

福原 茂朋, 望月 直樹

(国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部)

Lymphocytes mobilization into blood regulated by Spns2, a sphingosine 1-phosphate transporter, expressed on endothelial cells

Shigetomo Fukuhara and Naoki Mochizuki (Department of Structural Analysis, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

細胞中心方向輸送のエンジン：細胞質ダイニンの構造と運動メカニズム

1. はじめに

私たちの体を構成する細胞の中では、分子モーターと呼ばれるタンパク質群—ミオシン、キネシン、ダイニン—が、ATP加水分解で得られた化学エネルギーを力学的運動へと変換することで、生命活動に必要な様々な細胞運動を駆動している。細胞質ダイニンは、そのような分子モーターの主要メンバーの一つで、細胞内では微小管ネットワークのマイナス端方向（一般的には細胞の中心方向）への物質輸送のほぼ全てを担っており、さまざまな膜小胞、細胞内小器官、RNA、タンパク質複合体そしてウイルスの移動・配置に必須な役割を果たす¹⁾。また、細胞質ダイニンの機能は、ゴルジ体、エンドソーム、絨毛・鞭毛などの細胞内小器官の形成・維持管理や、核膜崩壊、紡錘体形成、染色体分離など細胞分裂のキープロセス、あるいは成長円錐の形成や神経細胞の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¹⁾。

このように細胞内プロセスのエンジンとしてはたらくダイニンであるが、どのような分子メカニズムで機能しているのかという根本的な問いについては、分子が同定されてから半世紀近く経つにもかかわらず、多くの未解決問題が残されている。メカニズム研究の進展を阻んできた主要因の一つは、その構造情報が十分ではないことにあった。より小型で単純な分子モーターであるミオシンとキネシンについては、1990年代に結晶構造が決定され、その運動メカニズムを原子レベルで議論することが可能な段階にまで研究が進展している。対照的にダイニンは、その巨大さと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

造情報に関する知見は、ごく最近まで主に負染色電子顕微鏡像に依存している状況にあった。

しかし、構造解析技術の進展に伴い、ダイニンの運動メカニズム研究は急展開を迎えている。中核領域であるモータードメインについて、2011年には結晶化と中分解能構造解析が^{2,3)}、2012年にはより高分解能の結晶構造解析が達成され^{4,5)}、ダイニンの構造とメカニズムを原子レベルで議論するための基盤が確立された。また2012年には、力発生前・後の二つの中間状態の電子顕微鏡像3次元構造解析も報告され⁶⁾、ダイニンの力を生み出す構造変化についての知見も蓄積されつつある。本稿ではこれら最近の進展を、筆者らの研究成果を中心に紹介する。

2. ダイニンのサブユニット構成とモータードメイン

細胞質ダイニンは、重鎖2本に中間鎖2本、中間軽鎖2本、3種類の軽鎖がそれぞれ2本結合した約1,200 kDaの巨大なタンパク質複合体である。この複合体の中核をなすダイニン重鎖は、約4,500アミノ酸残基からなる1本の長大なポリペプチド鎖で、輸送エンジンに必要なとされる四つの機能ユニット—尾部、リング、リンカー、ストーク—を含んでいる(図1)。重鎖のN末端側およそ3分の1の領域は、他のサブユニットや積荷などの結合および重鎖の二量体化を担う結合ユニットであり、「尾部」と呼ばれる。残りのC末端側380 kDa領域(約3,300アミノ酸残基)がモーター活性を担うモータードメインで、ATP加水分解

