



Title	Structural study on the microtubule-binding domain of axonemal dynein
Author(s)	戸田, 暁之
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/76393">https://doi.org/10.18910/76393</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏名 ( 戸田 暁之 )

## 論文題名

Structural study on the microtubule-binding domain of axonemal dynein  
(軸系ダイニンの微小管結合部位における構造研究)

## 論文内容の要旨

ダイニンは、微小管上をマイナス端方向へ運動する生体内分子モーターであり、重鎖、中間鎖、中間軽鎖、軽鎖と呼ばれる複数のポリペプチド鎖から構成される超分子複合体として機能している。そのなかで、モーター活性を担うのが重鎖であり、その他は重鎖のオリゴマー化やモーター活性の調整、その他の蛋白質との相互作用の制御などの役割を持つ。ダイニンは、その機能から細胞質ダイニンと軸系ダイニンに分けられる。細胞質ダイニンは細胞内の物質輸送に関与し、軸系ダイニンは鞭毛・繊毛の波打ち運動の駆動力として働く。ダイニン重鎖の構造は、力発生に関与するリンカー、ATP加水分解を行うAAA+リング、AAA+リングから突き出たStalk領域、そしてその先端にある微小管結合部位 (MTBD) から構成される。細胞質ダイニンと比較して、軸系ダイニンは多様性が高いにもかかわらず構造研究が乏しいことから、分子機構について不明な点が多く残されている。本研究では、軸系ダイニンに特徴的な軽鎖 (LC1) と外腕ダイニン $\gamma$ 重鎖 (OAD $\gamma$ )、そして内腕ダイニンDNAH10重鎖 (IAD  $\alpha$ ) に着目した。

通常、中間鎖や軽鎖は、積荷の結合またはATP加水分解活性の制御因子として働き、重鎖のAAA+リングを含むN末端領域に結合する。しかし、最近になってクラミドモナス由来の軸系ダイニン軽鎖 1 (LC1) が、軸系ダイニン外腕 $\gamma$ 重鎖 (OAD $\gamma$ ) のMTBDに結合することが明らかにされた。MTBDはダイニンのモータードメインの中で唯一、微小管と相互作用する部位であり、このLC1の結合がOAD $\gamma$ 重鎖に他のダイニンにはない機能的特性を与えることが示唆されるが、その分子機構は未解明であった。

本研究では、このLC1によるOAD $\gamma$ の制御機構をX線結晶構造解析を中心に解明することを目的のひとつとした。まず初めに、NMR構造が既知であったLC1の構造をより高分解能での議論のために、LC1単体で結晶化しX線構造を1.55Å分解能で決定した。その構造は、アミノ酸配列情報とNMR構造から示されていたようにロイシンリッチリピート構造を示した。しかし、X線構造とNMR構造にはN末端、C末端の領域に大きな構造の違いが見られ、その構造の違いから二次構造レベルで変化するヒンジ領域を同定した。さらに、X線構造の異方性温度因子の方向性とX線・NMR構造間の構造の違いから、X線とNMR構造の違いがLC1の持つ内因性の柔軟さによって引き起こされることを見出した。

次に、LC1とOAD $\gamma$ の直接の相互作用を見るために、LC1とOAD $\gamma$ のMTBDとの複合体 (LC1-MTBD) の構造を1.7Å分解能で決定した。その構造では、MTBDはH6ヘリックスと軸系ダイニンに特有の挿入配列であるFlap領域とでLC1と結合していることが明らかになった。また、LC1変異体を用いたプルダウン実験により、LC1-MTBD間の相互作用にArg79が重要であること、H6ヘリックスが主に結合に寄与していることを明らかにした。今回得られたLC1-MTBD複合体の構造を既知の微小管-MTBD構造に重ね合わせることで、微小管に結合したLC1-MTBD複合体の予想複合体構造も得た。その構造では、LC1が直接微小管上の軌道と結合しておらず、LC1が微小管のC末端テイル領域に結合する可能性が示唆された。また、その予想複合体構造では、FlapがLC1の結合から解放されると、MTBDが結合している微小管上の隣のプロトフィラメントに結合する可能性も示唆された。

