

領域融合レビュー, 5, e001 (2016)  
DOI: 10.7875/leading.author.5.e001  
2016年1月18日 公開

## 細胞質ダイニンのモータードメインの結晶構造

### Crystal structure of the cytoplasmic dynein motor domain

栗栖源嗣<sup>1</sup>・昆 隆英<sup>2</sup>

Genji Kurisu & Takahide Kon

<sup>1</sup>大阪大学蛋白質研究所 蛋白質構造生物学研究部門

<sup>2</sup>大阪大学大学院理学研究科 生物科学専攻分子細胞運動学研究室

#### 要約

ダイニンは ATP に依存して微小管のうえを滑り運動するモータータンパク質であり、鞭毛運動および繊毛運動を駆動する軸系ダイニンと、細胞内輸送や染色体の分離を担う細胞質ダイニンとに分類される。生体において複数のサブユニットから構成される生体超分子複合体として機能しており、モーター活性は重鎖にあるが、その重鎖だけでも 500 kDa をこえる巨大なタンパク質である。その巨大さと特徴的な構造から、ダイニンの構造生物学的な研究は天然に大量に存在する軸系ダイニンを使った電子顕微鏡による解析が先行した。細胞質ダイニンのモータードメインの組換え体を調製する系が確立されてから研究は劇的に進展し、2011 年から、たてつづけに X 線結晶構造が決定された。ここでは、筆者らにより決定された細胞性粘菌に由来する細胞質ダイニンのモータードメインの結晶構造を中心に、出芽酵母およびヒトに由来する細胞質ダイニンのモータードメインの結晶構造を参照しながら、細胞質ダイニンの運動機構について解説する。

#### はじめに

ダイニンは ATP に依存して微小管のうえを滑り運動するモータータンパク質であり<sup>1)</sup>、鞭毛運動および繊毛運動を駆動する軸系ダイニンと<sup>2,4)</sup>、細胞内輸送や染色体の分離を担う細胞質ダイニン<sup>5,6)</sup>とに分類される。ダイニンは重鎖、中間鎖、中軽鎖、軽鎖など複数のサブユニットから構成される生体超分子複合体であり、その大きさは 1000 kDa をこえる。生物学的にきわめて重要なタンパク質であるにもかかわらず巨大であるがゆえ、同じモータータンパク質であるキネシンやミオシンに比べ運動機構につい

での解明は遅れていた。しかしながら、細胞質ダイニンのモータードメインの組換え体を調製する系が確立されてから研究はいちじるしく進展した。このレビューにおいては、この細胞質ダイニンを中心として、最近の X 線結晶構造解析について解説する。

ダイニンの運動活性は AAA<sup>+</sup>ファミリーに属する重鎖が担う<sup>7)</sup>。この AAA<sup>+</sup>ファミリーには、タンパク質の分解、タンパク質複合体の解離、複製、DNA の組換えなど、非常に多岐にわたる細胞機能を担うタンパク質が含まれる<sup>8)</sup>。これら AAA<sup>+</sup>タンパク質は AAA<sup>+</sup>モジュールとよばれる共通の構造ユニットをもち、通常はリング状に会合した多量体として機能する<sup>9)</sup>。ダイニンの重鎖も 6 個の AAA<sup>+</sup>モジュールからなるリング構造をとるが<sup>10,11)</sup>、ほかの AAA<sup>+</sup>タンパク質とは異なり、6 個の AAA<sup>+</sup>モジュールがつながって 1 本のポリペプチド鎖を形成している<sup>7)</sup>。

アミノ酸配列の解析および電子顕微鏡による低分解能の構造解析により、ダイニンの重鎖にはストークおよびリンカーとよばれる 2 つの特徴的な機能ユニットの存在することがわかってきた(図 1)。ストークは AAA<sup>+</sup>リングから突き出たコイルドコイル構造で、その先端部に位置する小さな球状の構造が微小管結合部位である<sup>12,13)</sup>。一方、リンカーは力の発生を担う機能ユニットである。リンカーのさきにはテイルとよばれる二量体化ドメインがあり、中間鎖や軽鎖などとの結合にかかわる<sup>10,11,14)</sup>(図 1a)。リンカーが力の発生を担うためには、力の発生する前後に構造が変化する必要がある。また、AAA<sup>+</sup>リングから大きくはなれた位置にある微小管結合部位が AAA<sup>+</sup>リングにおける ATP の加水分解と同調して微小管に対する親和性を変化させる必要がある(図 1b)。しかし最近まで、高分解能での構造情報がなかったため、ダイニンの運動に必須であるこれらのしくみについて、その構造基盤は謎にまつまれた

ままであった。

2011年, 細胞質ダイニンのモータードメインの結晶構造が中程度の分解能で報告され, 2次構造のレベルでその分子構造が記述された<sup>15,16)</sup>. しかし, 分解能が十分でないことから, ほかのモータータンパク質と比べ構造機能相関の解明は不十分な状態にあった. 2012年, 力を発生したのち(ポスト・パワーstrook状態)の高分解能のX線結晶構造が報告された<sup>17,18)</sup>. 筆者らにより, 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* に由来する細胞質ダイニンのADP結合状態の結晶構造が2.8Å分解能で, また, 出芽酵母に由来する細胞質ダイニンのヌクレオチドを含まないアポ状態の結晶にADPあるいはATPアナログを浸透させた構造が3.3Å分解能で決定されたのである. 2015年に3.4Å分解能で決定された, 力を発生するまえ(プレ・パワーstrook状態)の, ヒトのダイニン-2のADPおよびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合させた状態の結晶構造とあわせ<sup>19)</sup>, このレビューでは, 細胞質ダイニンの運動活性および力の発生の構造基盤について解説する.

