

細胞内の巨大な分子モーター「ダイニン」の構造解析

大山拓次

山梨大学生命環境学部 〒400-8510 山梨県甲府市武田 4-4-37

栗栖源嗣

大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

昆 隆英

大阪大学理学研究科 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

要旨

ダイニンは AAA⁺ ファミリーに属する巨大なモータータンパク質であり、繊毛運動、細胞分裂、細胞遊走、細胞内物質輸送といった細胞イベントにて重要な役割を果たす。我々は質量380 kDa におよぶ細胞性粘菌由来細胞質ダイニンモータードメインの完全な結晶構造を原子レベルで決定した。この構造から AAA⁺ リングに結合したヌクレオチドの結合様式、新規に見出されたリングとリンカーの相互作用、さらにはリングとストークとの間の連結構造など、ダイニンの構造機能相関を理解するために重要な事実が明らかとなった。

1. はじめに

私たちの体を構成する個々の細胞の中では、高度に組織化され制御された膨大な種類の生物学的プロセスが進行し、その総和として生命活動が成り立っている。これら生物学的プロセスの中核をなすのは、数千種類に及ぶタンパク質複合体であり、各々に固有の立体構造が反応の特異性を決定するとともに、反応の高度な制御を可能にしている。そのため、生命活動を物理学・化学のプロセスと捉え、その詳細を完全に理解するためには、タンパク質分子の立体構造を高空間分解能で解明することが必須である。X線結晶構造解析法は、この目的を達成できる最も強力な手法の一つであり、現在までにおおよそ10万種類に及ぶ生体高分子の立体構造解析に用いられてきた。その結果、多種多様な生命活動の原子レベルでの理解に多大に貢献してきたことは広く知られているとおりである。

しかし、生物学的に極めて重要であるにも関わらず、関与するタンパク質複合体の詳細な立体構造が明らかにされていないため、謎に包まれている生物学的プロセスはいまだに相当数残されているのが現状である。X線結晶学では、一般に対象とする分子が巨大で複雑であればあるほど、柔軟であればあるほど構造解析の難易度は飛躍的に高くなる。巨大タンパク質あるいは超分子複合体では、構造解析に至るすべてのステップ—遺伝子組換えタンパク質の大量発現・精製系、結晶化条件と結晶化後処理条件、重原子誘導体の調製法、そして放射光施設での回折データ収集法—が最高レベルで最適化されて初めて構造解析が達成されることが多い。本稿では、その一例として、SPRING-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (BL44XU) を

主に利用することで2.8 Åでの構造解析に成功した巨大モータータンパク質ダイニン (Dynein) の研究過程を紹介する¹⁾。

2. 細胞中心方向への輸送エンジン「ダイニン」とは

私たちの体を構成する37兆個に及ぶ個々の細胞の中では、細胞骨格系分子モーターと呼ばれる三種類のタンパク質ファミリー—ミオシン、キネシン、そしてダイニン—が、ATP加水分解で放出される化学エネルギーを力学的仕事へと変換することで、生命活動の基盤となる多種多様な生体運動を駆動している。なかでもダイニンは、細胞内に張り巡らされた微小管レール上をそのマイナス端方向（一般的には細胞中心方向）へ直進運動することで、極めて多様な細胞内機能を担っている^{2,3)}。その第一の機能は細胞内物質輸送であり、様々なタンパク質・RNA複合体、膜小胞、核やミトコンドリアなどの細胞小器官、そしてウイルスの輸送と配置に必須の役割を果たす。また、細胞小器官の形成や維持管理にも重要で、繊毛・鞭毛、エンドソーム、ゴルジ体などはダイニンの機能なくして正常には機能しない。さらに、ダイニンの機能は、核膜崩壊・紡錘体形成・染色体分離などの細胞分裂の重要過程や成長円錐形成・神経細胞移動など神経ネットワーク形成過程にも重要であることが示されている。これらダイニンの細胞内機能は、私たちが生きていくうえで必須なもので、その機能が部分的にでも失われると脳神経系疾病や発生異常などにつながる考えられている。

このように多様な細胞内機能の共通のエンジンとして機

能するダイニンであるが、どのようなしくみで運動活性を發揮しているのかという根本的な問題については、分子が発見されてから半世紀以上が経つにもかかわらず、多くの未解決課題が残されている。ダイニンのメカニズム研究を困難にしてきた主要因のひとつは、その高分解能構造情報が十分ではないことにある。ダイニンは、質量1,000 kDaを超える分子としての巨大さと、多数のサブユニットからなり複数のATP加水分解部位を有するといった分子としての複雑さゆえに高分解能構造解析が困難であり、私たちの構造的知見は、最近まで主に低分解能電子顕微鏡解析に依存している状況にあった。このような状況を乗り越え、ダイニン運動メカニズムの分子レベルでの理解を進めるために、筆者らは2004年ごろからダイニン分子のX線結晶構造解析に取り組んできた。

