トピックス

纖毛ダイニン軽鎖と重鎖微小管結合部位の複合体構造—見えてきた軽鎖LC1の役割—

八木俊樹¹, 戸田暁之^{2,*}, 市川宗蔵^{3,4}, 栗栖源嗣²

¹県立広島大学・生物資源科学部・生命環境学科

²大阪大学・蛋白質研究所

³奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科

⁴科学技術振興機構さきがけ

*現 日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所

1. はじめに

ダイニンはATPの加水分解エネルギーを利用して微小管のマイナス端方向に滑走するモータータンパク質である。鞭毛纖毛で働くタイプと細胞内小胞輸送に働くタイプの2種に大別される。どちらも、重鎖、中間鎖、軽鎖などのサブユニットからなる巨大な複合体で、そのうち最も重要なものが重鎖である。重鎖はATPase活性と微小管滑り運動活性をもつ頭部と、局在位置や結合相手を決める尾部の2つの機能単位からなる。中間鎖、軽鎖の多くは重鎖の尾部に結合してダイニン分子のターゲティングに寄与する。一方、頭部に結合する珍しいタイプの軽鎖が鞭毛纖毛の外腕ダイニンに見つかっていた¹⁾。最近、この軽鎖LC1が重鎖の微小管相互作用部位に結合することが判明した。重鎖のこの部位とLC1との複合体を構造解析した結果、LC1によりダイニンと微小管の相互作用が制御される可能性が示唆された。ここでは、その複合体構造の概要と予想されるLC1の機能について紹介する。

2. 鞭毛纖毛とダイニン

鞭毛纖毛は、9本のダブルット微小管が2本の微小管を取り囲む「9+2」と呼ばれる構造をもつ（以下では、鞭毛と略記する）。この構造は下等な生物からヒトに至るまでよく保存されている。図1Aに、緑藻クラミドモナスの鞭毛横断面の模式図を示す。ダブルット微小管には2種類のダイニン腕（ダイニン内腕と外腕）があり、ATP加水分解を伴い隣り合う微小管間に滑りを生じさせる。3頭構造をもつ外腕ダイニンは3本の重鎖（ α , β , γ 鎖）をもつ巨大な複合体で、鞭毛

長軸に沿って24 nm周期で並んでいる。内腕ダイニンは少なくとも7種類の分子種（ダイニンa-g）が約100 nm周期で並んでいる²⁾。これまでの研究から、外腕は鞭毛打頻度の上昇に、内腕は鞭毛の屈曲の維持に関与し、両者の機能は異なると考えられている²⁾。

3. ダイニンの構造

ダイニン重鎖は尾部と頭部に大別できる（図1B）。N末端側1/3を占める尾部は、そのアミノ酸配列に多

図1 (A) 鞭毛纖毛の横断面とダイニン外腕分子の構造, (B) ダイニン重鎖のアミノ酸配列とその機能単位。

The Complex of Outer-arm Dynein Light Chain-1 and the Microtubule-binding Domain of the Heavy Chain Shows How Axonemal Dynein Tunes Ciliary Beating

Toshiki YAGI¹, Akiyuki TODA^{2,*}, Muneyoshi ICHIKAWA^{3,4} and Genji KURISU²

¹Faculty of Bioresource Sciences, Prefectural University of Hiroshima

²Institute of Protein Research, Osaka University

³Division of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology

⁴PRESTO, Japan Science and Technology Agency

*Present Address: Japan Tobacco Inc., Central Pharmaceutical Research Institute

様性があり、そこに結合する中間鎖、軽鎖とともに分子のターゲティングに寄与する²⁾。一方、C末端側2/3を占める頭部のアミノ酸配列はよく保存され、そこには連続する6つのAAAコンセンサス配列が含まれている。AAA⁺モジュールから形成される環状構造(AAA⁺リング)とリンカー、C-sequenceが頭部モータードメインを形成している(図1B)³⁾。

ダイニン分子の最大の特徴は、ATPを加水分解するAAA1ドメインと微小管結合部位が約20 nmも離れていることである。AAA4, AAA5モジュール間から逆平行型コイルドコイルからなる棒状構造(ダイニーストック)が突出し(図1B)、その先端部はATP依存的に微小管と結合解離する。これまでの研究から、ATP依存的なダイニン・微小管の相互作用変化は、ストックコイルドコイルのレジストリーのズレにより生じることが示唆されている³⁾。

