

「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・繊毛の波動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。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。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。その結果、ダイニン尾部が頭部の 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。

軸糸波動運動が発生する機構の解明のために、不完全な構造を持つ鞭毛における運動性を解析し、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。これまでの研究により、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。また、軸糸微小管から成長させた細胞質微小管にダイニンを加えた系においても振動現象が観察されている。今後、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。さらに、ダイニンが波動を発生する機構に直接関連していると考えられる高速振動現象の機構も追及する。その目的のために、ピコメータスケールの高い精度でタンパク分子3次元動態をリアルタイム解析する装置の開発を行い、ダイニンの振動運動解析に応用する。

最後に、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新規な人工的運動発生系の解析を行う。運動中の繊維のゆらぎを解析した実験から、繊維に備わったラチェット機構によって運動が発生することが示唆されている。

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

軸系構築グループ

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、クラミドモナス軸系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。ケージド ATP を用いて、瞬時に ATP を付加する実験において、ダイニン外腕を結合した微小管同士の滑り速度が、通常の in vitro 運動実験系における速度より 2-3 倍高速になることが見出された。これまで、いくつかの研究によって、ダイニン外腕が in vitro で期待されるだけの速度の運動を発生しないことが確認され、その理由はわかっていなかったが、今回の実験は、ダイニンが微小管上に規則正しく配列することによって活性化されることが、その理由であることを示唆している。これは軸系ダイニンの動作機構理解のために、重要な知見であると考えられる。

また、内腕ダイニンを用いた in vitro 運動実験系において、ある種のダイニンが微小管を屈曲させつつ滑走を行うことを見出した。このことは、ある種のダイニンはそれ自体で微小管を屈曲させる能力を持ち、軸系の屈曲発生に直接的に働く可能性を示唆している。軸系運動機構を考える上で、この発見も重要である。

2) クラミドモナス全軸系ダイニンの遺伝子同定と、新規内腕ダイニンの発見

鞭毛・繊毛を持つほぼすべての生物は、ゲノム中に 15 種程度の軸系ダイニン重鎖遺伝子を持つが、生化学的に対応する重鎖が決定された例はごく一部にすぎない。クラミドモナスにおいては、14 種の遺伝子が知られているが、重鎖は 11 種だけしか知られておらず、また、特定のダイニン重鎖と遺伝子に対応されたものは 6 種にすぎなかった。昨年我々は、知られているすべてのダイニン重鎖の遺伝子を決定するとともに、残り 3 種の重鎖遺伝子の産物を軸系内で同定することに成功した。興味深いことに、その 3 種は軸系中にごく微量しか含まれておらず、また、抗体染色により、少なくともそのうちの 1 種が鞭毛の基部だけに局在していることが明らかになった。このように、軸系の根本にだけ特殊なダイニンがあるという知見は新しく、屈曲の形成機構との関連で興味深い。その詳細な機能は今後の課題である。

3) 鞭毛軸系の構築に関わる新規蛋白質の同定

軸系中の 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 96 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。これまで我々は軸系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, Pacrg, EF39, およびネキシン候補タンパク質である 120 kDa 蛋白質と 187 kDa 蛋白質を同定し, それぞれに対して組み換えタンパク質の発現, 抗体作製, 軸糸内局在を検定してきた. 昨年度は, 新たに NDK7 と呼ばれる新規タンパク質を同定した. それらのタンパク質同士, およびそれらと微小管との結合性を検定した結果, いくつかのタンパク質間で強い相互作用が見られた. 特に, Pacrg と NDK7 は微小管に直接結合することが明らかになった. これらの結果から, 軸糸周辺微小管の構成に関する理解は今後大きく進み, 最終的には周辺微小管の試験管内再構成も可能になると期待される.

