「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」
平成14年度採択研究代表者

神谷　律

（東京大学大学院理学系研究科　教授）

「振動するバイオナノマシンの原理と構築」

1. 研究実施の概要

真核生物の鞭毛・繊毛の運動は微小管とモーター蛋白質ダイニンの間の滑り運動によって生じるが、屈曲波が形成される機構はまだわかっていない。重要であると考えられるのは、ダイニンの特殊な性質と、鞭毛内部の運動装置 −軸糸− の精巧な構造である。本研究では、モーター蛋白質が滑り運動を発生する機構から, 軸糸が波動運動を発生する機構までを、解析的方法とともに再構成・人工的合成の方法を用いて理解しようとするものである。

まず、巨大で複雑な分子構造をもつダイニンがどのような機構で力発生をするかを明らかにするために、組換えダイニンを発現するシステムを確立し、その運動活性を調べることが必要である。これまでに、運動活性を維持した細胞質ダイニンの発現系を確立し、組換え体を作成してその機能解析を進めてきた。また、ダイニン運動活性を直接制御する因子についても明らかにしてきた。このようにダイニンの分子機構の詳細を明らかにするツールがそろってきたので、今後は、こうしたツールを使って、ダイニンATP加水分解の各ステップを光学的に捉え、そのステップに対応した構造変化の詳細を明らかにしていく。さらに、軸糸ダイニンの発現も試み、ダイニンの機能的性質をその分子構造との関連において理解するとともに、ダイニン自体が振動的運動を発生する可能性を探る。

同時に、運動異常突然変異株の鞭毛構造と運動性を解析し、ダイニンなど多数の軸糸構成蛋白質が波動発生に果たす役割を解明する。その際、軸糸構造が形成される機構そのものも研究の対象とする。同時に、人為的に解体した軸糸における運動解析にも取り組む。昨年度の研究では、解体した軸糸において２本の周辺微小管だけで振動的運動が発生することが判明した。今後、単離したダイニンと微小管に様々な微小管架橋蛋白質を組み合わせることによって、組織化された運動性の発生をめざす。

本研究は、単に鞭毛繊毛運動機構の理解というだけでなく、高次機能複合体の集合機構や、振動現象の発生機構の理解の基礎を提供するものである。また、未解明の部分が多いダイニンの動作機構の理解にも大きく貢献することが期待される。将来、振動するバイオナノマシンが完成すれば、ナノテクノロジー分野におけるアクチュエーターとして、広い応用が考えられる。

2.研究実施内容

軸糸構築グループ

２本の微小管による振動運動の解析

鞭毛軸糸は９本の周辺微小管と２本の中心対微小管から構成される。微小管とダイニンから波動運動を発生させる研究の基礎として、クラミドモナスの部分分解した鞭毛軸糸中の微小管の運動性を高速度ビデオシステムによって解析した。その結果、２本の周辺微小管がATP存在下で新しいタイプの周期的運動を発生することが見いだされた。この観察は鞭毛の波動運動発生機構のエッセンスが微小管とダイニンそのものに潜んでいることを示すものである。現象の解析から、ダイニンの力発生過程が,ダイニン自体に作用する力によって敏感に影響されること、すなわち、力発生過程が一種のフィードバックループにくみこまれていることが波動発生機構の基礎であることが強く示唆された。この研究結果から、振動的運動を発生する人工的バイオマシンの作製の鍵は、微小管とダイニンを適当な空間配置におくことにあると考えられる。

鞭毛軸糸構築に関わる新規蛋白質の同定

軸糸の周辺微小管上にはダイニン外腕と多種の内腕ダイニンがそれぞれ一定間隔で配列している。そのような規則的配列のしくみを理解することは、振動する人工装置を作成する上でも、バイオナノマシン形成機構一般の理解の上でも重要である。我々は以前、外腕の微小管上への規則的結合に重要な役割を果たすと考えられる複合体を同定し、それが周期性発生の基礎であることを示した。今回、同様に内腕の結合に関与する蛋白質を同定する試みを行い、分子量58kの新規蛋白質が特定のダイニン内腕分子種の微小管への結合に重要であることを見いだした。この蛋白質のcDNAを解析したところ、以前ほかの生物の鞭毛繊毛において発見されていた蛋白質テクチンと相同の配列を持つことがわかった。他の生物のテクチンは軸糸微小管の構築に必須であると考えられているが、クラミドモナスのこの蛋白質は、その量が正常の１／１０以下になっても軸糸構造が正常に保たれることなど、他の生物のテクチンとは大きく性質が異なることが判明した。これらの結果は、ダイニン内腕の微小管への結合機構の解明に重要であるとともに、軸糸微小管構築におけるテクチンの役割について再考を迫るものである。

鞭毛基部体(basal body)構成蛋白質Bld10pの研究

真核生物鞭毛・繊毛の構築機構における謎の一つは、９本の周辺微小管が環状に配列した構造ができる仕組みである。この対称性は、鞭毛基部体（基底小体）の構造に由来する。その形成機構は現在の細胞生物学における大問題の一つとして、多数の研究者によって追及されているが、まだ全く未解明であると言ってよい。約２００種あると考えられる構成蛋白質のうち、同定されたものは数種に過ぎない。我々は数年前、基部体がほぼ完全に欠失していながら致死にならないクラミドモナス変異株*bld10*を単離し,その変異遺伝子がコードする蛋白質が基部体のカートホイール構造に局在することを示した。カートホイール

は基部体形成過程の最初に現れる９回対称性の構造である。今年度、その蛋白質の性質を明らかにする目的で、cDNAの単離、培養細胞内発現、cDNAによる変異形質の救済、などの実験を行った。その結果、この蛋白質は分子の両端が欠失しても機能できること、基部体の状態によって鞭毛全体の運動が影響を受けること、などの意外な結果が得られた。今後、この蛋白質を手がかりにして基部体構築の初期過程を追及するとともに、in vitroの再構成実験にも着手する予定である。

機能素子グループ

細胞質ダイニン発現系の確立

細胞性粘菌の細胞質ダイニン遺伝子を細胞性粘菌自身で発現させるという系で、すべり運動活性を維持した組換えダイニンを発現させることを世界に先駆けて成功した。この系を用いて、すべり運動活性、微小管で活性化されるATP加水分解活性を測定したところ、微小管すべり運動は1.2 µm/sec、微小管で活性化されるATPase活性は120 s^{-1}となった。

最小モータードメインの同定

細胞質ダイニンをN末端あるいはC末端から削っていってどこまですべり運動活性を維持するか調べ、モーター活性をもつ最小ドメインを同定した。この結果、N末端から160kDa削った380kDa断片が最小モータードメインであることが分かった。これ以上N末端から削り込んでも、C末端から削り込んでも、モーター活性は失われた。

細胞質ダイニンの４つのATP結合・加水分解活性部位の機能解析

細胞質ダイニンはAAAスーパーファミリーに属し、他のAAAファミリータンパク質同様に6個のAAAもモジュールがリング構造を形成している。このうち4個のAAAモジュールにATP結合・加水分解モチーフが存在する。これら複数のATP結合・加水分解モチーフが運動にはたす機能を解明するため、まず、AAAモジュールを単独で、あるいは複数の連結体として発現したフラグメントのATPase活性を測定した。その結果、（１）１番目のモチーフと３番目のモチーフは加水分解活性をもつこと、（２）その活性のためにはそれぞれ次のモジュールの存在が必要であり、特にSRCというモチーフが活性に関与していること、が明らかになった。次に、それぞれのモチーフを部位特異的に破壊した組換えダイニンを構築し、すべり運動、ATPase活性にもたらす影響を調べた。その結果、（１）1番目のモチーフにおけるATP加水分解がすべり運動に必須である、（２）３、４番目のモチーフはすべり運動に必須ではないが、１番目のモチーフでのATP加水分解ステップに大きな影響を与える、（３）2番目のモチーフはなくても、すべり運動に大きな影響を与えない、ということが明らかとなった。このデータは、ダイニンの複数のATP結合・加水分解部位の間の相互作用を生化学的にはじめて明らかにしたものである。

ダイニンと微小管の相互作用

ダイニンはモータードメインから突き出したストーク部位で微小管と結合する。モータードメインがストーク先端における微小管との親和性をストークのコイルドコイル領域を通じてどのようにコントロールするのかを明らかにするために、ストーク部位を発現し、その微小管との相互作用を検討した。その結果、コイルドコイル領域がヘリックス構造をとる時ととらない時で、微小管との親和性が異なることがわかった。

人工運動系グループ

生体の運動機構を本当に理解するには、それを人工的に実現することが必要である。生体の運動は，ATPなどの加水分解によって行われるが，このエネルギーが，機械的エネルギーに変換される際に，アクチンや微小管の揺らぎが増幅され、その振動を介して発生するという仮説を検証する目的で実験を行った。

