

## 論文の内容の要旨

論文題目

細胞質ダイニンの微小管親和性制御機構の解明

氏名 宝田 理

### 【背景・目的】

細胞質ダイニンは、ATP のエネルギーを利用して微小管上を細胞膜側の+端から中心体方向の一端に向かって歩行運動する、微小管モータータンパク質である。細胞質ダイニンの歩行運動機能は主に 2 本のダイニン重鎖が担っている。ダイニン重鎖は、小胞との結合を担うステム、リング状の ATPase ドメイン、そして微小管結合ドメイン (Microtubule binding domain : MTBD) を含むストークから構成されている。MTBD と ATPase ドメインは距離的に 15 nm 離れて存在し、両者は 2 本の逆平行コイルドコイル鎖 CC1, CC2 によって連結されている (Fig. 1)。MTBD の微小管親和性は ATPase ドメインの ATP 結合状態によって制御されており、ATP が結合状態では低親和性状態に、ATP が加水分解され遊離したときは高親和性状態に変化することが知られている。

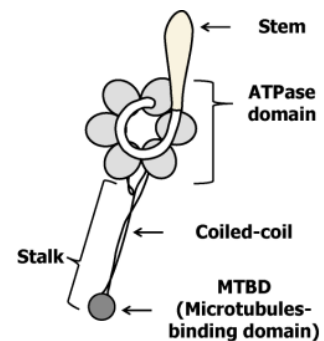


Fig. 1 細胞質ダイニン重鎖の模式図

これまでの生化学的な解析から、コイルドコイル鎖 CC1, CC2 に摂動を与えることによって MTBD の微小管親和性が変化することが知られている。MTBD とコイルドコイル鎖の一部を切り出して、安定なコイルドコイル鎖を形成する SRS (Seryl-tRNA synthetase) のコイルドコイル鎖に融合したキメラコンストラクトを用いた解析において、挿入する CC1 の長さを 4 残基変化させてコイルドコイル鎖の会合状態を変化させたところ、微小管親和性が 10 倍以上変化することが明らかとなった。このことから、コイルドコイル鎖の組み合わせが MTBD の微小管を制御していることが示唆された。また、低親和性状態の SRS-MTBD の X 線結晶構造は明らかとなっているものの、高親和性状態の SRS-MTBD の立体構造は報告されていない。近年、細胞性粘菌由来の細胞質ダイニン重鎖のステムの一部を切除したコンストラクトの X 線結晶構造が分解能 3.8Å で明らかとなった。この構造は ADP 結合状態であり、微小管に対して高親和性状態を反映すると想定されたが、MTBD 部分の構造は低親和性状態とほぼ同一の構造をとっていた。

よって、コイルドコイル鎖の会合状態の変化に伴って MTBD が微小管に対して高い親和性を獲得する機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、微小管親和性を制御した MTBD の単独状態および複合体状態の構造解析を行うことにより、コイルドコイル鎖の会合状態の変化によって MTBD にどのような構造変化が誘起され、微小管との親和性制御を達成しているのかを明らかにすることを目的とした。

## 【方法・結果】

### 1. 親和性を制御した MTBD コンストラクトの調製

酵母由来細胞質ダイニンの MTBD とコイルドコイル鎖の一部を含む 137 残基からなるコンストラクト MTBD137 (残基番号 3096-3232) を大腸菌により発現し解析に用いた。低親和性状態を反映した SRS-MTBD の結晶構造を参考に、結晶構造中で近接していた MTBD137 のコイルドコイル鎖(CC1, CC2)間の残基(S3097, V3222)に Cys 変異を導入し、コイルドコイル鎖の会合状態を S-S 結合で固定したコンストラクトを構築した。また、先行研究を参考に CC2 に導入した Cys 変異(V3222C)を固定したまま、CC1 の C 末端側に 4 残基ずらした残基(I3101)に Cys 変異を導入したコンストラクトを構築した。それぞれの微小管親和性を、超遠心を用いた微小管との共沈実験で算出した結果、 $K_d > 100 \mu\text{M}$ ,  $K_d = 4.8 \mu\text{M}$  と算出され、先行研究と同様に 10 倍以上の親和性の差が観測されたことから、微小管親和性を制御できたことが示唆された。それぞれのコンストラクトを以後 MTBD-Low, MTBD-High と呼び解析に用いた。