3. ダイニンの試料調製

ダイニンの構造研究を開始した段階での、最大の問題点は、遺伝子組換え体の大量発現系が確立されていないことであった。タンパク質超分子複合体のX線結晶構造解析では、構造解析に適したタンパク質試料のデザイン、高純度精製、重原子誘導体調製などの重要過程のハードルを、組換え体大量発現系なしに乗り越えることは難しい。そこで、筆者らはこの点から検討を開始し、細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) を発現ホストとして、細胞性粘菌由来ダイニンをテトラサイクリン誘導発現制御系を用いて一過的に大量発現させる系を確立することで、高純度の組換えダイニンを結晶化条件検討に必要な量得ることに成功した^{4,5)}。得られた精製組換えダイニンは、生体組織から単離された天然のダイニンと同程度のモーター活性やATP加水分解活性を發揮することが明らかになり、1965年にGibbonsとRoweによりダイニンが発見されて以来⁶⁾、約40年を経てようやく組換えダイニンをを用いた構造研究が可能な状況となった。

次の課題は、ダイニンの最小モーター領域を決定することであった。ダイニン分子は、コア複合体と呼ばれる中核領域だけでも12個のサブユニットからなる1,500 kDaにも及ぶ巨大な超分子複合体であり (Fig. 1)、サブユニット構成が非均一であることなどから、天然の状態での結晶化は極めて困難であることが予想された。そこで筆者らは、上記組換え体発現系を利用して、ダイニンの本質的なモーター活性を保持している最小領域を検討した。その結果、ダイニン複合体中の最大のサブユニットである「重鎖」のC末端側約2/3の領域のみで、微小管モーターとして十分に機能することを見出した^{5,7)}。このダイニンモータードメイン (以下、「ダイニンMD」と略す) は、ダイニン複合体の他のサブユニットへの結合領域を全て欠損しているため、単一ポリペプチド鎖単量体として存在し、精密ゲルろ過分析や動的散乱分析などの結果から、均一で単分

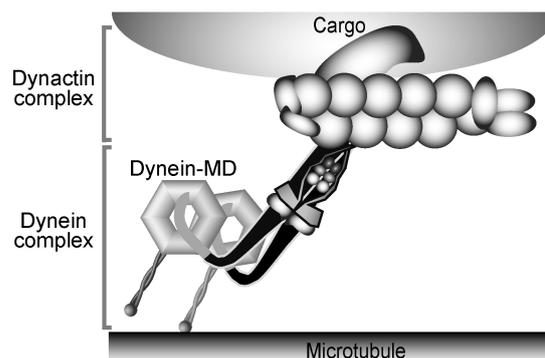


Fig. 1 Cartoon representation of the dynein motor complex.

散性の高い、良質な試料であることが示唆された。

しかし、この最小モータードメインであっても、結晶構造解析達成に至る過程には相当な困難を伴うことが予想された。ダイニンMDは、約3,300アミノ酸残基長という、それまで構造解析されたことがないほどの長大なポリペプチド鎖である。また、ATP加水分解過程で構造を大きく変化させる柔軟性を持つことや、いびつな分子形状を示すなど、難結晶性タンパク質複合体に良く見られる特徴を示すことが電子顕微鏡構造解析から示唆されていた⁸⁾。また、ダイニンMDを凍結保存できないことも大きな問題であった。さまざまな凍結条件を検討したが、ダイニンを安定して凍結保存する条件を確立することができなかったため、ダイニンタンパク質の精製を繰り返し行い、安定性が保証される3日以内に結晶化実験に供することとなった。2.8 Åでの構造解析を達成するまでの約6年間、延べ数にして精製を200回以上繰り返すことが必要だった。

4. 結晶化と結晶改良

筆者らは、約30,000条件を探索することで、わずか1種類ではあるが、幸運なことにダイニンMDの単結晶を安定して得られる条件を確立することができた。しかし、得られた結晶のX線回折能は最高でも10 Å程度と十分ではなく、構造解析を達成するには大幅な結晶性改良が必要な状況であった。

タンパク質結晶構造解析では、このような場合、別の新規結晶化条件を探索する、あるいは別の生物種由来の同等タンパク質 (オルソログ) の結晶化を試みるなど、より良質な新規結晶を探索するアプローチが一般的である。しかし、ダイニンMDの場合、これらのアプローチは現実的ではなかったため、ダイニンMDのさまざまな変異体の結晶に対して、多様な結晶化後処理を施すことで、結晶改良を試みることにした。具体的には、機能解析に用いた数十種類のダイニン変異体各々について、まず順次結晶化検討を行い、次に約30種類の抗凍結化・脱水化剤による結晶化後処理を様々な組み合わせで施した後に、その効果を

