的には原子レベルであきらかにする。(2) そのATP加水分解にともなう構造変化と力発生の共役機構を分子レベルであきらかにする。

3. 研究の方法

(1) クライオ3次元電子顕微鏡法。(2) X線結晶解析。(3) 1分子FRET。(4) 1分子力学計測。(5) ATPaseキネティック

4. これまでの成果

(1) クライオ電子顕微鏡像3次元再構成によりMD-微小管複合体の3次元クライオ電子顕微鏡像を得ることに成功した(Mizuno et al., PNAS 2007)。

(2) 負染色電子顕微鏡法により、MD中のリンカーの位置を同定した。リンカーはATP加水分解にともないレバーアーム様の動きをすることがEM画像解析から実証された。これは以下に述べるFRET計測の結果とも一致する(Roberts et al., 投稿準備中)。

(3) リンカー末端にGFPを融合し、AAAリングにBFPを融合したMDを用い、ATP加水分解サイクルにともなうリンカーの動きをFRETシグナルの変化として追った。この結果、ATP加水分解にともないリンカーが2つの位置の間を行き来することがわかった。MDには3箇所のATP加水分解部位があるが、そのうちのひとつがこのリンカーの動きにかかわっていた。(Kon et al., Nature Structural & Molecular Biology, 2005)。

(4) パワーストロークモデルの当否を確かめるため、MDのさまざまな位置にビオチンタグを挿入し、これをストレプトアビジンでガラス基板上に固定した。リンカー末端近くで固定されたMDは速い微小管滑りを駆動したが、リンカー末端から離れると、しだいに滑り速度は低下し、最後には

数十分の一にまでなった。一方、リングを固定してもゆっくりした微小管滑り運動は停止しなかった。このことは、MDによる微小管滑り運動には、パワーストローク機構によるものと、それとはまったく異なる機構によるものがあることを示している (Shima et al., *PNAS* 2006)。

(5) MDと微小管はATP加水分解にともな解離会合を繰り返している。これとパワーストロークの位相があうことが微小管滑り運動には必須である。そこでMDと微小管の相互作用を定量的に測定し、これがATP加水分解サイクルでどのように調節されているかを検討した。その結果、パワーストローク前には微小管に弱く結合していたMDがパワーストローク後には強く結合することが分かった。またこの結合の強さの変化はリンカーの動きと同様にAAA1モジュールのATP加水分解と共役していることがあきらかとなった (Imamula et al., *PNAS* 2007、Mogami et al., *J. Biol. Chem.* 2007)

(6) 微小管結合部位はAAAリング構造と12nmにもなるコイルドコイルで隔てられているが、両者の緊密なコミュニケーションなしにはダイニンは微小管滑り運動を駆動できない。コイルドコイルを構成する2本の $\alpha$ らせんにCys残基を導入し、ジスルフィド結合で2本のらせんを固定するという実験をおこなった結果、ダイニンはコイルドコイルでのらせんの滑りをATP加水分解部位と微小管結合部位間のコミュニケーションに利用していることが明らかとなった (Kon et al., 投稿準備中)。

#### 5. これまでの進捗状況と今後の計画

(1) 進捗状況：多くの構造データと生化学データがたまっている。投稿準備中の論文も含め次々と結果は発表している。研究は概ね順調に進行していると考えている。

(2) 今後の計画：1. 結晶化：スクリーニングを続ける。活性にかかわりのない余分なループ領域を削るなど、MDコンストラクトの見直しもおこなう。2. クライオ3次元電子顕微鏡法：3次元クライオEMにより、ダイニンMDの1粒子解析をおこなう。負染色法の単粒子解析で得られたATP加水分解にともなうリンカーリングをクライオ3次元EMで確認するとともに、そうした動きにともなうAAAリングの構造変化の詳細もあきらかにする。3. MDから反応性の高いCysを除いたCys-lightダイニン構築とMDのヘテロダイマー形成のためのタグを構築した。このふたつのツールを組み合わせ、異なる蛍光プローブをもつヘテロMDダイマーを作り、これが微小管上を歩いているときのサブドメインの動きを1分子FRET計測ある

いは1分子TIRF計測で可視化する。

6. これまでの発表論文等  
(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Naoko Mizuno, Akihiro

Narita, Takahide Kon, **Kazuo Sutoh**, and Masahide Kikkawa. Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules. *PNAS* 104, 20832-20837 (2007).

2. Kenji Imamula, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and **Kazuo Sutoh**. The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein. *PNAS* 104, 16134 (2007).

3. Toshifumi Mogami, Takahide Kon, Kohji Ito, **Kazuo Sutoh**. Kinetic characterization of tail swing steps in the ATPase cycle of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem* 282, 21639 (2007).

4. Tomohiro Shima, Takahide Kon, Kenji Imamula, Reiko Ohkura and **Kazuo Sutoh**. Two modes of microtubule sliding driven by cytoplasmic dynein. *PNAS* 103, 17736-17740 (2006).

5. Tomohiro Shima, Kenji Imamula, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and **Kazuo Sutoh**. "Head-head coordination is required for the processive motion of cytoplasmic dynein, an AAA+ molecular motor" *J. Struct. Biol.* 156, 182-189 (2006)

6. Takahide Kon, Toshifumi Mogami, Reiko Ohkura, Masaya Nishiura & **Kazuo Sutoh**. ATP-hydrolysis cycle-dependent stem motions in cytoplasmic dynein. *Nature Structural and Molecular Biology* 12, 513-519 (2005)

7. ホームページ

<http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/labs/sutoh/>