### 2. MTBD-Low と MTBD-High の立体構造決定

低親和性状態と高親和性状態の構造の違いを原子レベルで明らかにするために、MTBD-Low と MTBD-High の立体構造決定を行った。NOE に基づく距離情報、S-S 結合、H-D 交換実験に基づく水素結合、二面角情報、残余双極子カップリングに基づく配向情報を拘束条件として構造計算を行ったところ、両者ともに六本の  $\alpha$ -ヘリックス H1~H6 とコイルドコイル鎖 CC1, CC2 で構成されており、H4-H5 間の Loop 領域や H5 を除いたすべての領域の構造が収束した。両者の構造を比較したところ、全体構造は類似していたものの一部のヘリックスの配向が異なっていた。まず一番大きな違いとして、MTBD-Low に比べて MTBD-High の H1 の構造が傾いて前方に突出していた。この変化は H1 と連結している CC1 の変化によって生じており、CC1 は N 末端方向にわずかにスライド変化しながら、CC1 の CC2 に対する配向が MTBD-Low よりもより平行

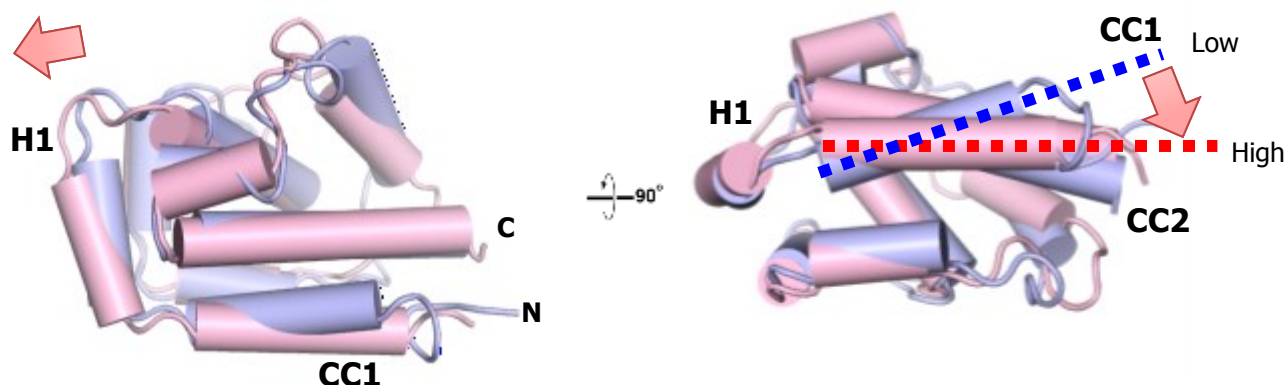


Fig. 2 MTBD-High (淡赤)と MTBD-Low (淡青)の重ねあわせ

### 3. Cryo-EM と NMR を組み合わせた MTBD-High と微小管の複合体構造の解析

観測された H1, CC1 の構造変化が微小管親和性制御にどのように重要なのかを明らかとするために、MTBD と微小管の複合体構造解析を行った。まず、低温電子顕微鏡を用いて、MTBD-High と微小管の複合体構造の解析を行い、分解能 11Å の三次元再構成構造を得た。密度マップ中の微小管に由来する密度マップには $\alpha$ ヘリックスの位置を識別できたため、 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin ダイマーの X 線結晶構造を一義的にフィッティングすることが出来た。一方 MTBD に由来する密度マップ中の $\alpha$ ヘリックスの位置を明確に識別することが出来なかったため、電子顕微鏡から得られた密度マップのみから MTBD-High と微小管の複合体を構築することは困難であった。

そこで、電子顕微鏡の全体構造と NMR から得られる構造情報を組み合わせることで複合体構造を構築することにした。まず MTBD-High の転移交差飽和(Transferred Cross Saturation : TCS)実験を行い、MTBD-High の H1, H3, H6 にある残基が結合に関与することを明らかとした。次に MTBD-High 中の結合に関与した残基と、密度マップにフィッティングした Tubulin ダイマーの構造で MTBD 由来の密度と接している残基が相互作用するという拘束条件のもと、HADDOCK によるドッキングモデル構築を行った。HADDOCK は他の生化学的な実験から得られた結合界面や相互作用残基対の情報を拘束条件に組み込むことができる rigid body ドッキングプログラムである。HADDOCK から算出された 50 個の構造群を類似性に基づいてクラスター化した。得られた各クラスターの構造と電顕密度マップの比較を行った結果、エネルギースコアが一番良好なクラスター1が、最も高い密度マップとの一致を示したことから、クラスター1の構造を MTBD-High と微小管の複合体構造と判断した(Fig. 3 (a))。

MTBD-High と微小管の複合体構造では、MTBD は $\alpha$ -tubulin と $\beta$ -tubulin の界面に結合しており、多数の塩橋が形成されていた。複合体の界面を MTBD 側、Tubulin 側から見ると、MTBD 側は塩基性残基で占められており、H6 の極性残基は $\alpha$ -tubulin と、H3 の極性残基は $\beta$ -tubulin と、H1 の極性残基は $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin の両方と相互作用していた。また H1 に唯一存在する E3122 は $\alpha$ -tubulin の R402 と塩橋を形成していた(Fig. 3 (b))。

これらの相互作用が微小管結合に重要であるか確かめるために、MTBD-High の結合界面近傍に存在する荷電性残基に Ala, Met 変異を導入した MTBD-High 変異体の微小管親和性解析を行った。その結果、複合体で相互作用に関与していなかった K3116 や K3204 への変異導入では微小管親和性が変化しなかったのに対し、H1 の E3122 や H3 の R3159 のように複合体モデル構築中で塩橋を形成した残基への変異導入では顕著に微小管親和性が低下することが示された。

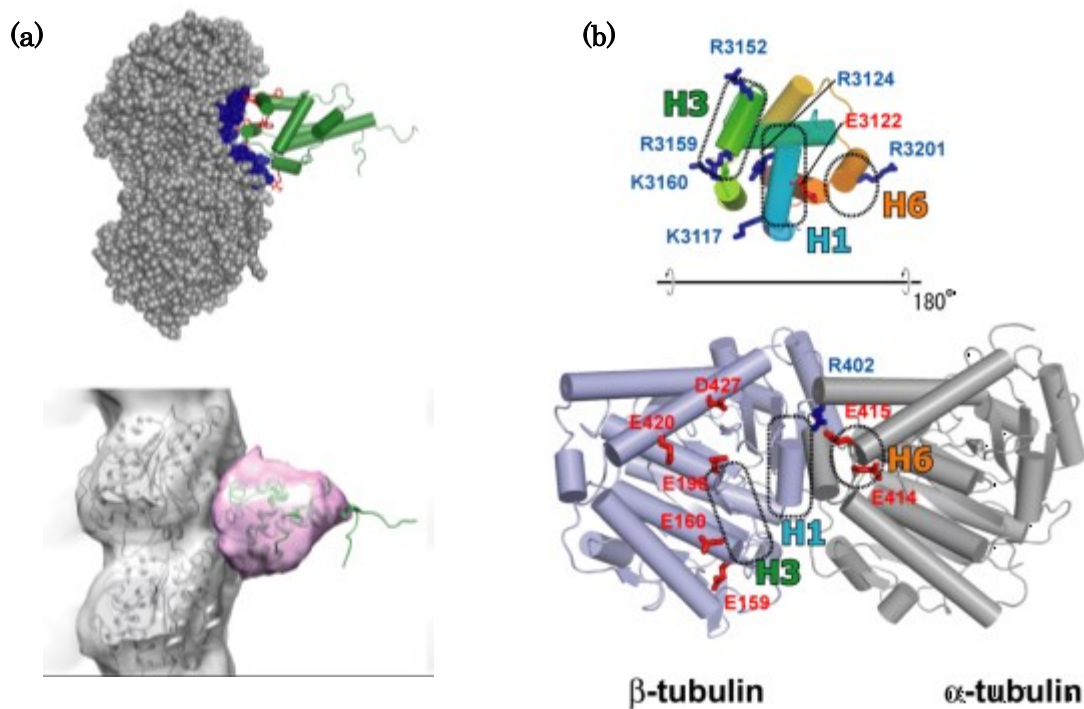


Fig. 3 (a) MTBD-High—微小管複合体モデルと電気顕微鏡マップへのフィッティング  
(b) 結合面側から MTBD-High—微小管複合体構造を観測した図

#### 【まとめと考察】

MTBD-High と微小管の複合体と MTBD-Low 単独状態の構造を比較したところ、MTBD-Low では S-S 結合によって CC1 の構造が固定されており、CC1, H1 に構造変化が生じないために、H1, H3, H6 の相対配置が MTBD-High と異なっており、微小管の相互作用部位に近接することが出来ないことがわかった。つまり、MTBD が高い微小管親和性を獲得するためには CC1 と H1 の構造が変化する必要があることが示された。

MTBD-High—微小管の複合体構造解析から、MTBD と微小管間の相互作用は H1, H3, H6 中の複数の残基間で形成されており、距離的に離れた複数箇所での相互作用が同時に形成できることが高親和性状態の獲得に重要であることが明らかとなった。以上より、ATPase ドメインの ATP 結合状態の変化によって CC1 に構造変化が生じ、CC1 と連結した H1 の構造変化が誘起され、その結果 H1, H3, H6 に存在する複数の極性残基が微小管と相互作用できるようになり、高親和性状態に移行するという細胞質ダイニンの微小管親和性制御メカニズムを本研究の MTBD の各親和性状態の立体構造および複合体構造から明らかとした。