### 1. 細胞質ダイニンのモータードメインの全体構造

筆者らは, 細胞性粘菌に由来する細胞質ダイニンの380 kDaの野生型のモータードメインと, 微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインを用いた(図2a). 野生型モータードメインは微小管のない条件では基底状態のATPase活性を示すが, 微小管の添加によりATPaseが活性化される. 一方, 微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインは微小管と結合しないが, ATPase活性は野生型モータードメインが発揮する最大の活性を示し, 活性化の状態に固定されている<sup>20)</sup>. 野生型モータードメインの結晶構造は, 微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインの構造モデルを用いた分子置換法により決定した. 構造の精密化は3.8Å分解能で行い, 結晶学的にも十分な精度で構造が決定された(PDB ID:3VKH, 図2b). 微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインの構造決定には, TaおよびW, さらにセレノメチオニンに置換した重原子誘導体の結晶による同型置換法を適用した. その結果, N末端側の22残基, 構造をとらないループ構造, 欠失させた微小管結合部位のほか, 約90%に相当する分子モデルを構築することができた. 得られた分子モデ

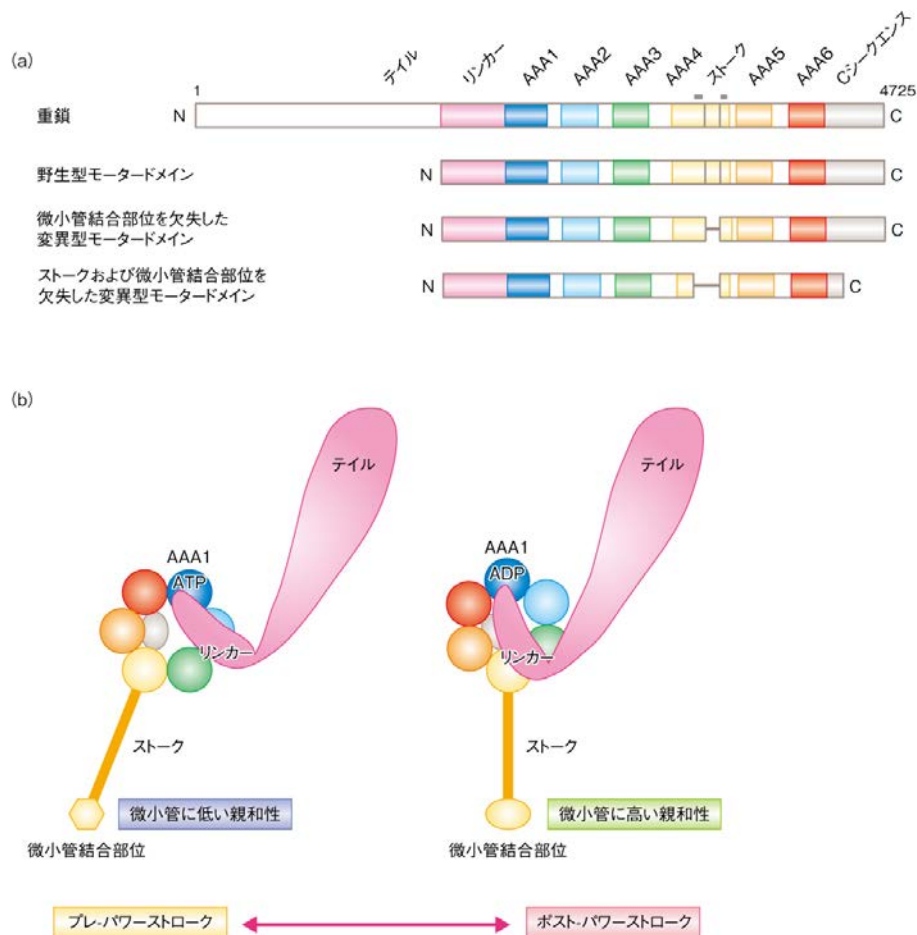


図1 細胞質ダイニンのドメインの構造および初期の運動モデル

(a) 細胞質ダイニンのドメインの構造.

(b) 電子顕微鏡による解析にもとづく初期の運動モデル.

ルは 2.8Å分解能で構造の精密化を行い, 十分な信頼度因子をもって構造が決定された (PDB ID: 3VKG, 図 2c).

筆者らに先行した構造決定においては, 出芽酵母に由来する細胞質ダイニンのモータードメインにつきストークおよび微小管結合部位を欠失した変異体が用いられた (図 2a). 最初に, ヌクレオチドを含まないアポ型の結晶構造が 6.0Å分解能で報告された (PDB ID: 3QMZ, 図 2d). その初期構造は, ホモロジーモデルにより推測されたループ構造, および, 実験的に決定された 2 次構造から構築さ

れた<sup>15)</sup>.

また, 昆虫細胞で発現させた組換え体としてヒトのダイニン-2 のモータードメインの構造が決定された. ADP およびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合させることによりプレパワーストロック状態へと固定されている. 構造の決定には, 筆者らが決定した微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインの構造をサーチモデルとした分子置換法が用いられている. 構造の精密化は 3.4Å分解能で行い, 十分な信頼度因子で構造が決定されている<sup>19)</sup>