機能素子グループ

1) ダイニンモーターのパワーストロークにおける構造変化

ダイニンモータードメインと尾部をつなぐリンカーの動きがパワーストロークとなってダイニンの動きを駆動するというモデルの当否を確かめるため, 組換え体モータードメインのさまざまな位置にビオチンタグを挿入し, これをストレプトアビジンでガラス基板上に固定した. リンカー末端近くで固定されたモータードメインは速い微小管滑りを駆動したが, リンカー末端から離れると, 滑り速度は低下し数十分の一にまでなった. このことは, リンカー末端がレバーアームのように動いているというモデルを支持している.

ダイニンモータードメインと微小管の相互作用を定量的に測定し, これが ATP 加水分解サイクルでどのように調節されているかを検討した. その結果, パワーストローク前には微小管に弱く (解離定数 \sim 50mM) 結合していたが, パワーストローク後には強く結合する (解離定数 \sim 0.2mM) ことが分かった. またこの結合の強さの変化はリンカーの動きと同様に AAA1 モジュールの ATP 加水分解と共役していることが明らかとなった.

2) ダイニンの運動に必要な微小管プロトフィラメント数

ダイニンの運動に必要な微小管の構造を限定するために, 微小管のプロトフィラメントが極性と表裏が交互に並ぶ配列をとっている Zinc シートを作製し, ダイニンによる運動の解析を行った. ダイニンは *in vitro* motility アッセイで Zinc シートを運動させることができ, その速度も微小管とは変わらなかったが, 運動の軌跡は曲折したものであった. プロトフィラメント上のダイニン結合部位 (β チューブリンの H12 領域) は Zinc シートの一端のみに露出していて, 他はプロトフィラメント間に埋もれていることから, ダイニンの運動発生にはプロトフィラメント 1 本で十分であることが明らかになった.

3) 細胞質ダイニンと軸糸ダイニンにおけるヌクレオチド依存性の相違

ダイニンのヌクレオチド感受性が細胞質ダイニンと軸糸ダイニンで異なることが示唆されてきたが, 今回, AMPPNP を使うことによりその差が明確に示された. すなわち, 軸糸ダイニンでは AMPPNP を結合すると微小管から解離した状態をとり, AMPPNP は ATP に対して拮抗阻害として働くことがわかった. 一方, 細胞質ダイニンでは, AMPPNP 存在下で微小管に強く結合し, ATP と AMPPNP の両方が存在する中では両者の量比のバランスにより ATP による運動を阻害することが明らかに

なった。ヌクレオチド結合部位のアミノ酸配列比較から、AMPPNP は軸糸ダイニン、細胞質ダイニンともに P1 ループに競合的に結合するとともに、細胞質ダイニンでは P3 ループにも結合し、その差が微小管結合に機能の差となっていることが考えられる。

人工運動系グループ

人工運動系における繊維の揺らぎ

細胞内で運動を担うタンパク質が、ATP のエネルギーを力学的エネルギーに変換する分子機構にはまだ統一的な見解がない。本研究においては、代表的な生体フィラメントであるアクチン繊維に金属微粒子(ナノゴールド)を化学的に結合させ、外部から赤外線レーザーを照射してエネルギーを与える試みを行った。その結果、レーザー光を間欠的に照射することによって人工的に滑り運動を実現することに成功した。昨年度までに、

- 1) 人工的な一方向の滑り運動が実現できること、
- 2) その方向は生体内と同じであること、
- 3) 速度は瞬間的には生理的な運動に匹敵すること、
- 4) 運動の実現にはレーザー光の間欠的な照射が必須であること

を明らかにしてきた。本年度は、この運動がどんなメカニズムで起こるかについて調べるため、おもに導入するエネルギーの量と繊維のゆらぎに着目した。この運動は間欠的に起こるが、運動発生前に繊維の運動ゆらぎが増大することがわかった。また、エネルギー量を増やすため二つのナノゴールドを結合させたところ、ゆらぎと速度がともに約 1.3 倍に増加した。この結果これにより、レーザーのエネルギーが一時的に繊維のゆらぎ運動に変換されそれが一方向に整うことで滑り運動が実現されている可能性が示唆された。この機構は従来ファインマン、大沢らによって提唱された、熱ラチェット機構に類似している。最終年度には、生理的な運動と同様な滑らかな滑り運動を実現できるシステムの構築を試みる。