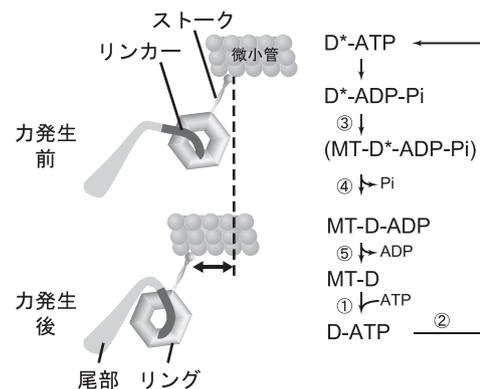


図1 ダイニンの力発生モデル

ダイニンは、次の①～⑤の反応過程を繰り返すことで微小管上をそのマイナス端方向へ直線運動すると考えられている。① ATP結合により微小管から解離する。②力発生前の構造をとる。③ATP加水分解後に微小管に再結合する。④リン酸放出に伴いリンカーをスイングすることで力を発生する。⑤力発生後の構造をとりADPを放出する。D：力発生後のダイニン、D*：力発生前のダイニン、MT：微小管。

ユニット“リング”，力発生ユニット“リンカー”，そして微小管結合ユニット“ストーク”を内包している。

ダイニンは、リングでのATP加水分解サイクルと、ストークの微小管結合解離やリンカーのメカニカルな構造変化とを巧みに共役させることでモーター活性を発揮する。反応速度論的測定を基にして、図1に示す反応サイクルが提唱されている⁷⁾。微小管に強く結合したダイニンは、ATP結合により微小管から解離し、加水分解後に微小管に再結合、加水分解産物放出に伴うリンカーの大きな構造変化により微小管上をそのマイナス端方向に運動するという機構である。以下、力と運動を生み出す各機能ユニットの構造と機能をより詳細に見ていこう。

3. ATP加水分解リング

ダイニンは、AAA+タンパク質と総称されるリングATPaseファミリーに属しており⁸⁾、Gタンパク質と共通の祖先から進化してきた他の細胞骨格系分子モーター（ミオシンやキネシン）とは全く異なった構造的特徴を持つ。そのモータードメインは、AAA+タンパク質に特徴的なATP加水分解モジュール（AAA+モジュール）を6個（AAA1～AAA6）含んでおり、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大きなリング状ATP加水分解ユニットが形成されている（図2a, b）。

変異体を用いた機能解析から、6個のATP加水分解モジュールは、次の①～③に示すように等価でないことが明らかにされている⁹⁾。①6個のAAA+モジュールのうちATP/ADP結合能を持つのはAAA1～AAA4のみである、②ATP加水分解活性を持つのはAAA1, AAA3, AAA4の3か所である、③モーター駆動に必須なATP加水分解部位はAAA1のみである。ただし、AAA3とAAA4の機能がダイニンの運動メカニズムに無関係ということではない。モータードメイン内の複数のATP加水分解サイクルは独立ではなく、AAA1を中心とした共役ネットワークとしてダイニンの運動能を制御すると考えられている⁹⁾。

筆者らが決定したモータードメインの結晶構造では、AAA1～AAA4の4か所にADP分子が結合していたが、これらのヌクレオチド結合部位には大きな構造的バリエーションが観察された⁴⁾（図2b）。AAA1とAAA4はいわゆる“開いた”状態にあり、AAA2とAAA3は“閉じた”状態にあった。各ヌクレオチド結合部位は、隣接するAAA+モジュール間に形成されているため、AAA1-AAA2間とAAA4-AAA5間にギャップが生じ、リング構造が非対称となっている。これらのギャップは、ATP加水分解