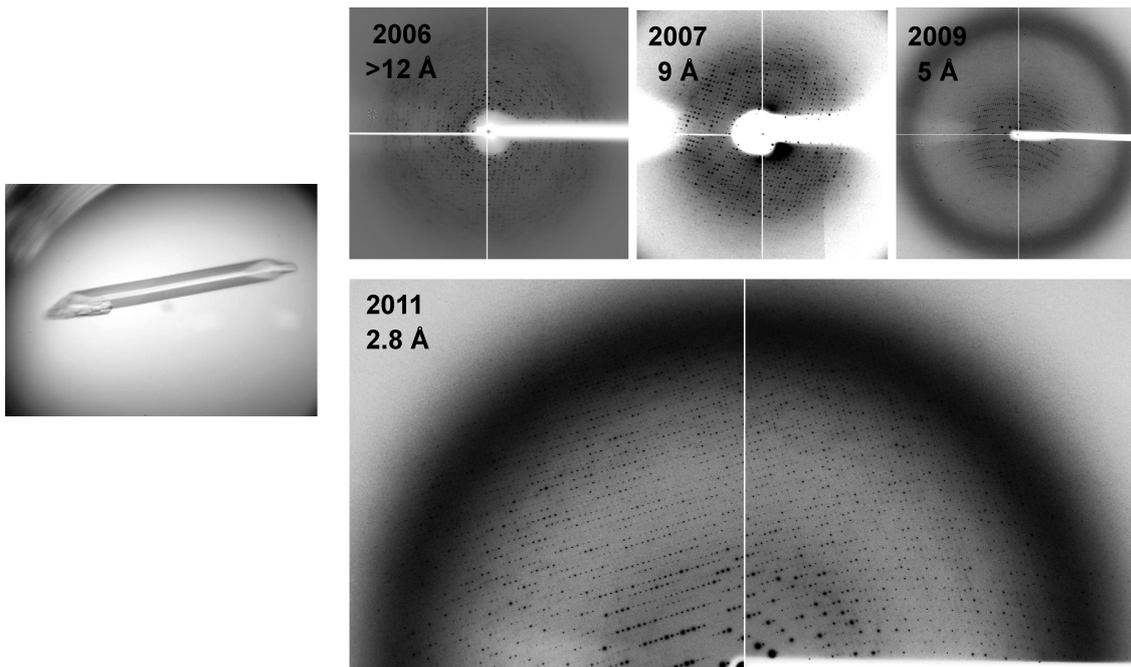


Fig. 2 A crystal of the dynein motor domain and improvement of diffraction quality.

SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (BL44XU) で評価することで、変異体選別と結晶化後処理条件の最適化を行った。最終的に見出された最良の条件は、ダイニン MD の微小管結合部位欠失変異体 (Fig. 1 および Fig. 4 参照) の結晶に対して、まず平均分子量 8,000 のポリエチレングリコール (PEG8000) を 8% まで約 1% 刻みで添加していき、次に PEG400 を 30% まで 5% 刻みで添加し、最後に -180°C の窒素ガス流で急速凍結させるというものであった。この「脱水処理」によって、結晶の回折能は 2.8 \AA にまで劇的に改善されることになった (Fig. 2)。ここで特筆すべきは、この劇的な脱水効果は極めて限定された条件下のみで起こるということである。回折能向上のためには、PEG8000 の終濃度を 8% の代わりに 6% あるいは 10% に変更する、あるいは PEG400 の濃度上昇を 5% ではなく 1% 刻みに変更するなどの、わずかな条件変更でさえも許容されなかったのである。ダイニンのような巨大な超分子複合体の構造解析の過程では、ここに示すような膨大な種類の条件検討を地道に行うことが必要な場合が多く、強力な X 線による迅速かつ精密な評価が可能な放射光施設なくして、本研究を進めることは不可能であったと思われる。

5. X 線回折データ収集から中分解能構造解析

上記ダイニン MD と脱水処理を組み合わせることで、良好な回折能を示す単結晶が得られるようになったが、その回折データ収集についても最適化が必要であった。特に

問題となったのは、極低温条件下にも関わらず、ダイニン MD 結晶は容易に放射線損傷を受けることだった。この結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属しており、最低でも全振動範囲 90° の回折データの収集が必要となる。しかし、回折データの統計値から判断して十分な反射強度を得られる測定条件では 1 箇所につき、振動範囲わずか 10° 程度のイメージしか集められなかった。また、脱水処理に起因する結晶格子の非均一性も大きな問題で、特に c 軸については結晶ごとに約 10 \AA ものばらつきが見られた。これらの問題は、単一の良質な結晶に対して X 線照射位置を変えながら一気に全データを取得するヘリカルスキャン法⁹⁾で解決することができた。なお、X 線が高強度、高輝度化するにつれ、結晶が受ける深刻なダメージの問題はより広く知られるようになり、現在の放射光ビームラインでは、ヘリカルスキャンモードが標準で備わっている。