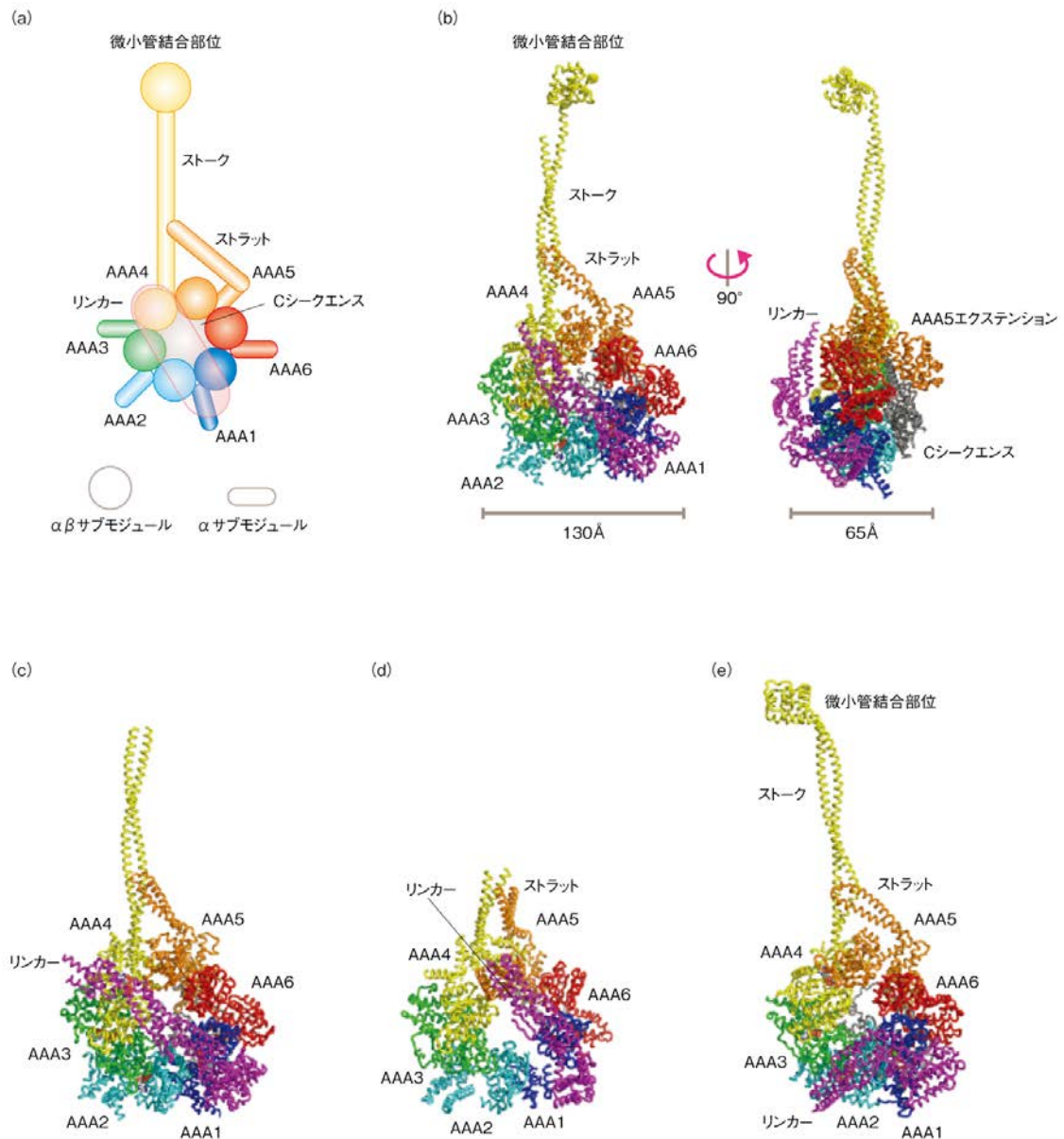


図 2 細胞質ダイニンのモータードメインの全体構造

- (a) 模式図.
- (b) 細胞性粘菌に由来する細胞質ダイニンの野生型モータードメイン.
- (c) 細胞性粘菌に由来する細胞質ダイニンの微小管結合部位を欠失した変異型モータードメイン.
- (d) 出芽酵母に由来する細胞質ダイニンのストークおよび微小管結合部位を欠失した変異型モータードメイン. ヌクレオチドを含まないアポ型.
- (e) ヒトのダイニン-2 のモータードメイン. ADP およびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合した状態.

(PDB ID : 4RH7, 図 2e).

出芽酵母に由来するストークおよび微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインの結晶と、細胞性粘菌に由来する野生型モータードメインおよび微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインの結晶は、結晶学的な非対称単位中に 2 分子のモータードメインを含んでいた<sup>17</sup>. 機能の詳細に関係する細部の構造は個々に異なっていたものの、既報の構造はすべて全体としてはほぼ同じ構造をとっていた. したがって、以下では、非対称単位中の 2 分子のモータードメインのうち、もっともモデルの構築率が高く分解能のよい A 分子について構造を解説する.

モータードメインは、中心の AAA+リング構造と、リンカー、ストークおよびストラット、C シークエンスの 3 つの構造ユニットから構成されていた (図 2). ATPase 活性のある中心の AAA+リングは 6 つの AAA+モジュール AAA1~AAA6 をもち、おのおののモジュールが順番にリング状に並んだ配列になっていた. AAA+リングの直径は 130 Å, 厚さは 65 Å, 中心には直径 35 Å の孔のある構造をしていた. おのおのの AAA+モジュールの N 末端側にはロスマンフォールドをとる  $\alpha/\beta$  サブモジュールがあり, C 末端側には  $\alpha$  サブモジュールが位置していた (図 2a, 図 3). この 2 つのサブモジュールはそれぞれリング構造の表面および裏面を構成していた. AAA1 から AAA4 のおのおのの AAA+モジュールはそれぞれユニークな挿入配列をもち、その挿入位置から、H2 ヘリックスに挿入されている H2 ヘリックス挿入配列, Walker B 配列のまえに挿入されているプレ Walker B 挿入配列, Sensor 1 配列のまえに挿入されているプレ Sensor 1 挿入配列と名づけられた.

さらに, AAA5 モジュールには 8 本の  $\alpha$  ヘリックスからなる大きな球状のドメインがあり, AAA5 エクステンションと名づけられた (図 2b).

N 末端側から順に AAA+リング以外の構造をみていく. 1 つ目は, AAA+リングの上部を AAA4 から AAA1 にむけて延びるリンカーである. リンカーは 19 本の  $\alpha$  ヘリックスと 8 本の  $\beta$  ストランドからなるロッド状の構造をしており, サブドメイン 0~サブドメイン 4 の 5 つに分割された (図 4a, b). 2 つ目は, AAA4 から延びた長いストークと AAA5 から延びた短いストラットからなるコイルドコイル構造をとる領域である (図 2b, c, e). ストラットの存在は中程度の分解能の X 線結晶構造によりはじめて明らかにされた<sup>15,16</sup>. 野生型モータードメイン A 分子の構造モデルにおいてはストークのさき微小管結合部位が確認されたが, 野生型モータードメイン B 分子において微小管結合部位は確認されなかった<sup>17</sup>. B 分子において微小管結合部位に相当する電子密度が同定されなかったのは, おそらく, 微小管結合部位の運動性が高いためであろう. AAA+リングの裏側には 6 本の  $\alpha$  ヘリックスと不完全な  $\beta$  バレル構造により構成される C シークエンスとよばれる構造が存在した. C シークエンスの外形は非常に平坦で, AAA1, AAA5, AAA6 の  $\alpha$  サブモジュールを裏打ちするように広がっていた (図 2b, 図 4c, d). ちなみに, 出芽酵母に由来する細胞質ダイニンはもともと不完全な  $\beta$  バレル構造に相当する配列を欠失しており, C シークエンスの構造は大きく異なっていた<sup>15</sup>.

