

動物細胞に共通する細胞内の輸送システム



研究ノート

今井 洋*, 昆 隆英**

Intracellular transport system,
that is common among animal cells including human cells.

Key Words : microtubule, dynein, structural biology

輸送システム

私たちが日々の生活を営んでいる大都市には、道路網、鉄道網、航空網、そして海運ネットワークが網の目のように張り巡らされており、必要な物資・ヒトが必要な場所に必要なタイミングで配送する「輸送とロジスティクス」を実現している。これらの輸送システムの機能が少しでも失われると、我々の日々の生活が成り立たなくなることは、多くの方が実体験として感じられていることであろう。

同様の「輸送とロジスティクス」は、私たちの体を形作っている37兆個の細胞一つひとつにとっても極めて重要である。細胞内では、生命活動の主役であるタンパク質群が、受動拡散によって、毎秒8.6mという猛スピードで動いている。しかし、受動拡散で移動できる直線距離は限定的で、例えばヒトの細胞の中でもっとも長い坐骨神経（長さ1m）では、細胞体で合成したタンパク質を神経末端まで

運んでいくのに、受動拡散では150年以上もの年月を必要とするのである¹⁾。

私たち動物は、進化の過程で、この長距離輸送の問題にうまく対処する術を獲得してきた。それが「細胞内輸送システム」である。輸送システムのわずかな欠陥が、アルツハイマー病・ハンチントン病・パーキンソン病などの重篤な神経変性疾患と深く関連すると考えられていることから、その生理的重要性をうかがい知ることができるだろう。本稿では、細胞内の長距離輸送に特に重要な微小管モーター系について概説する。

細胞の中の「道」としての細胞骨格「微小管」

細胞内での長距離物質輸送は、細胞内に張り巡らされた「道」である「微小管」に沿って行われる。微小管は、 α -チューブリン/ β -チューブリンヘテロ二量体が基本単位となっていて、これらが直径約25nmの筒状に配置されることで形成される。微小管には極性があり、細胞内では多くの場合、核周辺部にマイナス端（ α -チューブリン端）が、細胞周辺部にプラス端（ β -チューブリン端）が配置される。この特有の配置により、微小管は細胞中心部から周辺部に向かう長さ数 μm に及ぶ細胞内の道として機能する²⁾ (図1)。

細胞の中の「道」を歩くタンパク質「ダイニン」

微小管に沿って細胞内物質輸送を実際に駆動しているのは、キネシンとダイニンと呼ばれる2種類のモータータンパク質複合体である。キネシンは、主に微小管プラス端向きの歩行運動を行うモーターである。ヒトの細胞は、45種類ものキネシンを有しており、各々が特定の積荷輸送に特化している。対照的に、ダイニンは、微小管マイナス端方向の歩行運動を行うモーターであり、ヒトの細胞内では、ただ

* Hiroshi IMAI

1974年3月生まれ
東京大学大学院 理学系研究科生物科学
専攻博士課程修了 (2003年)
現在、大阪大学大学院
理学系研究科 生物科学専攻 助教
博士(理学) 構造生物学・生理学
TEL : 06-6850-5435
E-mail : hiroshi.imai@bio.sci.osaka-u.ac.jp



** Takahide KON

1970年5月生まれ
東京大学大学院 総合文化研究科博士課程
修了 (2000年)
現在、大阪大学大学院
理学系研究科 生物科学専攻 教授
博士(学術) 生物物理学・構造生物学
TEL : 06-6850-5435
E-mail : takahide.kon@bio.sci.osaka-u.ac.jp



1種類のダイニン分子が多種多様なマイナス端方向の細胞内輸送を一手に担っている²⁾ (図1)。

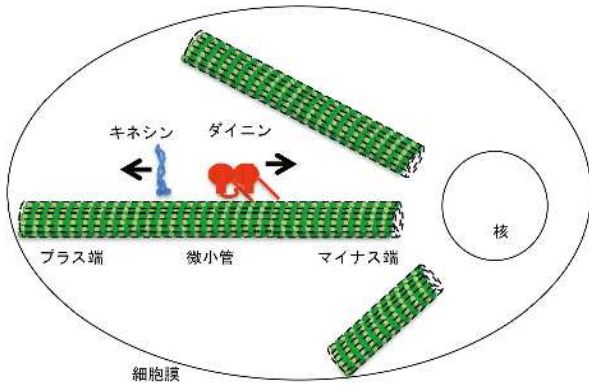


図1. 動物細胞中の微小管とモータータンパク質の模式図。核の周辺に、中心体があり、そこを起点に微小管が細胞周辺部へと伸びている。多くの微小管の極性は、マイナス端が核周辺部にあり、プラス端が細胞周辺部にある。タンパク質で出来ているモーターであるダイニンは、微小管のマイナス端に向けて微小管上を歩く。一方、キネシンは微小管のプラス端に向けて、微小管上を歩く。