4. | ダイニーストックに結合する軽鎖LC1

LC1は外腕ダイニン γ 鎖の頭部に結合する軽鎖タンパク質である¹⁾。クラミドモナス野生株に変異型LC1遺伝子を形質転換すると、鞭毛打が不規則に停止し運動性が低下した。この結果から、LC1にはダイニンの活性を調節する機能があることが示唆されていた⁴⁾。

LC1の機能を調べるために、その重鎖結合部位を特定する実験を行った。Hisタグ付きLC1を発現するクラミドモナス細胞から外腕ダイニン分子を分離・精製し、それにNi-NTAナノゴールドを結合させ電子顕微

鏡観察した⁵⁾。ナノゴールドは、3本のダイニン重鎖のうち1本の頭部ストック先端部に観察された(図2A, オレンジ矢印)。興味深いことに、ゴールドが検出されたストックは、検出されない他の2つに比べて、その先端が大きく見えた(図2A, 赤矢印)。両者の大きさの違いは、NMR構造から見積られたLC1のサイズとほぼ一致した⁵⁾。これらのことから、LC1は γ ストック先端の微小管結合部位(γ MTBD)に局在し、そのため、先端部が大きく見えることが示唆された。

LC1と γ ストックが特異的に結合することは、生化学的な実験からも支持された。外腕ダイニン α , β , γ のストックタンパク質と軽鎖LC1との共沈実験から、LC1は γ ストックに1:1で結合することがわかった(図2B)。また、 β 鎖と γ 鎖のストックの各領域をスワップしたキメラタンパク質を用いた実験から、LC1と γ 鎖の微小管結合部位が特異的に結合することも確認できた⁵⁾。鞭毛内でLC1は γ ストックとともに微小管近傍に位置することが強く示唆された(図2C)。

5. | LC1- γ ダイニーストック複合体の構造

LC1, ストックの結合様式を原子レベルで明らかにするために、両者の複合体構造を1.7 Åの分解能で決定し、複合体内のLC1, γ MTBDの構造を、それぞれに対応する既知単体構造と比較した(図3A, B)⁶⁾。LC1は既知構造と大きくは違わなかったが、 γ MTBDでは、フラップと呼ばれる構造に違いがあった。フラップは細胞質ダイニンのMTBDには見られない構造である。鞭毛内腕ダイニンの一部および外腕ダイニン γ 鎖のMTBDに見つかっており、内腕ダイニンcにおいてそのコア構造から飛び出すフレキシブルな β ヘアピン構造として同定されていた(図3B, 右図)⁷⁾。 γ MTBD + LC1複合体において、フラップは、MTBDのH5ヘリックスとともにLC1のロイシンリッチリピート構造と広く接触しており(図3A), MTBDコア構造に寄り添い折りたたまれた配置をとっていた(図3B, 赤矢印)⁶⁾。

6. | LC1によるダイニンの制御モデル

LC1はダイニン γ 鎖の微小管結合能に対してどのような役割をもつのだろうか? 微小管に結合する細胞質ダイニーストックの構造を参考に⁸⁾, γ MTBD + LC1が微小管に結合する構造モデルを作成した。細胞質ダイニンの微小管結合部位に γ MTBDを重ね合わせると、複合体を立体障害なく微小管にドッキングできた(図3C)。LC1およびMTBDフラップはともに、微小管とは直接結合しない位置にあり、フラップは一見すると微小管との結合に関与しないように見える。

ごく最近のクライオ電子顕微鏡構造解析から、ヒト

図2 (A) ダイニン外腕分子上のLC1の位置特定。LC1のHisタグに結合するNi-NTAナノゴールドを電子顕微鏡観察した(オレンジ矢印)。3つの頭部ストックのうち1つの先端部は必ず、他の2つよりも大きく見えた(赤の矢印)。(B) 外腕ダイニン α , β , γ ストックとLC1の結合を調べる共沈実験。SDS-PAGE解析の結果。(C) 鞭毛内でのLC1の位置を示すモデル。(D) γ ダイニーストックと微小管の結合。LC1が結合すると、 γ ストックの微小管への結合量は減少した。

