

「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、規則正しい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て、その運動活性を調べる研究を行う。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の開発に成功し、組換え体を作成してその機能解析を進めてきた。最近、その結果、ダイニン尾部が AAA リングに対してスイングするというパワーストロックモデルを支持する結果を得た。1 分子ダイニンの運動計測より、ダイニンのプロセッシビティ、ステップサイズ、最大力などがキネシンと同様であることがわかり、双頭を使って hand-over-hand のように運動する機構が示唆された。ダイニンによる力発生の分子機構を明らかにするには、最終的にはその分子構造を明らかにしなければならない。このために、ダイニンストロクドメインとモータードメインの結晶解析が必須であり、現在、結晶化と構造解析を進めている。

もう一つの大きな目的は、ダイニン運動機構の研究と並行して、軸糸の波動運動機構を研究することである。その目的のために、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。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。これまでの研究では、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、単に鞭毛纖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

1) 単離ダイニンと微小管による運動系の構築

昨年度までの研究の継続として、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・解析する研究を行った。すでにケージド化合物によって瞬間的に ATP 濃度を上昇させる方法により、束中の微小管が単純な滑り運動や周期的な屈曲の伝播を行う現象を観察していたが、今年度は軸糸断片から成長させた微小管を用いることによって、高頻度で振動的運動を発生させることに成功した。この運動は分解軸糸中の微小管の運動に類似しており、軸糸運動の人工的再現に大きく近づいたと考えられる。

2) 鞭毛軸糸の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 9.6 nm 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造の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、新規蛋白質 Rib72、さらに Rib72 と結合する Pacrg と EF39 と呼ばれる蛋白質を同定した。また、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 種を得た。今年度は、そのうちの 2 つ、120 kDa 蛋白質と 187 kDa 蛋白質について抗体作製と局在決定を行って、次のような結果を得た。まず、間接蛍光観察により 120 kDa 蛋白質は鞭毛軸糸の根本部分約 2 μ m を除く部分に局在し、一方、187 kDa 蛋白質は基部の 1 μ m 部分にのみ局在することが判明した。すなわちこれらの蛋白質の局在から、鞭毛軸糸は構造的に根本から 1 μ m、1–2 μ m、2 μ m から先端まで、の 3 つのセグメントに分かれていることが示唆される。このような長さ方向の不均一性が観察されたのはこれが初めてであり、鞭毛軸糸の構造と機能を理解する上で極めて重要な知見である。また、免疫電子顕微鏡法により、120 kDa 蛋白質は微小管間を結合すると思われる細い

繊維上に局在することも判明した．すなわちこの蛋白質はこれまで長く求められていた周辺微小管間を結合するネキシンリンクと呼ばれる構造を構成している可能性が大きい．今後はその機能を様々な方法で検定することをめざしたい．

3) 鞭毛基部体(basal body)構成蛋白質 Bld10p の機能

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た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、*bld10* 変異株を様々な長さの蛋白質をコードする cDNA によって形質転換し、その表現系を調べた．その結果、N末端を40%程度欠失した bld10p 蛋白質によっても変異が相補されることが判明したが、50%欠失した蛋白質では相補されず、基部体の9回対称構造が正常に保持されなくなることが明らかになった．それらの電子顕微鏡観察により、bld10p 蛋白質はカートホイール構成蛋白質というよりは、3連の微小管とカートホイールの結合に関与する蛋白質であると結論された．

機能素子グループ

1) 組換えダイニン重鎖の発現と機能解析

これまでに細胞性粘菌を発現系として、細胞質ダイニンモータードメインの組換え体作成系を確立し、これを用いて蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法により、ATP 加水分解サイクルと尾部のスイングの関係を明らかにした．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．次に、尾部や AAA リングのさまざまな位置にビオチンタグを挿入したダイニンモータードメインを作成し、このビオチンタグをガラス上に敷いたストレプトアビジンで固定して、微小管滑り運動を観察した．この結果、AAA リングやダイニン尾部の AAA リングよりの位置でモータードメインを固定してもほとんど微小管滑り運動がおこらず、尾部末端で固定したときにだけ滑り運動が見られた．このことは、ダイニン尾部が AAA リングに対してスイングしてパワーストロークが生じるというモデルとやはり一致するものであった．

2) ダイニン・微小管の相互作用と in vitro 運動の解析

ダイニンの運動特性を詳細に調べるために、ダイナクチンなどの付随物を含まず、かつ運動活性の高い細胞質ダイニンを脳組織から精製した．これをビーズに付着させ、1分子としてのダイニンの運動特性を、光ピンセットを用いたナノメートル運動計測系で調べた．その結果、ダイニンは連続運動性を有し、8 nm のステップを刻みながら微小管のマイナス端に向かって動き、最大力 7 pN を出すことが明らかになった．これらの挙動は微小管上の

動きの方向性のみが異なるだけで、キネシン 1 分子の挙動と極めて似ていた。このことは、ダイニンがキネシンと分子構造が大きく異なるにもかかわらず、キネシンと同様な hand-over-hand メカニズムで運動していることを示唆している。一方、ダイナクチンのフラグメントに蛍光色素を結合させ、無負荷でのダイニン 1 分子の運動の観察を試みたが、運動連続性は見られなかった。ダイニンは負荷をかけることによって、連続運動性を生み出している可能性が示された。この運動観察系では、ヌクレオチド状態による微小管との結合親和性の違いが明確に区別され、ADP・Pi 状態でもっとも弱く、No nucleotide, ADP の順で強くなり AMPPNP 状態が最も強いことがわかった。