この段階で、重原子誘導体を用いた初期位相決定の検討も開始した。巨大超分子複合体の初期位相決定には、極めて強い異常分散効果が得られるタンタルクラスター ($\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$) やタングステンクラスター ($\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) の導入が有効とされ、リボソームや RNA ポリメラーゼの構造決定に大きな役割を果たしてきた^{10,11)}。ダイニン MD 結晶では、脱水化処理を施した後の結晶に対する $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$ 処理が特に有効で、単波長異常分散法 (SAD 法) を適用することで、主要な α -ヘリックスを明確に区別できる程度の電子密度を得ることができた。さらに、 $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ クラスターを導入した誘導体結晶も用いて多重同型置換法 (MIRAS 法) を適用したが、金属クラスター誘導体を用いた構造解析では、クラスター分子の位置は容易に決めら

れるが、精度の良い位相決定に必要なクラスター中の各金属原子の位置決定は難しいため、位相決定への寄与は限定的だった。そのため、ダイニン MD では金属クラスターのみを用いた構造解析は4.5 Å 分解能が限界であり、原子モデルは α -ヘリックスのみからなるポリアラニンモデルの構築に留まり、各アミノ酸残基の位置を特定できなかった¹²⁾。

6. 高分解能構造解析

上述のように、ダイニン MD 結晶の回折能は2.8 Å 分解能に達していたため、より高分解能の構造解析を成功させるための最大の課題は、精密な位相情報をいかにして得るかにあった。そこで、筆者らは、成功例が多数報告されているセレノメチオニン (SeMet) 置換体結晶を用いた位相決定を試みることにした。SeMet 置換体タンパク質の調製方法は、大腸菌発現系やいくつかの真核細胞発現系では確立されている。しかし、本研究でダイニン発現系として用いている細胞性粘菌では、報告例が皆無であったため、新規に発現系開発を行った。細胞性粘菌では、SeMet の細胞毒性が非常に高いことが判明したため、メチオニン代謝系を遺伝子工学的に改変するなど様々な方法でこの問題の回避を試みた。しかし、最終的に良好に機能したのはより原始的な方法—細胞性粘菌を十分に生育させた後にダイニンの発現を誘導し、同時に高濃度 SeMet を投入する—というものであった。この方法によって、細胞性粘菌は16時間以内に死滅するが、位相改善に有用な SeMet 置換体ダイニンを安定して得ることができた。

金属クラスター誘導体と SeMet 置換体の回折データは、互いに長所が短所を補完しあう。SeMet 誘導体中の個々の Se 原子シグナルは弱く、巨大タンパク質の構造解析では初期位相の計算には適さないが、逆に信頼できる初期位相があれば正確な Se の位置を決定することが可能となり、高分解能域のデータに正しい位相を与える。さらに Se はメチオニン残基の位置を示すため、主鎖トレースにおいて重要な鍵となる。ダイニン MD 結晶は非対称単位中の2分子で計138個のメチオニン残基を含むが、そのうち121個の Se の位置を、タンタルクラスター誘導体から得られた初期位相を用いて計算した異常分散差フーリエマップから決定することが出来た (Fig. 3a)。闇夜の森から幼いヘンゼルとグレーテルを家まで導いた月光に光る小石のように、電子密度マップ上に散りばめられた Se のシグナルは主鎖トレースにおける宝の地図となる。次にダイニン MD の Native, Ta₆Br₁₂ 誘導体および SeMet 置換体の3データセットを用いた MIRAS 法による位相計算を行った。計算の結果得られた実験電子密度マップは、予想を遥かに超えた高いクオリティを示した。例えば、4.5 Å 分解能解析ではマップが不明瞭でモデルを構築できなかった β -シートの構造も、高分解能マップ中でははっきり確認