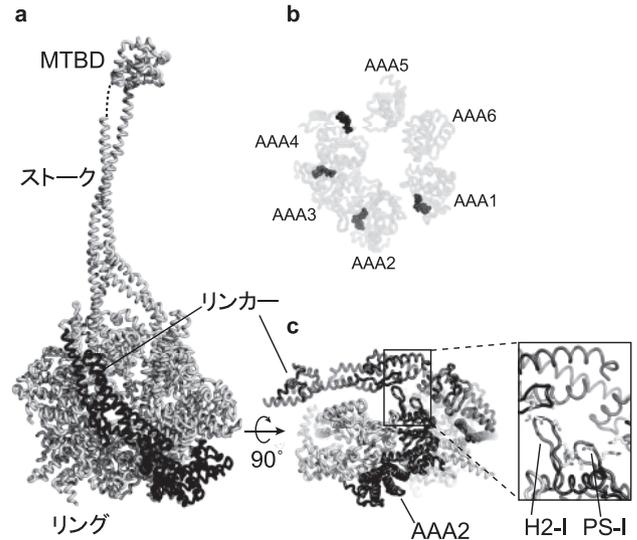


図2 ダイニンモータードメインの結晶構造（おもて面）

(a) リングおもて面から見たダイニンモータードメインの全体構造。(b) リング内の4個のヌクレオチド結合部位。各AAA+モジュールの一部(α/βサブモジュール⁴⁾)とAAA1～AAA4に結合するADP分子(黒色)を示した。(c) リングとリンカーの相互作用。拡大図には、リングとリンカーの主要相互作用領域を示した。リングとHelix2 (H2)/PS-1インサート間および、H2インサートとPS-1インサート間の相互作用に関与する残基はその側鎖を表示した。

サイクルに伴い開閉すると予想される。筆者らは、AAA1のATP加水分解サイクルに伴うAAA1-AAA2間の構造変化がダイニンの力発生機構上特に重要だと考えている。その詳細は、以下の力発生ユニット“リンカー”の項で述べる。

4. 力発生リンカー

リンカーは、リング上に横たわる細長い構造体で、そのスイング運動がダイニン分子の力発生と微小管に対する変位運動を生み出すと考えられている¹⁰⁾（図1）。最近の電子顕微鏡解析およびGFP融合ダイニンを用いたFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）解析により、リンカーのリングに対する相対位置は、AAA1-ATP加水分解部位のヌクレオチド状態に依存して変化することが示されている^{11,12)}。リンカーN末端は、力発生前のATP状態ではAAA2近傍に位置するのに対し、力発生後のADP状態ではAAA4付近に位置する。このリンカースイングの鍵となるのは、リンカーとリングとの相互作用であると考えられる。

ADP結合状態の結晶構造では、リンカーはリングのAAA1とAAA4とをまたぐように横たわり、力発生後の構造状態をとる⁴⁾（図2a）。興味深いことに、リングとリン

カーの相互作用部位は非常に限定的で、AAA2 から飛び出た二つのループ構造 (Helix2 インサートと PS-I インサート) のみが主要相互作用部位であり、リンカーの最も細い部分を挟むように結合している (図 2c)。これら特徴的なループは、一部の AAA+タンパク質に共通して見られる構造であり、各々のターゲット分子の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機能する¹³⁾。ダイニンは、この共通のインターフェースをリンカーシングに利用しているのではないだろうか。反応サイクル中に、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—すなわちリンカーを曲げる—ことでリンカーシングを引き起こすという機構である。実際、力発生前後の構造を捉えた筆者らのクライオ電子顕微鏡像構造解析の結果⁹⁾や、ループ構造の変異体解析の結果⁴⁾もこの“リンカー曲げ機構”を支持している。AAA2 が ATP 加水分解能を持たないことや、AAA2 のループ構造が AAA1-ATP 加水分解部位の近傍に位置することから、リンカーの構造変化を引き起こすのは、上述の AAA1-ATP 加水分解サイクルに伴う AAA1-AAA2 間の構造変化であろう。

5. 微小管結合ストーク

分子モーターが細胞骨格トラック上で運動能を発揮するためには、分子内のトラック結合部位と ATP 加水分解部位との間に緊密な情報伝達が必要である。トラック結合・解離サイクルと ATP 加水分解サイクルを同期させることで、分子モーターはトラック上を効率よく一方向に運動できるのである。

ダイニンの際立った特徴の一つは、この二つの機能部位が 200 Å もの距離で隔てられていることである (図 3)。モーターを直接駆動する ATP 加水分解部位は、上述のようにリング内の AAA1 に位置する。一方、微小管結合部位 (MTBD) は AAA4 から突き出した長大なコイルドコイル構造“ストーク”の先端に配置されている。それでは、どのように分子内で長距離情報伝達が行われているのだろうか？