さらに、ダイニン運動発生メカニズムの鍵となる、ダイニンと微小管の相互作用を明らかにするために、ダイニンの微小管結合部位であるストークのコイル部の長さの異なる一連の組換え体を作製し、微小管に対する親和性を調べた。コイル部が短いものより、コイル部が長く coiled-coil 構造をとっているものの親和性が低いことがわかり、コイル部の構造変化により微小管との結合解離を調節する可能性が示唆された。

人工運動系グループ

1) ナノゴールド修飾アクチンのレーザー照射による滑り運動の計測・解析

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。この運動がアクチン分子の特定のドメインにエネルギーを与えることで誘導されたのかどうかを調べた。アクチンの第 II ドメインに金粒子を導入した場合と、中央部の ATP 結合部位付近に導入した場合について、さまざまな条件ですべり運動の実現を試みたが、いずれの場合も有意な一方向運動は実現しなかった。第 I ドメインに導入したときのみ運動が実現したことは、このドメインがミオシン結合部位であることと深い関係があると思われる。これらの結果より、今回実現された人工すべり運動が生体内でミオシン分子モーターにより行われている運動と同種である可能性が強い。したがって、当初の予想どおり、レーザー照射により実現された人工運動は、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さらに強くなった。

2) ナノゴールド修飾フィラメントの運動発現条件の検討

この人工運動が一般的な生体内のすべり運動に共通するならば、アクチン以外のタンパク質でも同様の現象が起こることが予想される。まず微小管に対して実験を行うため、本研究室で微小管の精製を行えるようにセットアップを行った。今後レーザー照射実験を行う予定である。

3. 研究実施体制

軸系構築グループ

①研究分担グループ長：神谷 律（東京大学大学院理学系研究科、教授）

②研究項目：

- 1) 突然変異軸系における鞭毛軸系構築と運動性の解析
- 2) 単純化軸系における振動・波動運動の解析
- 3) 軸系ダイニン・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

①研究分担グループ長：豊島 陽子（東京大学大学院総合文化研究科、助教授）

②研究項目：

- 1) 組換えダイニン重鎖の発現
- 2) ダイニン・微小管相互作用と in vitro 運動の解析

「人工運動系」グループ

①研究分担グループ長：本多 元（長岡技術科学大学生物系、助教授）

②研究項目：

- 1) ナノゴールド修飾アクチンのレーザー照射による滑り運動の計測・解析
- 2) ナノゴールド修飾フィラメントの運動発現条件の検討

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- 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^{2+} -dependent control of flagellar dominance or in inner arm dynein. J. Cell Sci. 118, 529-537.
- Aoyama, S. and Kamiya, R. (2005). Cyclical interactions between two outer doublet microtubules in split flagellar axonemes. Biophys. J. 89, 3261-3268.
- Yagi, T., Minoura, I., Fujiwara, A., Saito, R., Yasunaga, T., Hirono, M. and Kamiya, R. (2005). An axonemal dynein particularly important for flagellar movement at high viscosity: implications from a new *Chlamydomonas* mutant deficient in the dynein heavy chain gene *Dhc9*. J. Biol. Chem. 280, 41412-41420.
- Yang, P., Diener, D. R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G. J., Dienes, J. M., Agrin, N.,

- King, S. M., Sale, W. S., Kamiya, R., Rosenbaum, J. R., and Witman, G. B. (2006). The proteins in radial spoke, the mechanochemical signal transducer in 9+2 cilia and flagella. *J. Cell Sci.*, 119:1165–1174.
- Kon, T., Mogami, T., Ohkura, R., Nishiura, M., Sutoh, K. ATP hydrolysis cycle-dependent tail motions in cytoplasmic dynein. *Nature Struct. Mol. Biol.* **12**, 513–519. 2005.
 - Isogawa, Y., Kon, T., Inoue, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O., Sutoh, K. The N-terminal domain of MYO18A has an ATP-insensitive actin-binding site. *Biochemistry* **44**, 6190–6196. 2005.
 - Morii, H., Shimizu, T., Mizuno, N., Edamatsu, M., Ogawa, K., Shimizu, Y., Toyoshima, Y. Y. Removal of tightly bound ADP induces distinct structural changes of the two tryptophan-containing regions of the ncd motor domain. *J. Biochem.* **138**, 95–104. 2005.
 - Toyo-oka, K., Shinji Sasaki, S., Yano, Y., Mori, D., Kobayashi, T., Toyoshima, Y. Y., Tokuoka, S. M., Ishii, S., Shimizu, T., Muramatsu, M., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. Recruitment of Katanin P60 by Phosphorylated NDEL1, a LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. *Hum Mol Genet.* **14**, 3113–3128. 2005.
 - Kobayashi, T., Shioguchi, K., Edamatsu, M., and Toyoshima Y. Y. Microtubule-binding properties of dynactin p150 expedient for dynein motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 23–28. 2006.
 - Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J., and Sutoh, K. MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **342**, 829–834. 2006.