以前に報告された中程度の分解能の X 線結晶構造と比べ, 全体構造は 2 次構造のレベルではよく一致していた.

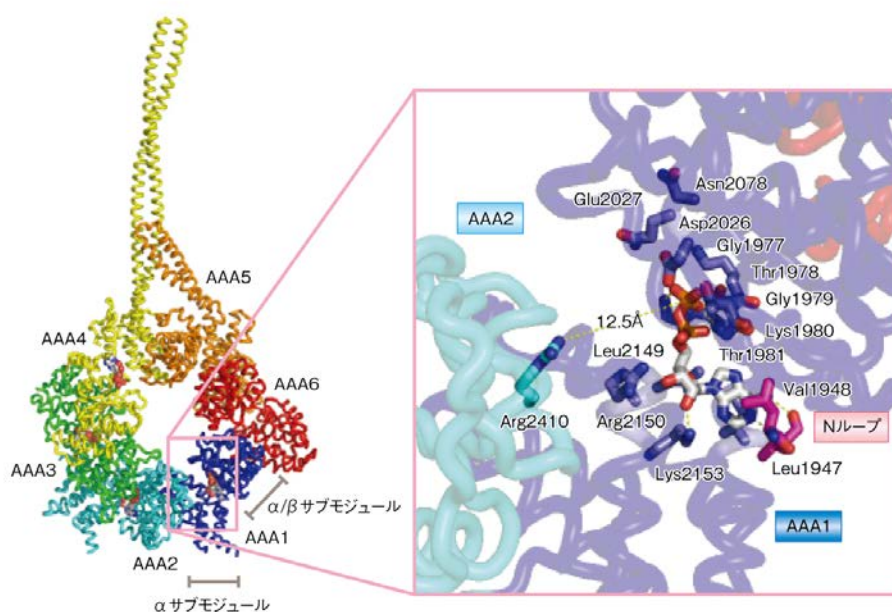


図 3 AAA1 モジュールにおける ADP の結合部位

微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインに結合した ADP をスティックモデルで表示するとともに, AAA1 に結合した ADP の近傍を拡大して示した. ADP と相互作用する残基もスティックモデルで表示した.

しかしながら、最近になりあいついで報告された原子レベルでの立体構造はダイニンの構造機能相関を議論するのに十分な解像度および精度をもち、ヌクレオチドとの結合やヌクレオチドの状態に依存した構造の変化がアミノ酸残基のレベルで議論された<sup>17-19)</sup>。

## 2. ヌクレオチド結合部位

細胞性粘菌に由来する細胞質ダイニンのモータードメインには、AAA1~AAA4のおおののAAA+モジュールに4つのADP分子が結合していた<sup>17)</sup>。ヌクレオチド結合部位は、おおののAAA+モジュールの $\alpha/\beta$ サブモジュールと $\alpha$ サブモジュール、および、となりのAAA+モジュールに位置する $\alpha/\beta$ サブモジュールから構成されていた(図2a, 図3)。この相対的な配置はほかのAAA+型ATPaseと共通であった。運動活性を担うAAA1のATPase部位に結合したADPは、そのリン酸部分がAAA1

の $\alpha/\beta$ サブモジュールにあるWalker-A配列(Gly1977~Thr1981)により認識され、リボース部分はAAA1の $\alpha$ サブモジュールに位置するSensor-II配列(Arg2150)とその周辺の残基(Leu2149, Lys2153)により認識されていた(図3)。アデニン塩基部分はAAA1の $\alpha$ サブモジュールに位置する疎水性残基と、リンカーとAAA1のATPase部位とをつなぐNループ(Leu1947, Val1948)により認識されていた(図3)。

細胞質ダイニンはATP, GTP, CTP, TTPのすべてのヌクレオチドを加水分解することができるが、モーター活性にはATPが必須であることを考えると、Nループによるアデニン塩基部位の認識は、リンカーのはたらきとものならかのつながりを連想させた。AAA1モジュールの $\alpha/\beta$ サブモジュールにあるWalker-B配列(Asp2026, Glu2027)とSensor-I配列(Asn2078)は、一般にATPの加水分解に寄与するとされる。これらの配列もAAA1