MTBD とリング間のストークを介した情報伝達については、コイルドコイル構造は安定だという“常識”に反して、ストークを形成している 2 本の α ヘリックスが全長にわたって互いに“ずれる”ことで情報を伝えるというモデルが有力である。実際、2 本のヘリックス間のかみ合わせ (registry) が半ヘプタッド (~5 Å) ずれた結晶構造が報告されている^{4,14)}。また、2 本のヘリックスがずれる動きを架橋により阻害した変異体の機能解析から、このずれが

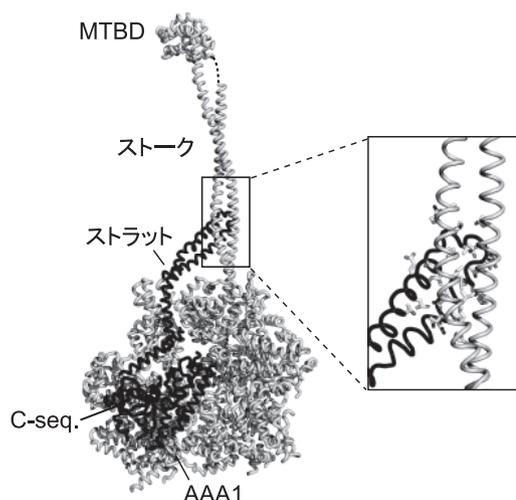


図 3 ダイニンモータードメインの結晶構造 (うら面) リングうら面から見たダイニンモータードメインの全体構造。ストラットと C-sequence の相互作用を見やすくするため、AAA5 の一部 (AAA5 extension¹¹⁾) は表示していない。拡大図には、ストラットとストークのヘリックスバンドル形成領域を示した。相互作用に関与する残基はその側鎖を表示した。

情報伝達を担うことも示されている¹⁵⁾。

ストーク基部と AAA1-ATP 加水分解部位の情報伝達については、筆者らは、リングのうら面に配置されている二つの構造が重要だとするモデルを提唱している⁴⁾ (図 3)。ストラットは、AAA5 から突き出した L 字型をしたコイルドコイル構造でその先端部分でストークとヘリックスバンドルを形成している。C-sequence は、不完全な β バレル構造をとる C 末端の構造領域で、AAA1 と AAA5 のストラット基部とを連結している。変異体機能解析の結果もこれら二つの構造の分子内情報伝達に対する重要性を示している。

以上のような構造的特徴から、筆者らは、ダイニンが ATP 加水分解リングの両面を巧みに利用してモーター活性を発揮しているのではないかと推測している。リングうら面では、ATP 加水分解部位と微小管結合部位の情報伝達がダイニン特有の構造—ストーク、ストラット、C-sequence—を介して行われ、リングおもて面では、力を発生するリンカーのシング運動が AAA+タンパク質に共通の機構で駆動されるというメカニズムである。

6. おわりに

ダイニンが真核生物の繊毛を駆動する微小管モーターとして同定され、力の単位“ダイン”にちなんで命名されてから、間もなく 50 周年を迎えようとしている。私たちは、

その心臓部であるモータードメインについて、ようやくその(力発生後の)原子構造を手にすることができた。しかし、今後明らかにしなくてはならない点が多い。まず、ATP加水分解サイクル中の各構造—特に力発生前の構造—を原子レベルで明らかにすることが次に求められる最重要課題の一つであろう。また、AAA2~AAA4によるモーター活性制御の具体的なメカニズムを明らかにすることも重要である。さらには、ダイニン複合体全体の運動と制御メカニズムを解明する必要がある。筆者らは、構造解析と機能解析の両面から、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。