ダイニンがどのような仕組みで力を発生し、どのような仕組みで微小管上を歩行運動するかは、長年の謎であった。私たちの研究グループでは、この重要課題にタンパク質X線結晶学の手法で取り組み、約8年間の歳月をかけることで、ダイニン中核領域の原子構造決定に初めて成功した³⁾ (図2)。ダイニンは、総分子質量150万に及ぶ巨大タンパク質複合体であり、構造的柔軟性が高い分子でもあるため、従来、その構造解析は極めて困難であるとされてきた。私たちは、遺伝子組換えダイニン大量発現・精製系の世界に先駆けた開発、結晶化条件・結晶化後処理条件の徹底的な検討、そして大型放射光施設における回折データ収集法の最適化などを追求することで、なんとかゴールにたどり着くことができた。私たちが明らかにしたダイニン中核領域の結晶構造³⁾は力発生後のものであるが、ほぼ同時期に、英国MRCのグループから力発生前の構造が報告され⁴⁾、二つの構造を併せることでダイニンがATPを利用して力を発生する構造変化の詳細が初めて明らかとなった。

ダイニンが微小管の上を実際に歩いている時の構造

次の疑問は、ダイニンが微小管の上で歩いているときの構造である。ダイニンは、二量体として微小

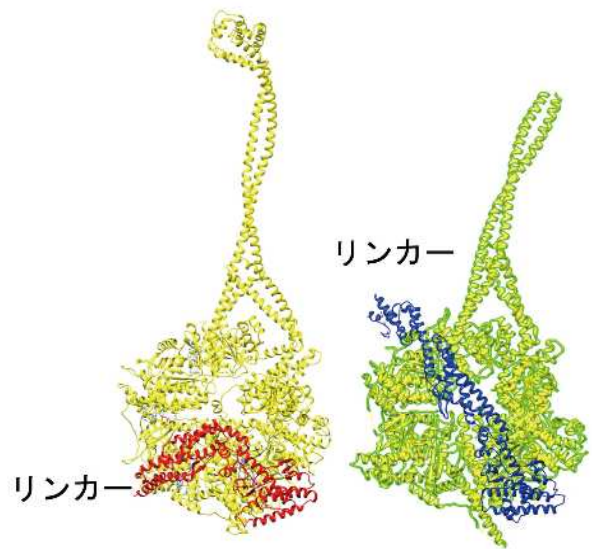


図2. ダイニンのX線結晶構造解析で得られた2種類の構造。左が力発生前の構造で、右が力発生後の構造である。左の図の赤色した部位と右の図の青で示した部位が、リンカーと呼ばれる構造である。この左図から右図へのリンカーの動きがダイニンのヌクレオチド依存的な構造変化であり、微小管の上を歩行するときの原動力を生み出していると考えられている。左、PDB 4RH7。右、PDB 3VKG。UCSF Chimera⁶⁾を利用して、原子座標モデルを表示した。

管上を歩行運動することが、主として1分子計測法により示されてきたが、その構造基盤は全く不明であった。

では、どのようにしてその構造を調べるかであるが、これまで私たちが用いてきたX線結晶構造解析法はこの目的には適さない。タンパク質の結晶を得るには、その化学・構造状態を1つに定める必要がある。しかし、微小管上のダイニンは、様々な化学・構造状態間を遷移しながら力を発生し、ダイナミックに歩いているため、それを結晶化することは不可能である。そこで、溶液中の構造を急速凍結によりほぼ保持することができるクライオ（低温）電子顕微鏡法を用いることにした。この手法の強みは、構造の多様性があっても、画像を分類することで構造解析することが可能な点である。実際、この手法により数多くのタンパク質の構造が原子分解能で解明されている。

私たちは、まず二量体ダイニンを調製し、ATP存在下で微小管上を歩行運動する条件を整えた。次に、この状態のまま急速凍結し透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、微小管上を歩行しているダイニン分子の多様な構造を直接捉えることに初めて成