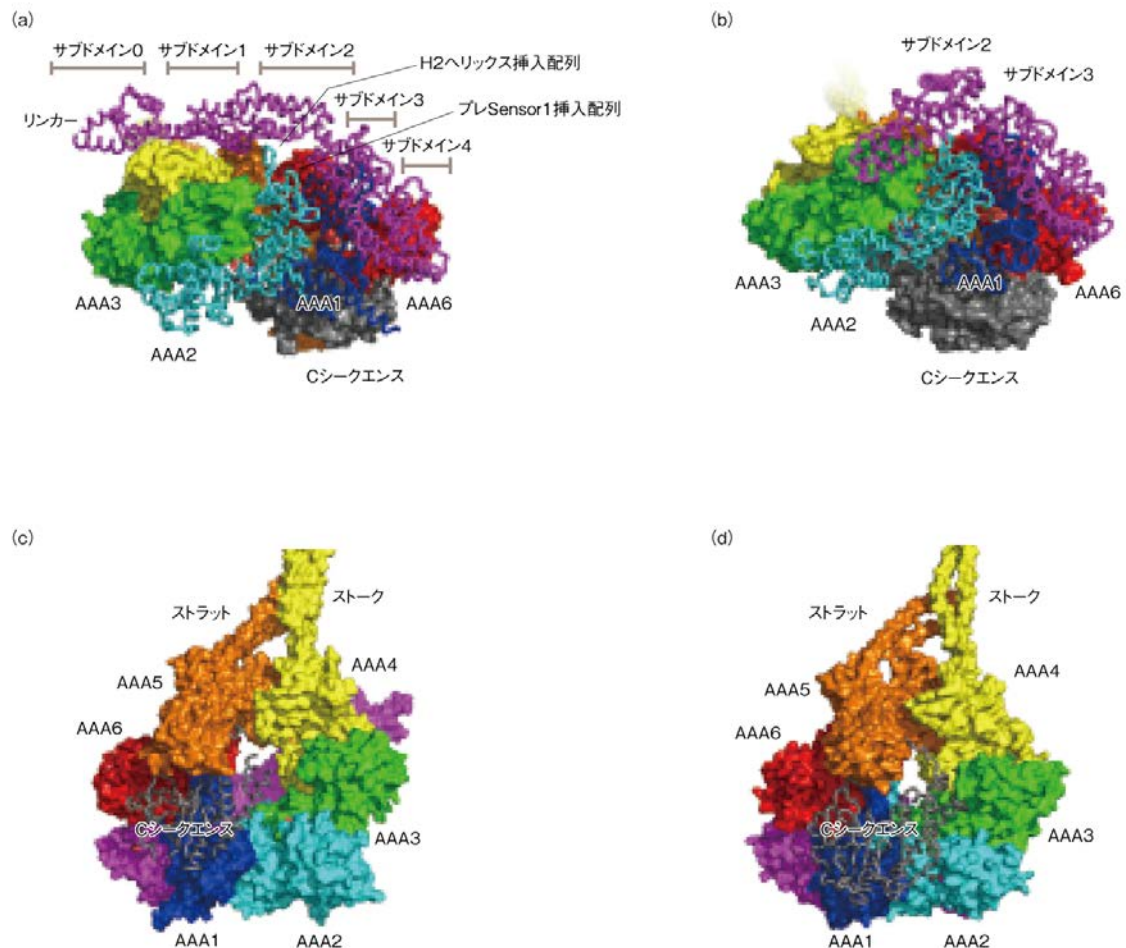


図4 リンカーとCシークエンスの周辺の構造

(a) 微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインのADP結合型の延びたリンカーの構造を横から見た図。

(b) ヒトのダイニン-2のモータードメインのADPおよびリン酸のアナログとしてパナジン酸と結合した状態の折れ曲がったリンカーの構造を横から見た図。

(c) 微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインのADP結合型のAAA+リングを裏側から見た図。

(d) ヒトのダイニン-2のモータードメインのADPおよびリン酸のアナログとしてパナジン酸と結合した状態のAAA+リングを裏側から見た図。

の ATPase 部位に位置していた。さらに、ATP の加水分解に必須のアルギニンフィンガー配列 (Arg2410) がとなりの AAA2 にある  $\alpha/\beta$  サブモジュールから延びており、距離は遠いものの ADP の結合している方向に配置していた (図 3)。

AAA2~AAA4 のヌクレオチド結合部位は AAA1 とほぼ同様の構造の骨格をしていたが、AAA2 のヌクレオチド結合部位だけがいろいろな意味で少し異なった状況にあった。Sensor-II 配列を欠失していたこと、Walker-B 配列のうち ATP の加水分解に必須の Glu が Gly2357 と置換していたこと、AAA3 から延びるアルギニンフィンガー配列 (Arg2806, Arg2809) が加水分解産物である ADP とすでに強固な結合を形成していたこと、である。これらの AAA2 に特徴的なヌクレオチドとの結合の様式から、AAA2 は ADP あるいは ATP と結合することはできないものの加水分解することはできないことが示唆された。AAA1, AAA3, AAA4 は ATP の結合および加水分解に必要なアミノ酸残基の側鎖が典型的な位置に配置されており、細胞質ダイニンは 3 つの ATPase 部位をもつことが強く示唆された。実際、これらの構造的な知見は変異体の機能解析の結果とも一致し、細胞質ダイニンのモータードメインは AAA1, AAA3, AAA4 の 3 カ所の ATPase 部位をもつことが明らかにされた。

### 3. AAA<sup>+</sup>リング構造の開閉

微小管結合部位を欠失した変異型モータードメイン A 分子の AAA<sup>+</sup>リング構造は非常に特徴的な配置をとっていた (図 5)。 $\alpha$  サブモジュールはほぼ均等に疑似 6 回対称にて配置していたが、 $\alpha/\beta$  サブモジュールは非対称に配置されており、AAA5-AAA6-AAA1 から構成される半円構造と AAA2-AAA3-AAA4 から構成される半円構造とに区別された。2 つの半円構造どうしには直接の相互作用はなく、AAA<sup>+</sup>リングに溝を構成していた。 $\alpha/\beta$  サブモジュールの非対称な配置は、出芽酵母に由来する細胞質ダイニンの中程度の分解能での結晶構造において指摘された AAA1-AAA2 と AAA5-AAA6 とのあいだにのみ形成された溝とは異なる相対配置であるといえた<sup>15)</sup>。

AAA1 と AAA2 のあいだおよび AAA4 と AAA5 のあいだの 2 つの溝には AAA1 および AAA4 のヌクレオチド結合部位が位置していた<sup>17)</sup>。それぞれ、AAA2 (Arg2410) から、および、AAA5 (Arg3780) からのアルギニンフィンガー配列が少しはなれた ADP 分子のほうに配向しており、ATP の加水分解の際には近傍へ移動すると考えられた (図 3)。AAA1 と AAA4 とで ATP が加水分解される場合、ATP 加水分解サイクルにともない 2 つの溝が閉じ、結果として、アルギニンフィンガー配列は ATP の  $\gamma$ -リン酸と結合できるのだろう。実際に、野生型モータードメイン A 分子の AAA<sup>+</sup>リング構造は比較的閉じた構造をとっており、アルギニンフィンガー配列と ADP との距離を縮め

ていた。野生型モータードメインと微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインは同じヌクレオチド状態にて構造決定されているが、検出された構造の差違から、ほかの AAA<sup>+</sup>型 ATPase においてみられるような ATPase に依存的な AAA<sup>+</sup>リングの開閉の存在が示唆された。また、ヒトのダイニン-2 の ADP およびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合させた構造においては、AAA1 と AAA2 とのあいだの溝は閉じた構造となっていた<sup>19)</sup>。