図 3

(A) γ MTBD + LC1 複合体の構造。(右) γ MTBD, LC1 それぞれを抜き出して示した構造 (B) 外腕 γ 鎖と内腕ダイニン c のストーク MTBD の構造比較。それぞれのフラップの位置 (赤矢印)。 γ 鎖では、複合体から LC1 を除去した。(C) MTBD と微小管の結合予測図。(左) γ MTBD + LC1 複合体, (右) 内腕ダイニン c ストーク。LC1 により折りたたまれたフラップは鞭毛打に応じて隣のチューブリン素繊維と相互作用できる可能性がある。

纖毛内腕ダイニン DNAH7 (ダイニン c のホモログに相当) では, MTBD 構造から飛び出すフラップが微小管と直接結合する可能性が示唆されている⁹⁾。MTBD のコア構造は, 微小管の素繊維 1 本に結合し, 一方, フラップは, 微小管長軸に対して 90° 方向に伸び出し, 隣の素繊維と相互作用すると解釈された (図 3C)⁹⁾。市川らは, LC1 の有無により γ ストークと微小管の結合を比較し, LC1 結合型ストークは非結合型ストークに比べて微小管に結合しにくくなることを示した (図 2D)⁷⁾。LC1 はフラップをマスクする機能を持ち, それを通じてダイニンの微小管結合性を制御する可能性がある⁶⁾。外腕ダイニンの機能を変える変異型 LC1 がすでに得られている⁴⁾。今後は, この変異型ダイニンの機能解析を行い, フラップの機能に迫りたい。

LC1 の局在部位を決定した研究は, 東京大学大学院総合文化研究科・豊島陽子先生のグループとの共同研究です。この場をお借りし, 感謝申し上げます。

文 献

- 1) Benashski, S. E. *et al.* (1999) *Biochemistry* **38**, 7253-7264. DOI: 10.1021/bi990466y.
- 2) Kamiya, R., Yagi, T. (2014) *Zoolog. Sci.* **31**, 633-644. DOI: 10.2108/zs140066.
- 3) Schmidt, H., Carter, A. P. (2016) *Biopolymers* **105**, 557-567. DOI: 10.1002/bip.22856.
- 4) Patel-King, R. S., King, S. M. (2009) *J. Cell Biol.* **186**, 283-295. DOI: 10.1083/jcb.200905083.
- 5) Ichikawa, M. *et al.* (2015) *Mol. Biol. Cell* **26**, 4236-4247. DOI: 10.1091/mbc.e15-05-0289.
- 6) Toda, A. *et al.* (2020) *J. Biol. Chem.* **295**, 3982-3989. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011541.
- 7) Kato, Y. S. *et al.* (2014) *Structure* **22**, 1628-1638. DOI: 10.1016/j.str.2014.08.021.
- 8) Redwine, W. B. *et al.* (2012) *Science* **337**, 1532-1536. DOI: 10.1126/science.1224151.
- 9) Lecay, S. E. *et al.* (2019) *Elife* **8**, e47145. DOI: 10.7554/eLife.47145.

八木俊樹

八木俊樹 (やぎ としき)

県立広島大学生物資源科学部教授
1995 年名古屋大学大学院理学研究科博士課程修了, 東京大学大学院医学研究科・講師等を経て, 2014 年より現職。

研究内容: 纖毛運動の分子機構の研究

連絡先: 〒727-0023 広島県庄原市七塚 5562

E-mail: yagit@pu-hiroshima.ac.jp

URL: <https://www.pu-hiroshima.ac.jp/p/yagit/lab-molmach.html>

戸田暁之

戸田暁之 (とだ あきゆき)

日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所研究員
2020 年大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻博士後期課程修了, 博士 (理学), 2020 年 4 月より現職。

市川宗厳

市川宗厳 (いちかわ むねよし)

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科助教・JST さきがけ研究者 (兼任)

2015 年東京大学大学院総合文化研究科博士課程修了, マギル大学博士研究員を経て, 2019 年より現職。

研究内容: クライオ電子顕微鏡法を用いたタンパク質の構造解析

連絡先: 〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5
バイオサイエンス D 棟 5 階

E-mail: michikawa@bs.naist.jp

URL: <https://bsw3.naist.jp/tsukazaki/>

栗栖源嗣

栗栖源嗣 (くりす けんじ)

大阪大学蛋白質研究所教授

1997 年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了, 大阪大学蛋白質研究所助手, 東京大学大学院総合文化研究科助教授を経て, 2009 年 4 月より現職。

研究内容: X 線と電子顕微鏡を用いたタンパク質の構造研究

連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

E-mail: gkurisu@protein.osaka-u.ac.jp

URL: <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography>