

研 究 報 告 書

「構造から迫る細胞内輸送マシナリー」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 昆 隆 英

1. 研究のねらい

私たちの体を構成する細胞は、神経軸索輸送に代表される効率的な物質輸送システムを内包しており、その機能は生命活動に必須である。細胞の中心方向への輸送は、質量 1,000 kDa を超える巨大モータータンパク質複合体「ダイニン」が一手に担っているが、その運動発生・制御機構は、長年の精力的な研究にもかかわらず、いまだに謎に包まれている。

本研究課題では、輸送システムの心臓部であるダイニンの運動を生み出す構造変化を原子レベルで決定するとともに、輸送マシナリーを構成するより高次の複合体構造を明らかにすることで、細胞中心方向への輸送機構の全貌を解明することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究の最も重要な成果のひとつは、「ダイニン分子が微小管上を直進運動する姿」をクライオ電子顕微鏡構造解析により初めて捉えたことである。本成果は、従来“想像”するしかなかった、ダイニン輸送系の動く様子を直接可視化し、主要な中間体構造を明らかにしたという点で非常に重要な進展であるといえるだろう。また、本研究では、得られた構造モデルに基づいたダイニン分子の1分子運動・力学解析も行い、ダイニンの歩行機構について新たなモデルを提唱した。さらに、細胞内物質輸送機構の原子レベルでの理解に重要な「ダイニン構造変化中間体」と「ダイニン・モーター活性制御因子複合体」の結晶化にも成功し今後の構造解析へ道を拓いた。これらの成果を基盤として今後研究が進展すれば、ダイニンの機能あるいは部分的な機能不全と深く関連すると考えられているヒトの疾病—神経変性疾患、発生異常、がん、ウイルス感染など—の詳細な発症機構が明らかになると期待される。

(2) 詳細

私たちの体を構成する細胞は、効率的な物質輸送システムを内包しており、核、ミトコンドリア、RNA、タンパク質など多種多様な物質を、必要な場所に必要なタイミングで輸送している。この輸送システムは、私たちが生きていくうえで欠くことのできない重要なもので、その機能が部分的にでも失われると、脳神経系疾病、発生異常、がん発症などに関連すると考えられている。

本さがけ研究「構造から迫る細胞内輸送マシナリー」では、輸送システムの心臓部を構成する巨大分子モーター複合体—『ダイニン』の運動を生み出す構造変化を原子レベルで決定するとともに、輸送マシナリーを構成するより高次の複合体構造を明らかにすることで、細胞内物質輸送機構の全貌を解明することを目指している。具体的には、細胞中心方向物質輸

送機構を解明する上で最重要と考えられる以下の4つの研究項目を進めた。

- ダイニンのATP加水分解サイクル過程に伴う構造変化を結晶構造解析で捉える
- ダイニンモーター活性制御因子の作用機構の構造基盤を明らかにする
- 微小管上を歩行運動するダイニンの構造をクライオ電子顕微鏡像再構成法で捉える
- 構造に基づく1分子運動・力学計測によりダイニンの運動機構を明らかにする

本報告書では、これらのうち顕著な成果が得られた後半二つの研究項目について以下に詳述する。

「微小管上を歩行運動するダイニンの構造をクライオ電子顕微鏡像再構成法で捉える」

細胞中心方向の物質輸送研究(ダイニンのメカニズム研究)の進展を阻んできた主要因のひとつは、その構造情報が十分ではないことにあった。ダイニン中核領域(モータードメイン)の原子構造は、ここ数年で、本さがけ研究者を含めた複数の研究グループより明らかにされてきた。しかし、ダイニンが力を発生し動くしくみを理解する上で最も重要な、『ダイニンが微小管上を直進運動する姿』を捉えることは、技術的に極めて難しく、成功例は皆無だった。

本研究では、クライオ電子顕微鏡像二次元単粒子解析法により、微小管の上を動いている最中のダイニンの構造をとらえることに、初めて成功した(研究成果リスト1)。本研究は、特別にデザインした組換えダイニンを用い、数年間をかけてクライオ電子顕微鏡観察条件の最適化を行い、新規画像解析法を適用した結果、達成

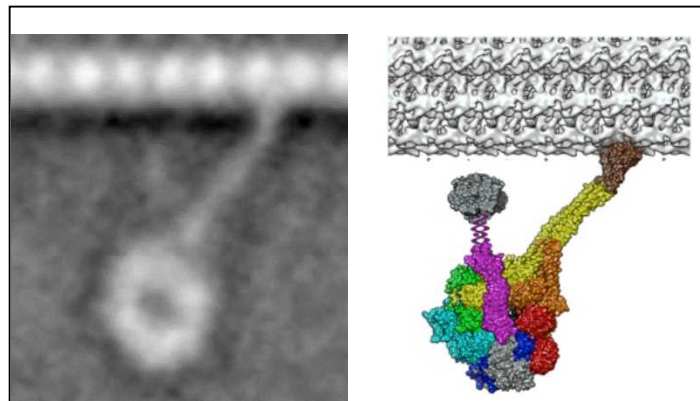


図1: 微小管上を歩行運動するダイニン分子のクライオ電子顕微鏡像とその原子モデル

されたものである。本研究により次の重要知見が得られている。(図1)

- ダイニンが微小管上を運動する際にとる、2つの主要な新規構造を発見した。
- ダイニンは2本の脚(モータードメイン)を用いて微小管上を運動するが、2本の脚がどの方向を向き、相対的にどのような距離にあり、微小管に対してどのような角度で結合するかという、運動機構理解の根幹となる構造情報が得られた。
- ダイニンは微小管に結合した状態で最大20 nm以上も揺らぎながら直進運動することが明らかになった。