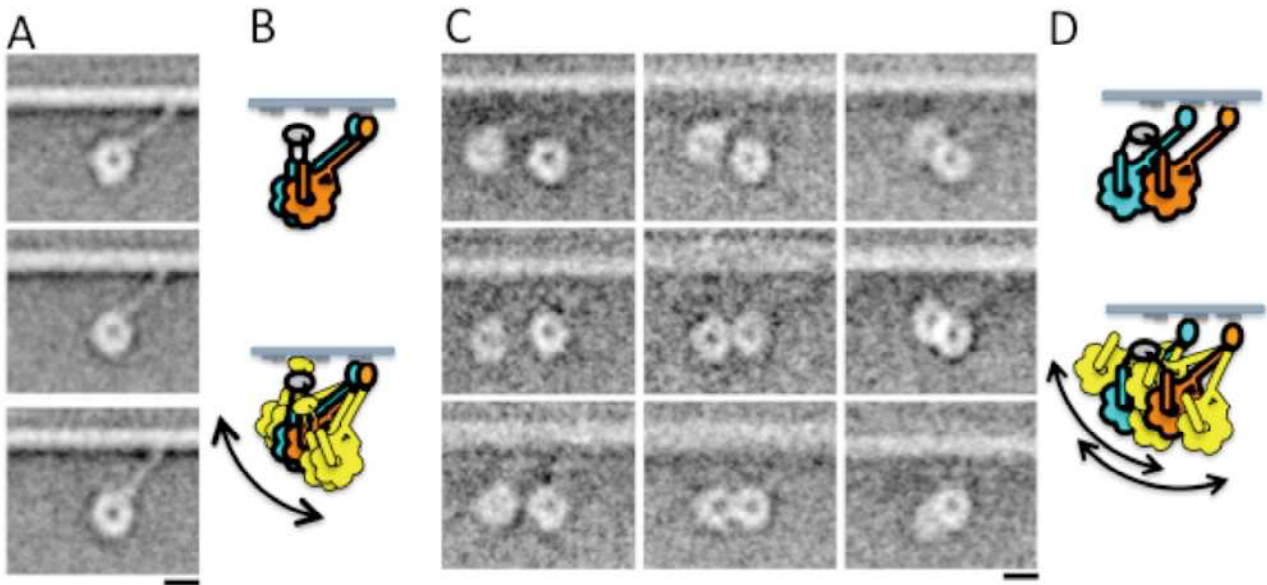


図3. ATPを加水分解しながら微小管の上を歩くダイニンのクライオ電子顕微鏡写真と模式図。
 A. 二量体ダイニンをヒトの二足歩行に例えると、2本の足を真横に揃えた構造。これらはクライオ電子顕微鏡写真を画像処理して得られた2次元平均像である。
 B. Aの構造の模式図。上部の水平方向の線は、微小管の端を示す。その微小管から下駄の歯のように小さく飛び出した部分は、ダイニンの微小管結合部位を示す。上段の図は、結合状態の一例を示す。下段では、微小管に結合したまま大きく揺らいでいる様子を示す。
 C. Aと同様に二量体ダイニンをヒトの二足歩行に例えると、2本の足を開いている構造。これらは、クライオ電子顕微鏡写真を画像処理して得られた2次元平均像である。
 D. Cの構造の模式図。上段の図は、結合状態の一例を、下段は微小管に結合した状態で大きく揺らいでいる様子を示す。AとCのスケールバーは、10 nmを示す。

功した⁵⁾。

得られた電子顕微鏡像を分類した結果、ダイニンは歩行中に二つの主要な中間状態を取ることが明らかになった。二量体ダイニンの歩行をヒトの二足歩行に例えると、二本の足を真横に揃えた構造と、二本の足を開いている構造である(図3)。この二つの構造の存在比率はほぼ1対1であり、ダイニンはこれらの構造を交互に取りながら微小管上を歩行運動すると推測された。さらに興味深いことに、個々の足は硬直した構造ではなく、微小管の直径に相当する20 nmもの構造的ゆらぎを示しながらも、確実に微小管マイナス端側に歩行運動することも明らかになった(図3)。以上から、私たちは、ダイニンが微小管上をどのように歩くかについて、低分解能ながらも、構造を明らかにすることができ、ダイニンが実際に細胞内輸送を行っている構造の解明への第一歩を踏み出すことができた。

今後の研究の方向性

クライオ(低温)電子顕微鏡法は、昨年ノーベル化

学賞が授与された手法であり、2014年以降に電子検出器の大幅な改良により電子を直接検出できるようになっている。その結果、原子分解能の解像度を得ることが従来よりもはるかに容易になった。私たちが今回得た構造は、ダイニンの歩行機構を知る上で大きな進展であったが、その分解能は原子レベルからはまだ程遠いのが現状である。今後は、電子直接検出器を利用して、原子分解能を目指して歩行メカニズムの知見を得たいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、科学研究費補助金、先端バイオイメージング支援プラットフォーム(ABiS)、文部科学省「ナノテクノロジープラットフォーム」の助成により行われたものである。また、栗栖源嗣博士(大阪大学・蛋白質研究所)、光岡薫博士(大阪大学・超高压電子顕微鏡センター)をはじめとする共同研究者の方々に深く感謝申し上げる。

参考文献

- 1) J. Howard. 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- 2) B. Alberts *et al.*, 2013. *Essential Cell Biology*. 4th edition. W.W. Norton&Company. New York.
- 3) T. Kon *et al.*, 2012. The 2.8Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature* **484**, 345-350.
- 4) H. Schmidt *et al.*, 2015. Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke. *Nature* **518**, 435-438.
- 5) H. Imai *et al.*, 2015. Direct observation shows superposition and large scale flexibility within cytoplasmic dynein motors moving along microtubules. *Nat. Commun.* **6**, 8179.
- 6) E.F. Petersen *et al.*, 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612.