- 1) Vallee, R.B., McKenney, R.J., & Ori-McKenney, K.M. (2012) *Nat. Cell Biol.*, 14, 224-230.
- 2) Carter, A.P., Cho, C., Jin, L., & Vale, R.D. (2011) *Science*, 331, 1159-1165.
- 3) Kon, T., Sutoh, K., & Kurisu, G. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 638-642.
- 4) Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamura, K., Shima, T., Sutoh, K., & Kurisu, G. (2012) *Nature*, 484, 345-350.
- 5) Schmidt, H., Gleave, E.S., & Carter, A.P. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 492-497.
- 6) Roberts, A.J., Malkova, B., Walker, M.L., Sakakibara, H., Numata, N., Kon, T., Ohkura, R., Edwards, T.A., Knight, P.J., Sutoh, K., Oiwa, K., & Burgess, S.A. (2012) *Structure*, 20, 1670-1680.
- 7) Imamura, K., Kon, T., Ohkura, R., & Sutoh, K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 16134-16139.
- 8) Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., & Koonin, E.V. (1999) *Genome Res.*, 9, 27-43.
- 9) Kon, T., Shima, T., & Sutoh, K. (2012) in *Comprehensive Biophysics*, Vol. 4, pp. 360-376, Elsevier.
- 10) Burgess, S.A., Walker, M.L., Sakakibara, H., Knight, P.J., & Oiwa, K. (2003) *Nature*, 421, 715-718.
- 11) Kon, T., Mogami, T., Ohkura, R., Nishiura, M., & Sutoh, K. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 513-519.
- 12) Roberts, A.J., Numata, N., Walker, M.L., Kato, Y.S., Malkova, B., Kon, T., Ohkura, R., Arisaka, F., Knight, P.J., Sutoh, K., & Burgess, S.A. (2009) *Cell*, 136, 485-495.
- 13) Erzberger, J.P. & Berger, J.M. (2006) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35, 93-114.
- 14) Carter, A.P., Garbarino, J.E., Wilson-Kubalek, E.M., Shipley, W.E., Cho, C., Milligan, R.A., Vale, R.D., & Gibbons, I.R. (2008) *Science*, 322, 1691-1695.
- 15) Kon, T., Imamura, K., Roberts, A.J., Ohkura, R., Knight, P.J., Gibbons, I.R., Burgess, S.A., & Sutoh, K. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 325-333.

昆 隆英^{1,2}, 栗栖 源嗣³

(¹法政大学生命科学部,

²科学技術振興機構さきがけ,

³大阪大学蛋白質研究所)

Structure and mechanism of cytoplasmic dynein
Takahide Kon^{1,2} and Genji Kurisu³ (¹Faculty of Bioscience and Applied Chemistry, Hosei University, 3-7-2, Kajinocho, Koganei, Tokyo 184-8584, Japan, ²JST, PRESTO, ³Institute for Protein Research, Osaka University)

補助サブユニットによるグルタミン酸受容体の機能制御

1. はじめに

グルタミン酸はヒトの脳で主要な興奮性の神経伝達物質であり、グルタミン酸受容体の活性制御の仕組みを探ることは、脳の生理機能や病気を理解する上で重要である。近年、グルタミン酸受容体の機能を調節する補助サブユニットが注目され、多数の補助サブユニットが新たに報告されている。本稿では、哺乳類のイオンチャンネル型グルタミン酸受容体の補助サブユニットの研究の進展を紹介する。

2. 興奮性シナプスとグルタミン酸受容体

化学シナプスでは、シナプス前終末からシナプス間隙へと神経伝達物質が放出される(図1)。放出された神経伝達物質が、シナプス後肥厚上の受容体に結合して応答を起こすことで、シナプス前細胞からシナプス後細胞へと情報が伝達される。興奮性シナプスはシナプス後膜で脱分極を起こし、シナプス後細胞の発火を導く。

グルタミン酸はヒトの脳で主要な興奮性の神経伝達物質である。イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は薬理的に α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)型、*N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA)型、カイニン酸型に分類される(図1)。AMPA受容体は速い情報伝達を担い、シナプス上のAMPA受容体の数は情報伝達の強度を調整する。NMDA受容体はカルシウム透過性を示し、カルシウム依存性酵素の活性を調節して、シナプスの形態や情報伝達の効率を修飾する。カイニン酸受容体は、前シナプスで神経伝達物質の放出を調節し、後シナプスでAMPA受容体に比べ遅い情報伝達を担う。