### 4. リンカーと AAA<sup>+</sup>リングとの相互作用

電子顕微鏡による低分解能での解析や<sup>10,11)</sup>、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 法によるリンカーの運動性の解析から<sup>14)</sup>、リンカーのスイング運動が力の発生を担うことが考えられていた。細胞質ダイニンの運動の分子機構を理解するうえで、ATP の加水分解の起こる AAA<sup>+</sup>リングとスイング運動をするリンカーとの相互作用を構造的に可視化することはきわめて重要である。ADP 結合状態の構造においては、電子顕微鏡により解析された構造において確認されていたポスト-パワーストローク状態の位置にリンカーが位置していると思われた<sup>10,11)</sup>。AAA<sup>+</sup>リングを表面からみた場合、リンカーは AAA1 から延びて AAA2 および AAA3 の内側上部をまたぎ AAA4 に到達していた<sup>17)</sup> (図 2 b, c)。しかし、リンカーと AAA<sup>+</sup>リングとの相互作用は非常に限定的で、AAA1-AAA6 および AAA2 の 2 カ所に集約された (図 4a)。AAA1-AAA6 との相互作用はリンカーの基部が AAA1 の  $\alpha/\beta$  サブモジュールにつながる部分に位置しており、リンカーのサブドメイン 3 およびサブドメイン 4 が、AAA1 の  $\alpha/\beta$  サブモジュールおよび  $\alpha$  サブモジュール、AAA6 の  $\alpha$  サブモジュールにはさまれた状態にて相互作用していた。

AAA2 とリンカーとの相互作用はリンカーの中央部に位置する領域にも存在した (図 4a)。ここでは、AAA2 から延びている 2 つの挿入配列、H2 ヘリックス挿入配列の  $\beta$ -ヘアピン構造およびプレ Sensor 1 挿入配列のループ構造がリンカーのサブドメイン 2 およびサブドメイン 3 と相互作用していた (図 4a)。H2 ヘリックス挿入配列は、リンカーのサブドメイン 2 にある  $\beta 1$  構造、 $\beta 2$  構造、H7 ヘリックスと相互作用しており、プレ Sensor 1 挿入配列はサブドメイン 3 の H13 ヘリックスと相互作用していた。これら H2 ヘリックス挿入配列およびプレ Sensor 1 挿入配列の指状の構造がリンカーの構造をささえていることが明らかにされた。

典型的なリンカースイングモデルにおいては、力を発生したのちのポスト-パワーストローク状態では、リンカーの N 末端側は AAA4 あるいは AAA5 と結合していなければならない。AAA1 における ATP 加水分解サイクルにより構造変化が誘起され、AAA4 あるいは AAA5 と結合しているリンカーがはなれて、リンカーが AAA2 の方向に

スイング運動するというモデルである<sup>10,11,14</sup>。筆者らは、微小管結合部位を欠失した変異型モータードメイン A 分子の結晶構造をもとに、AAA3~AAA5 とリンカーとのあいだには直接の相互作用がないことを確認し、別の機構を提唱した<sup>17</sup>。AAA2 モジュールにある H2 ヘリックス挿入配列とプレ Sensor 1 挿入配列がリンカーのスイング運動に重要な役割を担うとするものである (図 5)。ほかの AAA+タンパク質においては、H2 ヘリックス挿入配列やプレ Sensor 1 挿入配列が対象となるタンパク質や DNA をつかまえたり再配向させたりする相互作用部位になっている<sup>21,22</sup>。細胞質ダイニンも、リンカーの構造を変換する装置として H2 ヘリックス挿入配列およびプレ Sensor 1 挿入配列を利用していると考えた。実際に、H2 ヘリックス挿入配列やプレ Sensor 1 挿入配列がリンカーのサブドメイン 2 とサブドメイン 3 のあいだに構造変化をひき起こせば、リンカーは折れ曲がり AAA+リングに対しスイング運動することができるだろう。サブドメイン 2 とサブドメイン 3 のあいだは H10 ヘリックスのみでつながったリンカーのもっとも細い部分に相当し、このモデルは構造的にも強くサポートされた。

ヒトのダイニン-2 の ADP およびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合させたプレ-パワーストローク状態の結晶構造においては (図 2e, 図 4b), リンカーの H10 ヘリックスが折れ曲がりリンカーが AAA2 のほうをむいていた<sup>19</sup>。機能解析の結果からも、AAA1 における ATP 加水分解サイクルにともない AAA1 と AAA2 のあいだでの AAA+リングの開閉が誘起されリンカーがスイング運動することはまちがいない<sup>14</sup>。ヒトのダイニン-2 の構造の報告においては、AAA2-AAA3-AAA4 の半円状に配置した  $\alpha/\beta$  サブドメインがリンカーの N 末端側と立体障害をひき

起こすことによりリンカーがスイング運動するという機構が提唱されている<sup>19</sup>。AAA+リングの表面に位置する  $\alpha/\beta$  サブドメインがリンカーのスイング運動を駆動する分子装置であるとする筆者らのモデルは、複数の結晶構造によりサポートされたと考えている。

### 5. アロステリックな情報の伝達経路

細胞質ダイニンの運動の機構を考えるうえでもうひとつ重要なのは、距離的にはなれた機能ドメインで起こる、微小管結合部位における微小管との結合、および、AAA1 における ATP の加水分解の 2 つの状態の情報を、どのように分子内で伝達しているのかという点である。細胞質ダイニンのモータードメインの構造においては、ストークおよびストラットからなるコイルドコイル構造をとる領域がもっとも構造的に可変性が高い<sup>10,11</sup>。そのため、ヒトのダイニン-2 の構造においてはストークおよびストラットの全長を含んで解析されてはいるものの分子モデルはポリアラニンにより構築されており<sup>19</sup>、出芽酵母に由来する細胞質ダイニンのモータードメインの構造解析においてはストークを欠失させたコンストラクトが用いられている<sup>15,18</sup>。細胞性粘菌に由来する細胞質ダイニンの微小管結合部位を欠失した変異型モータードメイン A 分子は、典型的な逆平行コイルドコイル構造をとるまっすぐ伸びたストークおよびストラットをもつ<sup>17</sup>。対照的に、微小管結合部位を欠失した変異型モータードメイン B 分子においてストークは少し倒れた位置にありやや短いコイルドコイル構造をもつ。野生型モータードメイン A 分子では微小管結合部位との結合領域の付近の CC2 ヘリックスの一部が 2 次構造をとっておらず、微小管結合部位を欠失した変異型モータードメインと好対照をなしている<sup>17</sup>。