分子ナノ振動解析グループ

1) 微小振動解析装置の開発と応用実験

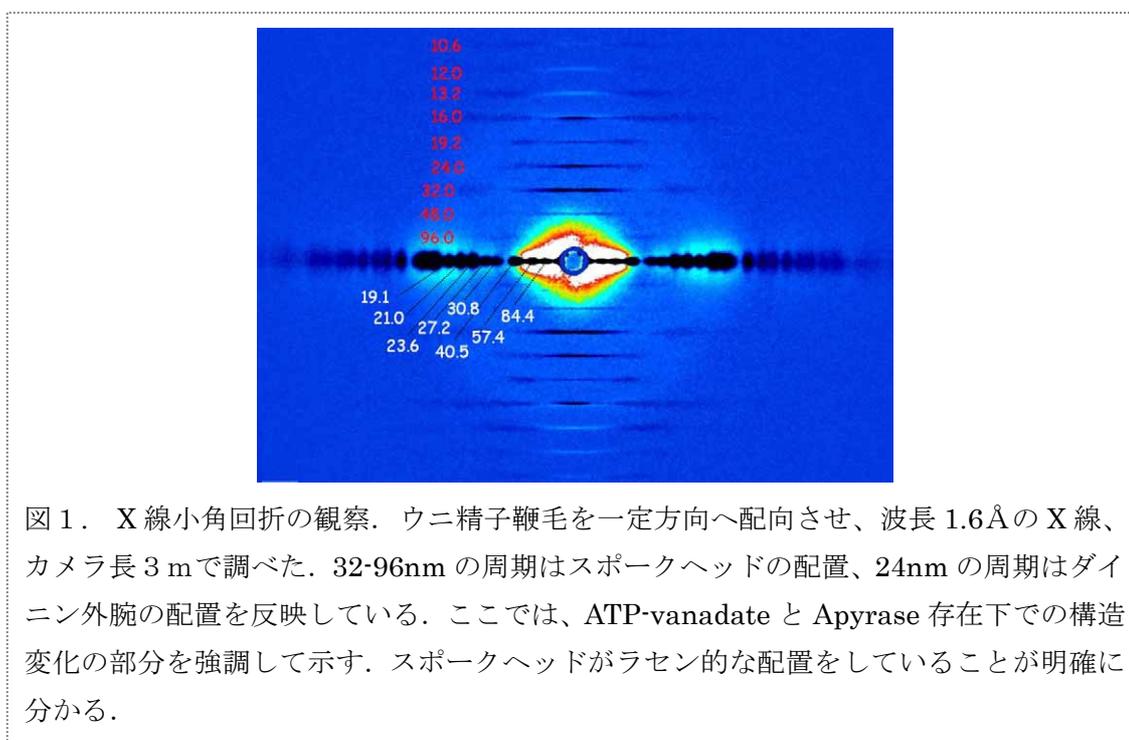
軸糸ダイニンによる振動を詳細に解析するための装置を開発し、その応用実験を行った。安定した赤色 LED レーザー光源を使用し、アキシコンレンズを使った新しい暗視野照明装置を併用することで、通常の像よりも 100 倍ほど輝度の高いマイクロビーズ像を観察できることがわかった。その位置を計測することで 2次元の位置を $0.05\text{nm} \cdot 10\text{kHz}$ の精度で安定して計測できるようになった。この精度は従来の手法よりは 2桁近く向上しているが、観察試料の精密な位置制御があってはじめて意味のあるデータを収集できる。LabView ソフトでナノポジショナーステージを 0.1nm 精度で位置制御を行い、上の性能が十分に発揮できる測定環境とした。