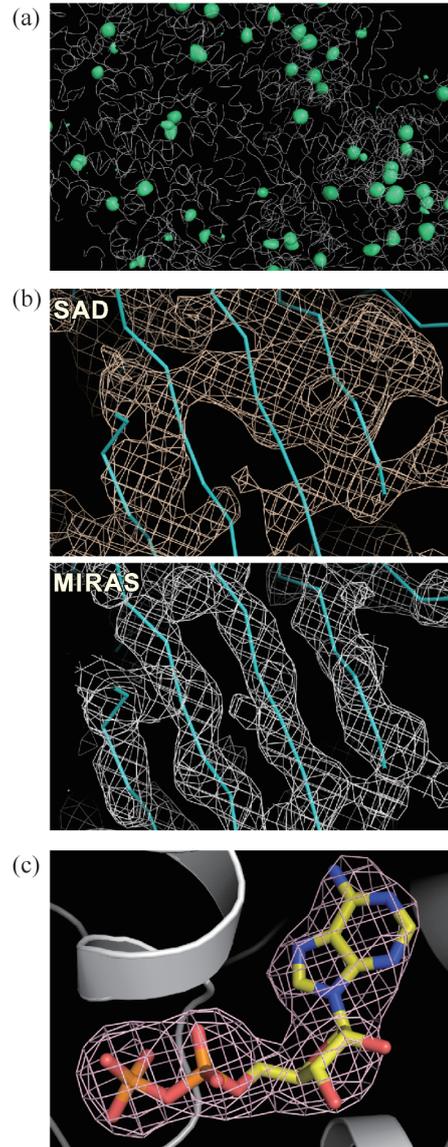


Fig. 3 (Color online) Electron density maps of the dynein motor domain. (a) An anomalous difference Fourier map (contoured at 3σ) of the SeMet derivative calculated using the Ta₆Br₁₄ SAD phases. (b) The MIRAS phases including the SeMet derivative gave an improved experimental electron density map (lower panel) as compared to the SAD phases (upper panel). The improvement was the most prominent for the β -sheet structures. (c) The final omit F_0-F_c electron density map for the bound ADP molecule (3σ).

することができたのである (Fig. 3b)。

高精度の電子密度マップを得られれば、配列を基にアミノ酸残基の位置と側鎖構造を決めることができる。そのプロセスは通常のタンパク質結晶構造解析と同じであるが、ダイニン MD は約3,300アミノ酸残基からなる桁違いに巨大なポリペプチド鎖であり、しかも、結晶の非対称単位中に2分子存在していることが、解析を複雑なものにしていた。近年の洗練されたプログラムを駆使すれば、タンパク質分子中のほぼ全てアミノ酸残基モデルを自動構築でき

る場合もあるが、それはさらに高い分解能での解析に限られる。ダイニン MD では、中分解能から劇的に改善されたとはいえ2.8 Å 分解能であり、全てのアミノ酸残基を手動で構築する必要があった。

何も無いところから3,300アミノ酸残基を構築するとなれば、モデル構築は非常に長い道のりとなるが、幸いモデル構築の材料が幾つも揃っていた。まず、中分解能解析で得たポリアラニンモデルがあり、サブドメインの配置とトポロジーは概ね把握できていた。また、分子中心に位置する ATP 加水分解領域は既知構造と相同性があり、アミノ酸配置が予想できる箇所もあったため、この領域からモデル構築を始めた。特にアミノ酸配列と構造の関連の高い部分を足掛かりとすることで、わずか1週間ほどで約700個のアミノ酸残基を構築もしくはアミノ酸残基の種類を帰属することができた。この700残基を含め、1分子中の2,050残基のモデルを構築した時点で実験マップに基づくモデル構築は収束した。電子密度を精査すると、結晶非対称単位中の2分子(A分子とB分子)の構造は本質的には同じであることが判明したため、A分子の構造をB分子にコピーして新たな電子密度改良計算を行った。この計算では主に CCP4 の溶媒平滑化、ヒストグラムマッチング、2分子間の電子密度平均化といったオプションを用いた。マップは有意に改良され、ATP 加水分解領域以外のダイニン固有の構造領域のモデル構築が進み始めた。1分子当たりの構築/帰属アミノ酸数が2,100/850個に到達した段階で、MIRAS 位相(実験位相)と部分モデルから得られる計算位相の組み合わせ(phase combination)と呼ばれるオプションも追加した。この計算でも有意に電子密度が改良され、モデル構築がさらに進展した。

1分子当たりの構築/帰属アミノ酸残基数が約2,400/1,100個に到達した段階で、結晶学的精密化計算を開始した。精密化計算が順調に進めば電子密度が劇的に改善され、モデル構築は加速度的に進む。一方、初期モデルの質が低いと計算はうまくいかず、実験マップに戻り、モデルの改善を余儀なくされる。つまり、初期の精密化計算が成功するかどうかは解析終了までに要する時間を大きく左右する。幸い、最初の計算後の $R/\text{free } R$ 因子は0.373/0.425と良好であった。また、精密化計算で得られる新たなマップは実験マップよりも格段に精度が良くなり、モデル構築も加速された。ダイニン分子に結合している ATP/ADP 分子については、構造解析の初期段階から確認できていたが、精密化計算が進むにつれて電子密度マップ中でそのコンフォメーションが特定できるほど鮮明なものとなった(Fig. 3c)。解析終盤では、100アミノ酸残基に及ぶ長いコイルドコイル領域のアミノ酸残基も帰属が可能となった。このようなプロセスを経て1分子当たりの構築アミノ酸残基数が約2,900(ダイニン MD の89%)に達し、全てのアミノ酸残基の種類を帰属し、 $R/\text{free } R$ 因子が0.265/0.322で収束した段階で変異体ダイニン MD の精密化計算

Table 1 X-ray diffraction data collection and refinement.

