

Title	Structural studies on the stalk region of the dynein motor domain
Author(s)	西河, 洋祐
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/52269">https://doi.org/10.18910/52269</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 西河 洋祐 )

## 論文題名

Structural studies on the stalk region of the dynein motor domain

(ダイニンモータードメインにあるストーク領域の構造研究)

## 論文内容の要旨

## 【研究の背景】

ダイニンはATPの加水分解エネルギーを力学的エネルギーに変換する事で微小管上をマイナス端方向へと移動する分子モーターである。ダイニンはその機能の違いから細胞質ダイニンと軸糸ダイニンの二種類に分けられる。細胞質ダイニンは細胞内小胞や細胞内小器官の輸送、有糸分裂の際の染色体の分離などに働き、動物細胞においてその機能は必須である。一方で軸糸ダイニンは鞭毛・繊毛運動に特化したダイニンであり、その機能不全は原発性線毛機能不全症に代表される繊毛関連疾患の原因となる事が知られている。このようにダイニンは、真核細胞の活動に欠かせない役割を担っているにも関わらず、その巨大な分子サイズから、運動メカニズムには未解明の部分が多く残されている。

これまでに、電子顕微鏡による低分解能構造解析やアミノ酸配列の解析から、モーター活性を担うダイニン重鎖 (>500kDa) にはATP加水分解活性を持つAAA<sup>+</sup>リング、ATPの加水分解から構造変化を起こしレバーアームとして働くと考えられているリンカー、AAA<sup>+</sup>リングから突き出た長いコイルドコイル構造を取るとされているストークの三つの構造領域が存在し、各構造領域がモーターに必要とされる機能を分担していると考えられている(図1)。特にAAA<sup>+</sup>リングから突き出たストーク領域の先端には、微小管結合部位(以降MTBD)が存在しており、ストーク領域はミオシンやキネシンなど他の分子モーターと比較してダイニンに特徴的な構造領域であるといえる。

現在特に細胞質ダイニンにおいては遺伝子組換えダイニンをを用いた実験によりモーターの運動サイクルの詳細が明らかになりつつあるが、それを裏打ちする構造情報は不足している。原子レベルでの議論が可能な高分解能構造は微小管結合部位(MTBD)の結晶構造が分解能2.3Åで2008年、モータードメインMTBD欠失体の構造が分解能2.8Åで2012年に報告されているが、AAA<sup>+</sup>リング-MTBD間の情報伝達を担うコイルドコイルと微小管結合を担うMTBDを両方含むストーク領域の構造は報告されていなかった。本研究ではダイニンストーク領域の構造解析から、ダイニンモータードメインの分子内情報伝達の詳細を解明する事を目的とした。

## 【マウスダイニンストーク領域 mDS277-Hisの構造解析】

本研究ではマウス細胞質ダイニンのストーク領域(277残基)の結晶構造解析を行った。条件検討の結果、PEG3350を沈殿剤とした条件で再現良く結晶を得られ、セレンメチオン置換誘導体を用いて単波長異常分散法(SAD)により分解能3.5Åで構造を決定した(図2)。これまでに明らかになっているダイニンモータードメイン結晶構造との比較から、本研究で明らかになった構造とダイニンモータードメインの構造の間ではコイルドコイル全域にわたってヘリックススライディングが起きている事が判明した。これはAAA<sup>+</sup>リングとMTBDの情報伝達がストークコイルドコイルのスライディングによって引き起こされているという仮説(Gibbons *et al.* 2005)を構造から支持する初めての立体構図情報である。

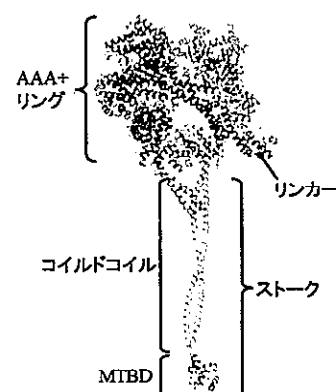


図1 結晶構造(PDB ID: 3VKG & 3WUQ)を基にしたモータードメインの全体像

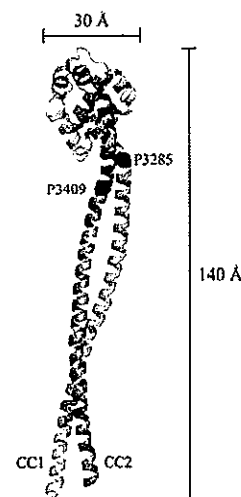


図2 mDS277-Hisの結晶構造

【mDS277-HisのMDシミュレーション】

次にコイルドコイルの大部分を含むmDS277-Hisの構造をスタートモデルとして50 ns のMDシミュレーションを行った。シミュレーションは野生型と保存性残基である二つのプロリン (P3285 & P3409, 図2) をアラニンに置換したホモロジーモデルの二種類で行った。その結果、二つのモデルは全く異なる運動性を見せた。mDS277-Hisはコイルドコイル領域が保存性プロリンを支点として振動しているのに対してアラニン置換モデルではこの性質は失われていた。モデルの主鎖骨格原子の主成分分析の結果から、mDS277-Hisでは運動の第一成分がストークの長軸方向にばねのように伸縮する運動を含んでいるのに対し、アラニン置換モデルではこの成分が消えている事が解った (図3)。