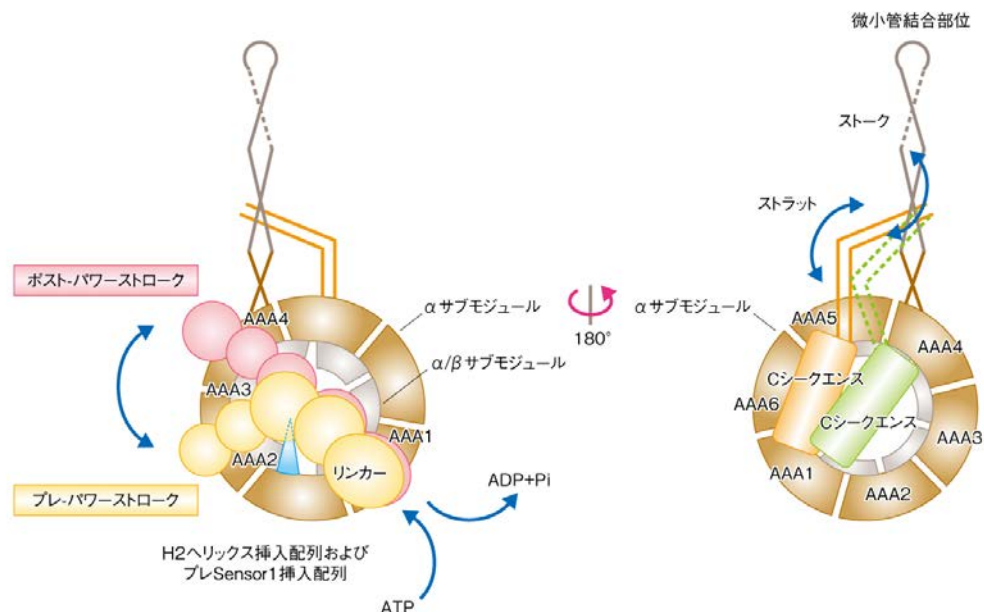


図 5 細胞質ダイニンの運動機構のモデル

ストークおよびストラットのもつ構造の大きな可塑性から、微小管結合部位と AAA<sup>+</sup>リングのあいだの双方向の情報の伝達機構との相関が示唆された。現在、ストークを介した情報の伝達のしくみとして、ヘリックススライディングモデルが広く受け入れられている<sup>23,24</sup>。このモデルは、逆平行コイルドコイルの関係にある 2 本のヘリックスが相対的にずれることにより、微小管結合部位と AAA<sup>+</sup>リングとのあいだで情報を伝達するというものである。細胞質ダイニンのモータードメインの構造解析からは、情報の伝達の途中でストークだけでなくストークとストラットが一体となって相対配置を変化させるモデルが提唱された。ストラットのコイルドコイル構造の先端の部分はストークの中心の部分と水素結合や疎水性相互作用により強く結合しており、その相互作用の面積は 800Å<sup>2</sup> にもおよぶ (図 2 b, c, 図 4c)。この広範な相互作用から、アロステリックな情報の伝達においてストークとストラットとが一体構造として機能することが強く示唆される。

アロステリックな情報の伝達経路については、ヒトのダイニン-2 の ADP およびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合させた構造が解析されたことにより、その分子内における構造変化が詳細に議論されるようになった。この報告においては、AAA1 におけるヌクレオチドの状態の変化により、ADP 結合型と比べ AAA5 の  $\alpha/\beta$  サブモジュールと AAA6 の  $\alpha$  サブモジュールとが一体となり AAA<sup>+</sup>リングに対し回転するとしている<sup>19</sup>。筆者らは、ストークおよびストラットから AAA1 までの情報の伝達経路として、AAA<sup>+</sup>リングの裏面、とくに、C シークエンスの重要性を指摘したい。以前に、C シークエンスの一部を欠損させた変異体がモーター活性を失うことが報告されている<sup>25</sup>。とくに、C シークエンスの最初に位置する H1 ヘリックスは構造においてたいへん重要であり、高分解能の構造解析によりはじめて同定された AAA5 エクステンションと一体となった球状の構造を形成していた。H1 ヘリックスからの長いループ構造により結合した C シークエンスの残りの部分は平坦な構造をとり AAA<sup>+</sup>リングを裏打ちするように配置されていた (図 4 c, d)。ADP 結合型の構造では C シークエンスは AAA1, AAA5, AAA6 とのみ相互作用しているのに対し (図 4c), ADP およびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合させた構造では、それにくわえ AAA2 および AAA3 の  $\alpha$  サブモジュールと密に相互作用していた (図 4d)。これは、AAA5 の  $\alpha/\beta$  サブモジュールおよび AAA6 の  $\alpha$  サブモジュールの AAA<sup>+</sup>リングに対する回転の範囲を規定する構造的な要因なのかもしれない。これまでの構造解析と機能解析の結果を総合的に判断して、微小管結合部位と AAA1 の ATPase 部位との情報の伝達経路として、ストークとストラットおよび AAA<sup>+</sup>リングの裏面に位置する C シークエンスが機能するというモデルを提唱する。