応用実験も試みている。これまで記載のあったダイニンによる振動現象が、より詳細に記録できるようになった。振動波形は 1つ1つが安定した一定のものではなく、時々刻々

と変化する様子が明確に記録できるようになった。ダイニンによる振動が2-3個以内の小さなピークを持つ振動に峰分かれる様子も頻繁に観察された。これらから、ダイニン分子が振動的な振る舞いをするメカニズムに関して、新しい知見が得られるものと期待される。

2) X線回折による軸糸構造変化の解析

また、軸糸の3次元振動を調べるに先立って、X線を使って軸糸構造の変化を調べた。X線小角散乱によって、周期的構造の変化に関する多くの情報が得られることがわかった。特に、96nm周期のスポーク、24nm周期のダイニン外腕は、周期は一定であるが、溶液条件によってらせん状の配置を取ったり、長軸方向に垂直に配置したり、ダイナミックに変化することがはじめて明らかとなった(図1)。また、直径方向の変化も解析できることが判明した。今後、光学顕微鏡下の3次元解析のデータと照合できることが期待される。



3. 研究実施体制

(1)「軸糸構築」グループ

①研究者名

神谷 律 (東京大学大学院理学系研究科 教授)

②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

(2)「機能素子」グループ

①研究者名

豊島 陽子 (東京大学大学院総合文化研究科 教授)

②研究項目

- ・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

(3)「人工運動系」グループ

①研究者名

本多 元 (長岡技術科学大学工学部 助教授)

②研究項目

- ・レールタンパク質の物性とレーザー照射による滑り運動の関連の解明
- ・人工滑り運動と生理的滑り運動との関係の解明

(4)「分子ナノ振動解析グループ」グループ

①研究者名

上村 慎治 (東京大学大学院総合文化研究科 助教授)

②研究項目

- ・微小振動解析装置の開発と応用実験
- ・X線回折による軸糸構造変化の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 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). Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Sci.*, 119:1165-1174.
- Yamamoto, R., Yagi, T. and Kamiya, R. (2006). Functional binding of inner-arm

dyneins with demembrated flagella of *Chlamydomonas* mutants. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 63, 258-265.

- Yamamoto, R. Yanagisawa, H., Yagi, T. and Kamiya, R. (2006). A novel subunit of axonemal dynein conserved among lower and higher eukaryotes. *FEBS Lett.* 580, 6357-6560
- Kobayashi, T., Shiroguchi, K., Edamatsu, M., and Toyoshima Y. Y. (2006) Microtubule-binding properties of dynactin p150 expedient for dynein motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 23-28.
- Toba, S., Watanabe, T.M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y.Y., and Higuchi, H. (2006) Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5741-5745.
- Mori D, Yano Y, Toyo-oka K, Yoshida N, Yamada M, Muramatsu M, Zhang D, Saya H, Toyoshima YY, Kinoshita K, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. (2007) NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol.* **27**, 352-367.
- Tomohiro Shima, Takahide Kon, Kenji Imamula, Reiko Ohkura and Kazuo Sutoh.(2006). Two modes of microtubule sliding driven by cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17736-17740
- Tomohiro Shima, Kenji Imamula, Takahide Kon, Reiko Ohkura, and Kazuo Sutoh. (2006) "Head-head coordination is required for the processive motion of cytoplasmic dynein, an AAA+ molecular motor" *J. Struc. Biol.* 156, 182-189
- Unidirectional movement of an actin filament taking advantage of temperature gradients; Tomoaki Kawaguchi, Hajime Honda. (2006) *BioSystems*, doi:10.1016/j.biosystems.2006.08.008
- Ciliated cells differentiated from mouse embryonic stem cells. Nishimura, Y., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Kamimura, S., Okochi, H. & Asashima, M., *Stem Cells*, 24:1381-1388, 2006