mDS277-His



アラニン置換モデル

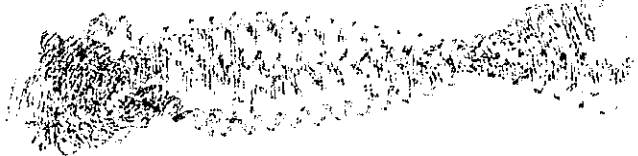


図3 mDS277-His (左) とそのアラニン置換モデル (右) の主成分解析。第一成分を矢印表記している。

【MTBD-AAA<sup>+</sup>リング間の新しい情報伝達モデル】

ストークを形成しているコイルドコイルのスライディングが観察されたこと、またMDシミュレーションからコイルドコイルが長軸方向に伸縮する柔軟性を示していることから、以下のようなMTBD-AAA<sup>+</sup>リング間の情報伝達モデルを作成した。(1) ダイニンが微小管と結合する前には、コイルドコイルの2本の $\alpha$ ヘリックスはばねのように協調して振動している。(2) MTBDが微小管と結合すると2本のヘリックスの協調性が崩れ、振動運動がヘリックススライディングへと変換されて情報が伝達される (図4)。このヘリックススライディングを可能とするストークの柔軟な構造には、MTBD近傍に存在する保存性のプロリン残基が本質的に重要であると結論付けられた。

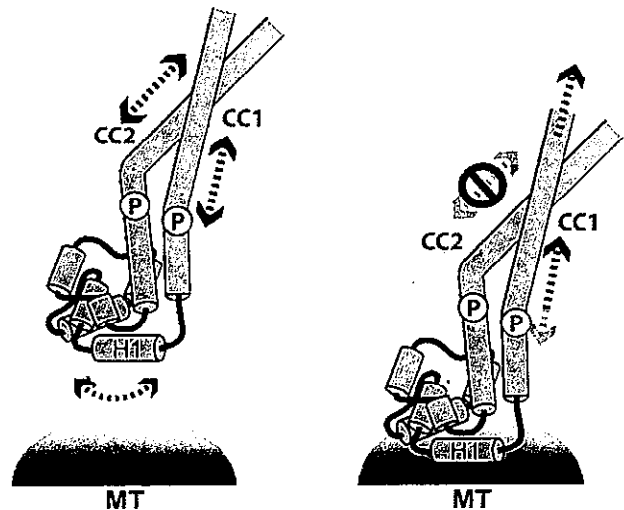


図4 MTBD-AAA<sup>+</sup>リング間の情報伝達モデルの模式図。待機状態ではCC1とCC2は協調して伸縮している (左)。微小管と結合すると伸縮の左右対称性が破れヘリックススライディングへと変換される (右)。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 西 河 洋 祐 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 栗栖 源嗣
	副 査 教授 中川 敦史
	副 査 教授 今田 勝巳
論文審査の結果の要旨	
<p>学位申請者は、巨大な生物分子モーターであるダイニンに着目し「Structural studies on the stalk region of the dynein motor domain (ダイニンモータードメインにあるストーク領域の構造研究)」と題する研究を行った。</p> <p>微小管上をヌクレオチド依存的に運動するダイニンは、微小管結合領域と ATPase 部位とがストークと呼ばれる領域によって物理的に隔てられたユニークな構造をとる。本論文では、ストーク領域を介した分子内情報伝達の構造基盤解明を目的としている。まず、構造研究に用いる組換え体蛋白質を大量に調製するため、大腸菌と昆虫細胞を用いて発現系を構築し、複数種の高純度組換え体蛋白質を精製することに成功している。得られた組換え体蛋白質のうち、マウス細胞質ダイニンがもつストーク領域の結晶化に成功し、高輝度放射光を利用することで、3.5Å 分解能でストーク領域全体の構造を明らかにしている。さらに、微小管への親和性が高い状態と低い状態との二状態を、還元剤の添加によって切り替え可能な改変体を作成し、二状態で CD スペクトルを測定している。二次構造解析の結果、ストーク領域全体に広がる特徴的な <math>\alpha</math> ヘリックス構造が概ね (89%) 保たれたまま二状態間を遷移している事が初めて示されている。これら構造解析実験に加えて、分子動力学計算による構造シミュレーションを実施し、ダイニンの脚に相当するストーク領域のダイナミクス解析と、その生理的意義づけを行っている。</p> <p>申請者は、以前に行われたダイニンモータードメイン全体の構造解析で分子モデルを構築できていなかったストーク領域に着目し、複数の構造解析手法を併用する事で、最終的に細胞骨格への結合とヌクレオチド加水分解の二つの要素反応を結びつける新しい情報伝達モデルを提唱するに至っている。本論文の研究内容は、ダイニン分子モーターの運動機構を理解する上で、大変意義のある成果である。</p> <p>よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>	