

「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十分整備されたので、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する実験を開始した。すでに興味深い様々な知見を得ている。今後は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、軸糸の規則的構造は運動発生機構にとって本質的であると考えられるので、そのような構造が形成される機構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。昨年度までの研究では、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。

これらのダイニン運動系研究と同時に、生体運動発生機構そのものを問い直す目的で、熱エネルギーによって駆動される人工的運動発生実験を行う。そのような実験は本多らによって予備的な成功を収めており、今後の生体運動研究全体にインパクトのある重要課題であると考えられるからである。

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

#### 単離ダイニンと微小管による運動系の構築

振動的運動を発生する人工システムの構築をめざして、クラミドモナス軸糸から単離したダイニンと微小管が形成する束がATP存在下で示す運動を観察・解析する研究を開始した。以前、微小管に外腕ダイニンを加えると束が形成され、ATP添加によって解離することは報告されていたが、解離の過程で微小管の運動が起こるかどうかは知られていなかった。今回、その過程を検討するために、ケージド化合物を用い、光照射によって瞬間的にATP濃度を上昇させる方法により、束中の微小管が多様な運動を行うことを見いだした。単純な滑り運動のほか、周期的に屈曲が伝播する運動も観察された。今後、軸糸断片などから成長させた微小管を用い、架橋蛋白質を導入することによって、振動的運動を高頻度で発生させる試みを行う予定である。

#### 鞭毛軸糸の規則的構築に関わる新規蛋白質の同定

軸糸中の9本の周辺微小管上には、ダイニン内腕・外腕などの構造体が96nmを基本周期として規則正しく配列している。また、各微小管は弾性蛋白質で互いに一定間隔で結合し、全体として精密機械のように整然とした構造を持つ。そのような規則的構築機構を理解することは、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。これまで我々は、ダイニンの周期的結合と微小管同士の結合の機構解明のために、外腕と内腕を微小管上に結合させる蛋白質と微小管間架橋蛋白質を検索する研究を行ってきた。その結果、昨年までに、軸糸の周期構造発生に重要であると考えられている蛋白質テクチンと、新規蛋白質Rib72をクラミドモナス軸糸で同定することに成功した。今年度は、さらにRib72と結合する蛋白質を検索して、2つの新規蛋白質を発見した。その一つは、ヒトのpacrgと呼ばれる蛋白質と相同性があるが、興味深いことに、最近この遺伝子に変異があるマウスでは精子形成が異常になることが報告された。したがって、この蛋白質は、クラミドモナスから哺乳類にいたる広い範囲の鞭毛繊毛で保存され、軸糸形成に重要な役割を果たしていることが予測される。現在はこの蛋白質の機能解明をめざした実験を行っている。その他、微小管間架橋蛋白質についても新たな視点から研究を行い、候補蛋白質4種の一次構造を決定した。現在、それぞれの局在を検討中である。

## 鞭毛基部体(basal body)構成蛋白質Bld10pの自己集合

真核生物鞭毛・繊毛中で9本の周辺微小管が環状に配列した構造を持つのは、鞭毛基部体(基底小体)が9回対称の構造を持つからであるが、この基部体の構造形成機構は現在のところ全くわかっていない。我々は数年前、基部体がほぼ完全に欠失しているが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を単離して培養細胞内発現し、純化した蛋白質を得て、*in vitro*の挙動を調べた。その結果、この蛋白質はコイルドコイル構造を持つ2量体として存在し、室温に放置すると自動的に繊維状集合体を形成することがわかった。鞭毛基部体のカートホイール構造の一部が試験管内で再構成されたものと考えられる。今後この繊維構造をもとにして、基部体構築の初期過程をさらに明らかにしたいと考えている。

## 機能素子グループ

### 細胞質ダイニン発現系による機能解析

これまでに細胞性粘菌を発現系として、細胞質ダイニンの組換え体作成を確立した(Nishiura et al., J. Biol. Chem. 279, 22799 (2004))。ダイニンモータードメインは6個のAAA+モジュールからなるが、そのうち4箇所にはATP結合・加水分解部位が存在しており、これら複数の部位へのATP結合と加水分解がうまく協調して、微小管すべり運動が生じると考えられている。こうした部位間の共役の実態を、ATP結合あるいはATP加水分解を特異的に止める変異を各部位に導入することで明らかにした(Kon et al., Biochemistry 43, 11266 (2004))。この結果、AAA1とAAA3モジュールのATP加水分解サイクルの緊密な共役がダイニンの力発生に必須であることがわかった。また、AAA1モジュールでのATP加水分解で放出される自由エネルギーによってすべり運動が駆動されることもわかった。さらに、GFPとその変異体BFPをもちいた蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法をもちいた実験で、ATP加水分解サイクルが1回まわるごとにダイニンモータードメインの尾部領域が一回スイングすることがわかった。また、ATP加水分解サイクルの各ステップ(化学的過程)と尾部領域がスイングするステップ(力学的過程)の間に関係をつけることもできた。この結果は、負染色電子顕微鏡像の解析から提唱されたダイニンの“パワーストローク”説に合致するものであった。