## おわりに

2012 年に筆者らにより 2.8Å 分解能で構造解析された細胞性粘菌に由来する細胞質ダイニンのモータードメインを筆頭として、同じ年に 3.3Å 分解能で構造解析された出芽酵母に由来する細胞質ダイニン、2015 年に 3.4Å 分解能で構造解析された ADP およびリン酸のアナログとしてバナジン酸と結合させた状態のヒトのダイニン-2 と、最近になり、アミノ酸残基のレベルで議論されるような細胞質ダイニンの原子構造があいついで報告された。細胞質ダイニンのモータードメインは AAA<sup>+</sup>タンパク質に共通した AAA<sup>+</sup>リング構造をもち、細胞質ダイニンに固有の機能ユニットとしてリンカー、ストークおよびストラット、C シークエンスを AAA<sup>+</sup>リングの両面に配置した非常に特徴的な構造をとっていた。複数の原子構造が明らかにされたことにより、ダイニンがどのようにして微小管のうえを移動する運動活性を獲得したのか、新しい視点が提供された。

最後に、運動活性に必須のパワーstroke とアロステリックな制御の 2 点にしばり、その分子モデルを提唱する (図 5)。AAA<sup>+</sup>リングの表面には、ほかの AAA<sup>+</sup>タンパク質と同様のしくみにより駆動されるリンカーのスイング運動を駆動する分子装置がある。すなわち、AAA1 と AAA2 のあいだで起こる ATP の加水分解にともなう AAA<sup>+</sup>リングの開閉が直接のひき金となり、リンカーの構造変化をひき起こす分子装置が AAA2-AAA3-AAA4 の半円構造に組み込まれている。AAA<sup>+</sup>リングの裏面には、ストークおよびストラット、AAA5 エクステンション、C シークエンスの構造をとおして AAA1 と微小管結合部位をつなぐ長距離の情報の伝達装置が配置されており、ATP 加水分解サイクルにともない微小管との親和性を制御する細胞質ダイニンに固有の機能を発揮している。細胞質ダイニンのモータードメインは、AAA<sup>+</sup>型 ATPase の一般性と細胞質ダイニンに固有の機能がうまく配置された、秀逸なモータータンパク質であるといえるだろう。

## 文献

- 1) Hook, P. & Vallee, R. B.: The dynein family at a glance. *J. Cell Sci.*, 119, 4369-4371 (2006)
- 2) Karki, S. & Holzbaur, E. L.: Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 45-53 (1999)
- 3) Vallee, R. B., Williams, J. C., Varma, D. et al.: Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J. Neurobiol.*, 58, 189-200 (2004)
- 4) Scholey, J. M.: Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.*, 180, 23-29 (2008)
- 5) Gibbons, I. R.: Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.*, 91, 107s-124s (1981)



- 6) DiBella, L. M. & King, S. M.: Dynein motors of the *Chlamydomonas* flagellum. *Int. Rev. Cytol.*, 210, 227-268 (2001)
- 7) Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. et al.: AAA<sup>+</sup>: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, 9, 27-43 (1999)
- 8) Tucker, P. A. & Sallai, L.: The AAA<sup>+</sup> superfamily: a myriad of motions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17, 641-652 (2007)
- 9) Hanson, P. I. & Whiteheart, S. W.: AAA<sup>+</sup> proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 519-529 (2005)
- 10) Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H. et al.: Dynein structure and power stroke. *Nature*, 421, 715-718 (2003)
- 11) Roberts, A. J., Numata, N., Walker, M. L. et al.: AAA<sup>+</sup> ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell*, 136, 485-495 (2009)
- 12) Gee, M. A., Heuser, J. E. & Vallee, R. B.: An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*, 390, 636-639 (1997)
- 13) Koonce, M. P.: Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J. Biol. Chem.*, 272, 19714-19718 (1997)
- 14) Kon, T., Mogami, T., Ohkura, R. et al.: ATP hydrolysis cycle-dependent tail motions in cytoplasmic dynein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 513-519 (2005)
- 15) Carter, A. P., Cho, C., Jin, L. et al.: Crystal structure of the dynein motor domain. *Science*, 331, 1159-1165 (2011)
- 16) Kon, T., Sutoh, K. & Kurisu, G.: X-ray structure of a functional full-length dynein motor domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 638-642 (2011)
- 17) Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R. et al.: The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature*, 484, 345-350 (2012)
- 18) Schmidt, H., Gleave, E. S. & Carter, A. P.: Insights into dynein motor domain function from a 3.3 Å crystal structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 492-497 (2012)
- 19) Schmidt, H., Zalyte, R., Urnavicius, L. et al.: Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke. *Nature*, 518, 435-438 (2015)
- 20) Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R. et al.: Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry*, 43, 11266-11274 (2004)
- 21) Erzberger, J. P. & Berger, J. M.: Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA<sup>+</sup> proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35, 93-114 (2006)
- 22) Enemark, E. J. & Joshua-Tor, L.: On helicases and other motor proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18, 243-257 (2008)
- 23) Gibbons, I. R., Garbarino, J. E., Tan, C. E. et al.: The affinity of the dynein microtubule-binding domain is modulated by the conformation of its coiled-coil stalk. *J. Biol. Chem.*, 280, 23960-23965 (2005)
- 24) Kon, T., Imamula, K., Roberts, A. J. et al.: Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 325-333 (2009)
- 25) Numata, N., Shima, T., Ohkura, R. et al.: C-sequence of the *Dictyostelium* cytoplasmic dynein participates in processivity modulation. *FEBS Lett.*, 585, 1185-1190 (2011)

## 著者プロフィール

### 栗栖 源嗣 (Genji Kurisu)

**略歴:** 1997年 大阪大学大学院工学研究科博士課程 修了, 同年 大阪大学蛋白質研究所 助手, 2004年 東京大学大学院総合文化研究科 助教授を経て, 2009年より大阪大学蛋白質研究所 教授.

**研究テーマ:** 構造生物学, タンパク質結晶学.

**関心事:** X線結晶構造解析のできるタンパク質の大きさおよび解析の精度の限界.

### 昆 隆英 (Takahide Kon)

**略歴:** 2000年 東京大学大学院総合文化研究科博士課程 修了, 同年 同 助手, 2010年 大阪大学蛋白質研究所 准教授, 2013年 法政大学生命科学部 教授を経て, 2015年より大阪大学大学院理学研究科 教授.

**研究テーマ:** 生物物理学, タンパク質科学.

**関心事:** タンパク質の原子構造から細胞における一方向性の過程をどこまで説明できるか.