最後にヒトの内腕ダイニンDNAH10重鎖 (IAD  $\alpha$ ) のMTBD領域の構造解析も行い、H6ヘリックスが持つ内在性の構造柔軟性がIAD  $\alpha$ に特徴的な運動特性を引き出している可能性にも言及した。

以上の研究結果と先行研究で得られていた知見をまとめることで、軸系ダイニンに特有の微小管上のステップングについて新たなモデルを提唱した。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 戸 田 暁 之 )			
	(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	原 田 慶 恵
	副 査	教 授	昆 隆 英
	副 査	准教授	田 中 秀 明
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>学位申請者は、鞭毛・繊毛ではたらく分子モーターである軸系ダイニンに着目し「Structural study on the microtubule-binding domain of axonemal dynein (軸系ダイニンの微小管結合部位における構造研究)」と題する研究を行った。</p> <p>ダイニンは、微小管上をマイナス端方向へ運動する生体内分子モーターであり、重鎖、中間鎖、中間軽鎖、軽鎖と呼ばれる複数のポリペプチド鎖から構成される超分子複合体として機能している。ダイニンは、その機能から細胞質ダイニンと軸系ダイニンに分けられるが、申請者は、鞭毛・繊毛の波打ち運動を駆動する軸系ダイニンに着目した。軸系ダイニンは多様性が高いにもかかわらず構造研究が乏しいことから、分子機構について不明な点が多く残されていた。本論文で申請者は、まず初めに NMR 構造が既知であった緑藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>) 由来の軸系ダイニン軽鎖 (LC1) をより高分解能で議論するため、LC1 単体の結晶構造を 1.55Å 分解能で決定した。次に、LC1 と軸系ダイニン外腕 <math>\gamma</math> 重鎖 (OAD<math>\gamma</math>) の直接の相互作用を見るために、LC1 と OAD<math>\gamma</math> の微小管結合ドメイン (MTBD) との複合体 (LC1-MTBD) の構造を 1.7Å 分解能で明らかにしている。また、LC1-MTBD の立体構造を基に LC1 に部位特異的変位を導入してプルダウン実験を行い、LC1-MTBD 間の相互作用に Arg79 が重要であること、H5 ヘリックスが主に結合に寄与していること等を明らかにした。さらに、今回得られた LC1-MTBD 複合体の構造を既知の微小管-MTBD 構造に重ね合わせることで、微小管に結合した LC1-MTBD 複合体の予想複合体構造にも言及している。予想複合体構造では、LC1 が直接微小管上の軌道と結合しておらず、微小管の C 末端テイル領域に結合する可能性が示された。最後に申請者は、ヒトの内腕ダイニン DNAH10 重鎖 (IAD f<math>\alpha</math>) の MTBD 領域の構造解析も行い、H6 ヘリックスが持つ内在的な構造柔軟性が IAD f<math>\alpha</math> に特徴的な運動特性を引き出している可能性について考察している。</p> <p>申請者は、軸系ダイニンの構造中で微小管と直接相互作用する MTBD に着目し、OAD<math>\gamma</math> 重鎖や IADf<math>\alpha</math> 重鎖がもつ特徴的な MTBD の構造特性を明らかにした。特に OAD<math>\gamma</math> 重鎖の MTBD については、LC1 軽鎖との相互作用を高分解能 X 線構造から明らかにし、OAD<math>\gamma</math> 重鎖に特徴的な挿入配列が LC1 軽鎖を介してモーター活性を調整する分子機構について考察を行い、最終的に軸系ダイニンに特有な微小管上のステッピングについて新たなモデルを提唱するに至っている。本論文の研究内容は、軸系ダイニンの運動制御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>			