ナノゴールド修飾アクチンのレーザー照射によるすべり運動発生

実験では、骨格筋から精製したアクチン繊維を用いた。アクチン繊維のような繊維状タンパク質の高濃度溶液では、繊維がネットワークを作り、分子の長さ方向に限定された固有の熱運動（レプテーション）を示す。我々は、特定の繊維だけの熱揺らぎを人為的に増大させるために、アクチン分子にナノゴールド（直径1.4nm）を共有結合させたのちに、未標識のアクチン分子と１：１の共重合体を作った。これを未標識のアクチンだけからなるネットワーク内に混合し、顕微鏡下で赤外レーザー光を照射した。この条件では金微粒子が選択的に加熱され、それを結合した繊維の揺らぎが増大する。繊維は常温では等方的な往復運動を示すが、このように選択的に加熱された状態では、運動に異方性が現れることを発見した。この運動の異方性は，レーザーの照射を周期的に行うことで著しく増強され，その最大速度は約6.0 μm/sであった。一様な照射ではなく，周期的なエネルギー注入が効果的であることは、大変興味深い。

これは、生体高分子の滑り運動を化学エネルギーなしに実現することに成功したはじめての実験である。

3.研究実施体制

軸糸構築グループ

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻　（神谷　律）

研究項目：突然変異軸糸における鞭毛軸糸構築と運動性の解析
単純化軸糸における振動・波動運動の解析
軸糸ダイニン・微小管複合体を用いた振動的運動の再構築

機能素子グループ

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻　（豊島陽子）

研究実施項目：組み換えダイニン重鎖の発現

ダイニン・微小管の相互作用とin vitro運動の解析

人工運動系グループ

長岡技術科学大学工学部（本多　元）

研究実施項目：ナノゴールド修飾アクチンのレーザー照射によるすべり運動発生

4.主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文発表

○ Padma, P., Satouh, Y., Wakabayashi, K., Hozumi, A., Ushimaru, Y., Kamiya, R., and Inaba, K. (2003). Identification of a novel leucine-rich repeat protein as a component of flagellar radial spoke in the ascidian *Ciona intestinalis*. Mol. Biol. Cell 14, 774-785.

○ Ikeda, K., Brown, J., Yagi, T., Norrander, J., Hirono, M., Eccleston, E., Kamiya, R., and Linck, R. (2003). Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar A-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules. J. Biol. Chem. 278, 7725-7734.

○ Hirono, M., Uryu, S., Ohara. A., Kato-Minoura, T., and Kamiya, R. (2003). Expression of conventional and unconventional actins in *Chlamydomonas reinhardtii* upon deflagellation and sexual adhesion. Euk. Cell 2, 486-493.

○ Casey, D.M., Inaba, K., Pazour, G.J., Takada, S., Wakabayashi, K., Wilkerson, C.J., Kamiya, R., and Witman, G.B. (2003). DC3, the 21-kD subunit of the outer dynein arm-docking complex (ODA-DC), is a novel EF-hand protein important for assembly of both the outer arm and the ODA-DC. Mol. Biol. Cell 14, 3650-3663.

○ Casey, D. M., Yagi , T., Kamiya, R., and Witman, G. B. (2003). DC3, the smallest subunit of the *Chlamydomonas* flagellar outer dynein arm-docking complex, is a redox-sensitive calcium-binding protein. J. Biol. Chem. 278, 42652-42659.

○ Shiroguchi, K., Ohsugi, M., Edamatsu, M., Yamamoto, T., and Toyoshima,Y.Yoko (2003). The second microtubule-binding site of monomeric Kid enhances the microtubule affinity. J. Biol. Chem. 278, 22460-22465.

○ Ohsuigi, M., Tokai-Nishizumi, N., Siroguchi, K., Toyoshima,Y.Yoko, Inoue, J., I. and Yamamoto, T. (2003). Cdc2-mediated phosphrylation of Kid controls its distribution to spindle and chromosomes. EMBO J. 22, 2091-2103.

○ Ando,T., Kodera,N., Naito, Y., Kinoshita, T., Furuta, K. & Toyoshima, Y.,Yoko (2003). A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. Chem. Phys. Chem., 4, 1196-1202.

○ Toba, S., Gibson, T.M., Shiroguchi, K., Toyoshima, Y.Y., Asai, D.J. (2004). Properties of the full-length heavy chains of *Tetrahymena* ciliary outer arm dynein separated by urea treatment. Cell Motil. Cytoskeleton 58, 30-38.

○ Nishiura, M., Kon, T., Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima,Y. Yoko, and Sutoh, K. (2004). A single-headed recombinant fragment of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of Microtubules. J. Biol. Chem. 279; 22799-22802.

○ Iwai, S., Ishiji, A., Mabuchi, I., and Sutoh.K. (2004). A novel actin-bundling kinesin-related protein from *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 279: 4696-4704.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：０件（CREST研究期間累積件数：０件）