Data collection				
	Resolution (Å)	Observed/unique Reflections	Completeness (%)	R_{merge} (%)
Dynein MD	3.8	518853/88530	99.4(92.3) ^a	7.8(39.7)
Mutant dynein	2.8	1150120/209488	98.3(81.9)	9.2(77.9)
Ta ₆ Br ₁₄	3.5	1670277/110724	100.0(100.0)	15.8(67.1)
PW ₁₂ O ₄₀	3.5	784176/111160	100.0(100.0)	14.2(86.2)
SeMet	3.5	673900/111290	100.0(99.9)	8.7(27.5)
MIRAS phasing				
Derivative	R_{iso}	Number of sites	Phasing power (centric/acentric)	Figure of merit (centric/acentric)
Ta ₆ Br ₁₄	16.2	4	1.07/0.96	
PW ₁₂ O ₄₀	28.0	2	0.51/0.39	
SeMet	14.2	121	0.19/0.24	0.18/0.26
Structure refinement				
	Resolution (Å)	Total atoms (solvent atoms)	$R/\text{free } R^b$	Rmsd (bond/angle)
Dynein MD	3.8	46130(0)	22.1/29.4	0.003/0.72
Mutant dynein	2.8	45241(45)	26.3/32.1	0.010/1.42

^aa Values in parentheses indicate statistics for the highest resolution shells.

^bb Free R factor was calculated using 5% of data.

は完了とした(Table 1)。モデル構築開始から約4か月後のことであった。

一方、野生型ダイニン MD についても上述の変異体ダイニン MD と並行して実験を継続し、分解能は3.8 Å まで改善され、変異体ダイニン MD をサーチモデルとした分子置換法により初期構造を決定した。その後、ドメイン単位の rigid body refinement に続き、二次構造をベースとした小セグメント単位での電子密度マップへのフィッティングを行った。精密化計算では、二次構造が崩れにくいオプション(プログラム CNS の DEN: Deformable Elastic Network)を用いた。変異体ダイニン MD で欠失させた微小管結合部位は、ホモロジーモデルを作成してマップにフィットした。最終構造は、1分子当たり約2,900個(ダイニン MD の約86%)のアミノ酸残基を含んでいた。野生型および変異体ダイニン MD の構造には大きな違いは無く、微小管結合部位を除く大部分について、高分解能の変異体ダイニン MD にもとづき運動メカニズムを議論可能である。なお、筆者らは、微小管結合部位およびそれに繋がるコイルドコイルを含む領域については、別途結晶構造を決定し、分子動力学シミュレーションと併せて微小管との相互作用について詳しく議論している¹³⁾。

7. 結晶構造から見えてきたこと

ダイニンは、AAA⁺ (ATPases associated with diverse cellular activities) と呼ばれる ATP 加水分解酵素ファミリーのメンバーである¹⁴⁾。このファミリーに含まれるタンパク質は、リング状に配置される 6-7 個の ATP 加水分解ドメインを持つことを共通の構造的特徴としているが、その名のおと、個々ファミリーメンバーの細胞内機能は多岐に渡る。機能的共通性を挙げるとすれば、ATP の加水分解を利用してターゲットとするタンパク質・DNA の構造をほどく、あるいは歪めるといった機械的仕事を担うことである¹⁵⁾。

今回明らかになったダイニン MD の結晶構造は、AAA⁺ ファミリーとしての構造的特徴を如実に示すものだった¹⁾ (Fig. 4a)。ダイニン MD の中心となる ATP 加水分解ユニット「リング」は、AAA⁺ タンパク質に特徴的な ATP 加水分解モジュールを 6 個 (AAA1-AAA6) 含み、これらがおもて面から見て時計回りに配置されることで、直径 130 Å、厚さ 65 Å、中心孔径 35 Å の大きなリング構造が形作られている。このリング構造には、ダイニン特有の構造機能ユニットが 2 個付随している。ひとつは、微小管結合ユニットとして機能する「ストーク」で、リングから飛び出した長さ 100 Å に及ぶ長大なコイルドコイル構造から成っている。ダイニンの微小管結合部位は、ストーク先端の小さな球状領域である。もうひとつは、力発生ユ

ニットとして機能する「リンカー」で、19本の α -ヘリックスと 8本の β -ストランドからなるロッド状の構造体として、リングのおもて面を跨ぐように横たわっている。リンカーは、リング上をスイング運動することで、ダイニンの力発生と微小管上の変位運動を生み出すと考えられている^{16,17)}。

ダイニン MD の結晶構造からもたらされた重要知見としては、まず、ATP 加水分解を担うリングとエネルギー源である ATP/ADP 分子との結合様式が原子レベルで明らかになったことが挙げられる (Fig. 4b)。ダイニン MD には 4 個の ATP/ADP 結合部位が存在することが直接示され、構造に基づく速度論的機能解析により、そのうち 1 個がダイニンモーターを直接駆動すること、また、残り 3 個がダイニンのモーター活性の制御を担うことが明らかになった。さらに、ATP 加水分解を力学的運動に変換する上で鍵となる、リングとリンカーやストークをつなぐ構造が明らかになったことも重要である。