これらの知見は、従来“想像”するしかなかった、ダイニン輸送系の動く様子を直接可視化し、主要な中間体構造を明らかにしたという点で非常に重要な進展であるといえるだろう。

「構造に基づく1分子運動・力学計測によりダイニンの運動機構を明らかにする」

上述のクライオ電子顕微鏡像解析および、結晶構造解析の結果から、ダイニン分子中の「リンカー」と呼ばれる構造ユニット(図1で紫色で示した部分)のスイング運動が、ダイニンの微

小管上の力発生と直進運動に決定的な役割を果たすと推測された。そこで本研究では、この構造情報に基づく作業仮説を検証するため、1分子運動・力学計測を行った(投稿準備中)。具体的には、ダイニンの2本の脚(モータードメイン)のうち片脚のみリンカースイングをブロックしたヘテロ二量体ダイニンの歩行について詳細な計測を行った。その結果、次の重要知見が得られた。

- ダイニンは、無負荷条件下では、2本の脚の片方のみを動かすことができれば、正常に微小管上を直進運動することができる。
- ダイニンは、細胞内で積荷を輸送している条件に近い数ピコニュートンの負荷がかかった状態では、両脚のリンカースイングがあってはじめて、力を発生し微小管上を運動することができる。
- 負荷条件下では、ダイニンの両脚のリンカースイングが協調しておこなうことが、歩行(輸送)機構に重要である。

これらの知見により、「リンカースイング」のダイニン歩行に果たす役割の詳細が初めて明らかになった。また本研究結果は、ダイニン分子が微小管上を直進運動するしくみには、複数種類のモードがあることを示唆している。ダイニンは細胞内で極めて多様な物質輸送を駆動しており、各々の輸送に適した運動モードを選択できる分子機構を内包しているのかもしれない。

3. 今後の展開

本研究の今後の課題は、ダイニン輸送複合体の全体構造をより高空間分解能で明らかにすることである。その構造が原子レベルで明らかになれば、細胞内物質輸送機構の異常によって引き起こされるさまざまな疾病—神経変性疾患、成長異常、がんなど—の発症機構解明につながることを期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

- 研究目的の達成状況:

細胞中心方向への物質輸送機構を解明する上で最も重要な研究課題のひとつである「ダイニン分子が微小管上を直進運動する姿」をクライオ電子顕像二次元単粒子解析で捉えたことは非常に重要な進展である。また、得られた主要中間状態構造と1分子運動・力学解析を組み合わせることで、ダイニンの歩行機構について、具体的なモデルを提唱するに至った点も評価に値する。しかし、ダイニン複合体の輸送機構を完全に理解するためには、三次元かつ高空間分解能の構造解析が必須であり、道半ばの輸送複合体結晶構造解析とあわせて、更なる研究継続が必要である。

- 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況):

本研究期間中に所属研究機関の変更が2回あり、各々で新たな研究室を立ち上げる必要があったため、研究継続の観点からは、多少の停滞期間があったことは否めない。しかし、共同研究体制の構築や研究補助者の配置は適切に行われ、研究実施体制としては十分であった。また、研究補助者雇用や研究機器・消耗品の購入などの研究費執行は適切に行われた。

- 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果：

本研究が主な対象としている「ダイニン」は、私たちが生きていくうえで欠くことのできないタンパク質分子である。上述のように細胞中心方向への輸送のほぼ全てを駆動しており、さまざまな小胞、細胞小器官、RNA そしてタンパク質複合体の移動・配置に重要である。また、ダイニンの運動活性は、紡錘体形成や染色体分離など細胞分裂のキープロセスにも深く関与している。本成果を基盤として研究が進展すれば、これら生命活動に必須なプロセスがどのような仕組みで駆動されているのか、そのメカニズムが原子レベルで明らかになると期待される。

また、ダイニンの機能あるいは部分的な機能不全が様々なヒトの疾病と深く関連することも重要である。例えば、10 種類以上のウイルスが感染過程でダイニン複合体をハイジャックすることが示されている。また、神経変性疾患や不妊・排卵障害の一部はダイニンモーターの機能異常と関連があると考えられている。本研究成果を基盤としてダイニン運動機構理解が進展すれば、これらダイニン関連病の発症機構が明らかになると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

微小管から外れにくく、モーター活性を保持した、キメラ変異体を用いることによりダイニンのモータードメインの結晶構造を解明し、クライオ電顕の2次元単粒子解析で世界に先駆けて全体の構造を明らかにした成果は大きい。ダイマーが2本足歩行するモデルは非常に魅力的であり、光ピンセットを用いて力学的に検証しており、非常に興味深い。

今後、クライオ電顕(3次元)、さらに高分解能の結晶構造解析との組み合わせにより力を発揮する様々な状態の観測を行い、原子レベルでのダイニンの動的構造解析を望みたい。また、アルツハイマー病等の神経変性疾患とダイニン異常の関連を調べる共同研究を神経変性疾患専門家と始めており、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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.
2. 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.

<i>J. Cell Biol.</i> 2015, 208, 211–222, DOI:10.1083/jcb.201407039.
3. 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. <i>Sci. Rep.</i> 2014, 4, 5281, DOI: 10.1038/srep05281
4. Roberts, A., Kon, T., Knight, P.J., Sutoh, K., Burgess, S.A.. Functions and mechanics of dynein motor proteins. <i>Nature Rev. Mol. Cell. Biol.</i> 2013, 14, 713–726, DOI: 10.1038/nrm3667.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Takahide Kon, The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain, 14th International Alpbach Motors、招待講演.
2. Takahide Kon, Structure and function of the dynein motors, International workshop DYNEIN2013、招待講演.
3. 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、招待講演.
4. 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. 総説.
5. 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、実験医学増刊. 2014, 32(10): 221–224. ショートレビュー.