### 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。このストーク部位を大腸菌で発現、精製し、微小管との複合体を形成し、電子顕微鏡による3次元再構成を行なった。その結果、微小管上のストークの結合部位は、キネシンの結合部位とオーバーラップしており、MAPsが結合している領域とは区別される部位であることが明らかになった(Mizuno et al., EMBO J. 23, 2549(2004))。この結果は、微小管はモータ

一分子とそれ以外の分子を区別して結合し、MAPsがモーター活性を阻害しないことを保障すると同時に、モーター結合部位は運動活性を発揮するために何らかの積極的な役割を持つことを示唆している。

ダイニン機能を制御する蛋白質としてLIS1とNUDELが知られているが、これらはどちらも細胞内で欠損するとダイニンが機能しなくなることから、ダイニンのモーター活性に必須の因子と考えられてきた。今回、これらの蛋白質を精製し、*in vitro*でダイニン motility assay を行なったところ、LIS1はダイニンと微小管を結合させたまま運動を阻害すること、NUDELはダイニンと微小管の結合を阻害し相互作用できなくしてしまうことが観察され、これらの制御蛋白質はダイニンと微小管の相互作用に阻害効果があることがわかった。さらに興味深いことに、LIS1とNUDELの両者がダイニンに結合した場合には、運動活性が回復し、ダイニンと微小管の相互作用が元に戻るということが明らかになった。今後、その分子メカニズムを解明する予定である。

#### 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

アクチン繊維に、1.4 nmの金属微粒子（ナノゴールド）を化学結合させ、赤外レーザー光を照射すると、アクチン繊維はその長さに沿った一方向運動を示した。この運動の速度は骨格筋の収縮速度に匹敵する。この新しい人工運動系の特性を計測するため、観察系の高度化と簡素化を行った。観察された運動は、純粋に人工的に生体運動を実現した最初の例であると考えられる。このエネルギー拡散を伴う人工滑り運動は、蛋白質からなる生体ナノマシンに共通する動作機構により実現している可能性がある。

### 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

振動運動の基礎となる軸糸構築の再構成

#### 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：熱揺らぎによるアクチン繊維の運動発生

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- Yanagisawa, H. and Kamiya, R. (2004). A tektin homologue is decreased in *Chlamydomonas* mutants lacking an axonemal inner-arm dynein. *Mol. Biol. Cell* 15, 2105-2115.
- Kikushima, K., Yagi, T. and Kamiya, R. (2004). Slow ADP-dependent acceleration of microtubule translocation produced by an axonemal dynein. *FEBS Lett.* 563, 119-122.
- Blomberg-Wirschell, M., Pazour, G., Yoda, A., Hirono, M., Kamiya, R., and Witman, G. (2004). Oda5p, a novel axonemal protein required for assembly of the outer dynein arm and an associated adenylate kinase. *Mol. Biol. Cell* 15, 2729-2741.
- Matsuura, K., Lefebvre, P.A., Kamiya, R. and Hirono, M. (2004). Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first nine-fold symmetrical structure appearing during assembly. *J. Cell Biol.* 165, 663-671.
- Watanabe, Y., Hayashi, M., Yagi, T., and Kamiya, R. (2004). Turnover of actin in *Chlamydomonas* flagella detected by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Cell Struct. Funct.* 29, 67-72.
- Ikeda, T., Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M. K., Hirono, M., and Kamiya, R. (2005). The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett.* 579, 819-822.
- Okita, N., Isogai, N., Hirono, M., Kamiya, R., and Yoshimura, K. (2005). Phototactic activity in *Chlamydomonas* “non-phototactic” mutants deficient in Ca<sup>2+</sup>-dependent control of flagellar dominance or in inner arm dynein. *J. Cell Sci.* 118, 529-537.
- 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, N., Kon, T., Shiroguchi, K., Ohkura, R., Shima, T., Toyoshima, Y.Y. & 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.
- Mizuno, N., Toba, S., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Hirokawa, N. Toyoshima, Y. Y., Kikkawa, M. (2004). Dynein and kinesin share an overlapping microtubule-binding site. *EMBO J.* 23, 2459-2467.
- Toba, S. & Toyoshima, Y. Y. (2004). Dissociation of double-headed cytoplasmic dynein into single-headed species and its motile properties. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58. 281-289.
- Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y., Sutoh, K. (2004). Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry* 43, 11266-11274.
- Takahashi, Y., Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y. (2004). Multiple ATP-hydrolyzing sites that potentially function in cytoplasmic dynein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 12865-12869.
- Hatori K, Tamura T, Kawano K, Tamura M, Honda H. (2004). Significance of kinetic degrees of freedom in operation of the actomyosin motor. *Biosystems* 78, 149-53.