特に興味深いのは、ダイニンが AAA⁺ タンパク質に共通の「リモデリング機構」をモーター活性発揮に利用していることを示唆するリング・リンカー間の相互作用様式である (Fig. 4c)。本結晶構造では、リングとリンカーの相互作用は極めて限定的で、リングから飛び出した二つのループ構造が主要な相互作用部位であり、リンカーの最も細い部分を挟み込むように結合している。これら特徴的なループ構造は、一部の AAA⁺ タンパク質に共通して見ら

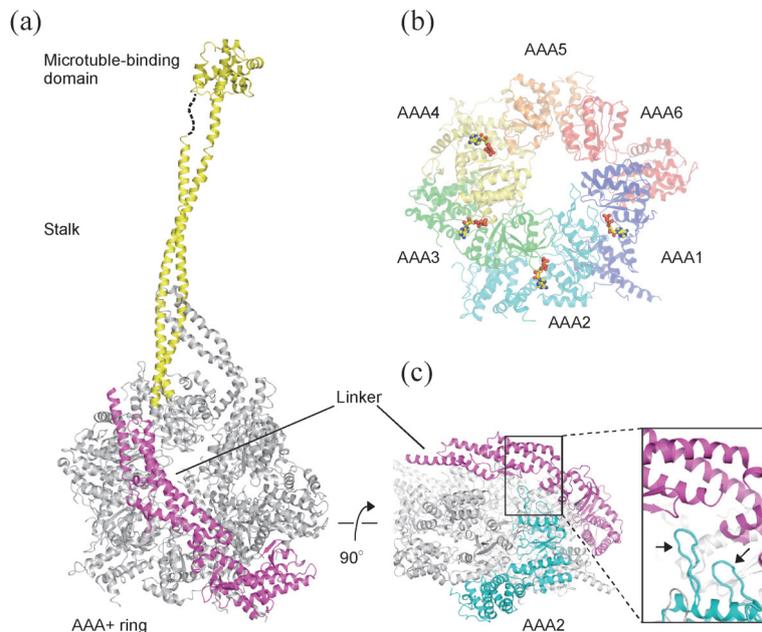


Fig. 4 (Color online) The atomic structure of the dynein motor domain. (a) Overall structure is shown as a ribbon representation. The stalk and linker are highlighted with different colors. A dashed line indicates the disordered portion connecting the stalk and the microtubule binding domain. (b) The nucleotide binding to the AAA⁺ ATPase ring. The four bound nucleotide molecules are shown as thick stick models with the six AAA⁺ modules colored separately. (c) Side view showing the ring-linker interaction. The close-up view of the contact region is also shown. The two linker-interacting loops are highlighted by arrows.

れるもので、各々のターゲット分子に直接相互作用し構造変化を引き起こすリモデリングインターフェースとして働くことが知られている¹⁸⁾。ダイニンは、この共通のインターフェースを利用してモーター活性を発揮しているのかもしれない。ATP加水分解過程で、二つのループ構造がリンカーをキャッチしその構造を変化させる、すなわちリンカー構造をほどいて曲げることでリンカーのスイング運動を引き起こすのではないだろうか。実際、極低温電子顕微鏡像単粒子解析の結果¹⁹⁾や、ループ構造の変異体解析の結果¹⁾もこの「リンカーリモデリング仮説」を支持している。

8. 今後の展開

本稿では、2012年に達成した細胞性粘菌のダイニンMDの2.8 Å分解能の構造解析の過程を詳述したが、その後、ダイニン中核領域の高分解能構造解析は急速な進展を見せている。筆者らの報告の直後には3.3 Å分解能の出芽酵母のダイニンMD結晶構造²⁰⁾、そして2015年には3.4 Å分解能のヒトダイニン-2 MDの結晶構造²¹⁾と、アミノ酸残基レベルの信頼性を有するダイニンの原子構造が相次いで報告されている。現在では、これら3種類の結晶構造を比較することで、ダイニンの力発生機構の概略を議論することが可能となっている。

しかし、ダイニンをエンジンとする細胞内物質輸送システムの全貌を理解するために、今後明らかにしなくてはならない構造生物学的課題は極めて多い。まず、中核をなすダイニンMDの力発生機構の完全解明のためには、さらに多くの反応中間状態の原子構造が必要である。また、今回原子構造が明らかになったダイニンMDは、ダイニン輸送複合体の一部をなすにしか過ぎないため、ダイニン複合体の全体構造、レールである微小管との結合構造、運動活性調節タンパク質との結合構造、さらに多様な積荷を積

んだ構造など、輸送システムを構成するより高次な複合体構造を高分解能で構造解析していくことも必要である。筆者らは、大型放射光施設を利用したX線結晶学と近年革命的進展を遂げている極低温電子顕微鏡法を組み合わせたアプローチにより、これらの課題を一步一步解明していきたいと考えている。

謝辞

本研究は、SPring-8 BL44XUおよび、高エネルギー加速器研究機構PF-17Aビームラインの関係者の方々ならびに、大阪大学蛋白質研究所の諸先生方をはじめとする多くの研究者の方々の支援があって初めて達成されたものである。紙面をお借りして御礼申し上げる。

参考文献

- 1) T. Kon *et al.*: Nature, **484**, 345 (2012).
- 2) N. Hirokawa *et al.*: Neuron, **68**, 610 (2010).
- 3) A. J. Roberts *et al.*: Nat Rev Mol Cell Biol, **14**, 713 (2013).
- 4) T. Kon *et al.*: Biochemistry, **43**, 11266 (2004).
- 5) M. Nishiura *et al.*: J Biol Chem, **279**, 22799 (2004).
- 6) I. R. Gibbons and A. J. Rowe: Science, **149**, 424 (1965).
- 7) N. Numata *et al.*: FEBS Lett, **585**, 1185 (2011).
- 8) A. J. Roberts *et al.*: Cell, **136**, 485 (2009).
- 9) O. B. Zeldin *et al.*: J Synchrotron Radiat, **20**, 49 (2013).
- 10) N. Ban *et al.*: Nature, **400**, 841 (1999).
- 11) J. Fu *et al.*: Cell, **98**, 799 (1999).
- 12) T. Kon *et al.*: Nat Struct Mol Biol, **18**, 638 (2011).
- 13) Y. Nishikawa *et al.*: J Mol Biol, **426**, 3232 (2014).
- 14) A. F. Neuwald *et al.*: Genome Res, **9**, 27 (1999).
- 15) T. Ogura and A. J. Wilkinson: Genes Cells, **6**, 575 (2001).
- 16) S. A. Burgess *et al.*: Nature, **421**, 715 (2003).
- 17) T. Kon *et al.*: Nat Struct Mol Biol, **12**, 513 (2005).
- 18) J. P. Erzberger and J. M. Berger: Annu Rev Biophys Biomol Struct, **35**, 93 (2006).
- 19) A. J. Roberts *et al.*: Structure, **20**, 1670 (2012).
- 20) H. Schmidt *et al.*: Nat Struct Mol Biol, **19**, 492 (2012).
- 21) H. Schmidt *et al.*: Nature, **518**, 435 (2015).

著者紹介

**大山拓次**

山梨大学生命環境学部 准教授
E-mail: takujio@yamanashi.ac.jp
専門：構造生物学

【略歴】

1999年3月 大阪府立大学大学院農学研究科博士後期課程修了。1999年4月 生物分子工学研究所ポストドクトラルフェロー。2001年4月 同研究所研究員。2005年4月 同研究所主任研究員。2005年10月 大阪大学蛋白質研究所寄附研究部門助教。2008年10月 同研究所特任研究員。2012年4月 山梨大学生命環境学部助教。2015年4月より現職。

**昆 隆英**

大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 教授
E-mail: takahide.kon@bio.sci.osaka-u.ac.jp
専門：生物物理学・タンパク質科学

【略歴】

2000年3月 東京大学大学院総合文化研究科博士課程修了。2000年4月 同研究科助手。2007年4月 同研究科助教。2010年11月 大阪大学蛋白質研究所准教授。2012年10月 JST さきがけ研究者兼任。2013年法政大学生命科学部教授。2015年4月より現職。

**栗栖源嗣**

大阪大学 蛋白質研究所 教授
E-mail: gkurisu@protein.osaka-u.ac.jp
専門：構造生物化学, 蛋白質結晶学

【略歴】

1997年3月 大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。1997年4月 大阪大学蛋白質研究所助手。この間、2002年4月から2003年10月まで米国 Purdue 大学で在外研究。2004年4月 東京大学大学院総合文化研究科助教授（2007年4月より名称変更により准教授）。2009年4月より現職。

Structural analysis of “dynein”, a huge molecular motor working in the cells

Takuji OYAMA Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi
4-4-37 Taketa, Kofu, Yamanashi 400-8510

Genji KURISU Institute for Protein Research, Osaka University
3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

Takahide KON Graduate School of Science, Osaka University
1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043

Abstract Dynein is a huge molecular, microtubule-based motor complex belonging to the AAA⁺ superfamily, and powers important cellular events such as ciliary beating, cell division, cell migration and intracellular transport. We have determined the complete structure of the 380-kDa motor domain from *Dictyostelium discoideum* cytoplasmic dynein at atomic level. The structure provides a number of important aspects to understand the structure-function relationship, which includes the coordination of the bound nucleotides in the four nucleotide-binding sites in the ring-shaped AAA⁺ ATPase unit, a newly identified interaction interface between the ring and mechanical linker, and junction structures between the ring and microtubule-binding stalk.