

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07067

研究課題名(和文) 運動性の異なる複数種の鞭毛ダイニンによる協調的力発生の研究

研究課題名(英文) Studies on the cooperative force generation by multiple species of flagellar dynein with different motility

研究代表者

榊原 斉 (SAKAKIBARA, HITOSHI)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：90359076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物鞭毛では、活性の異なる複数種のダイニンが配列しています。本研究の目的は、活性の異なるダイニンを配列した時にどのように協調して機能するのかを解明することです。最初の試みとして内腕ダイニンのサブユニット、アクチンヘタグを付与し、配列を試みましたが、必要な量を得られませんでした。そこで、我々は、配列する標的を3種の頭部が異なる活性を持つヘテロトリマーダイニン、外腕ダイニンに変えました。外腕ダイニンをドッキングコンプレックスを介して微小管上に配列し、外腕ダイニンが協同的に働く様子を観察する実験系の構築に成功しました。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to clarify how flagellar dyneins with different activities cooperate on the flagellar movement. We first tried to arrange inner arm dyneins. We assigned a tag to the subunit of inner arm dyneins. We could purify tagged dynein from the Chlamydomonas strain, but we could not obtain enough amount. Therefore, we changed the target to the outer arm dynein, a heterotrimeric dynein whose three heads have different activities. The outer arm dynein was aligned via the docking complex. For the scaffold, microtubules polymerized using the flagellar axoneme fragments as a seed were used. We observed outer dynein arms are arrayed on the microtubule at a period of 24 nm by the negative staining EM. When ATP was added, bending motions were observed. We think that an experimental system was constructed to observe interactions between microtubules and outer arm dyneins, where microtubules were bundled with same direction and outer arm dyneins were aligned between microtubules.

研究分野：生体運動を中心とした生物物理学

キーワード：鞭毛ダイニン 人工配列 協同性

1. 研究開始当初の背景

真核生物の鞭毛繊毛は、細胞が液体に作用する時に使われる細胞小器官です。その運動の基礎は、9本の周辺微小管上に配列したダイニン内腕外腕が隣り合う微小管との間に滑り力を発生することです。その滑りは、時間空間的に制御され、波打ち運動に変換されます。

研究代表者は、1本の鞭毛に約10種の鞭毛ダイニンが規則正しく配列し、それぞれが機能分化し異なる運動特性をもつことに注目しています。鞭毛研究のモデル生物クラミドモナスでは、周辺微小管上、頭部3個の外腕ダイニンが4個、6種のモノマー(a~e, g)とヘテロダイマー(f)の内腕ダイニンが96nm周期で配列します。内腕のa-b, c-e, g-dはペアとなり、ヘッドが近接します(Bui, Sakakibara et al., J. Cell Biol. 2008)。外腕ダイニンは、鞭毛打頻度の上昇を、内腕ダイニンは、鞭毛打の振幅増幅の役割を持ちます。機能分化は、内外腕それぞれの内にもあります。研究代表者らは、外腕ダイニン頭部を形成する3種のダイニン重鎖間で外腕の機能に対する役割が違うこと(Sakakibara et al., J. Cell Biol. 1991, 1993)、重鎖間でモータ活性に差があること(Sakakibara and Nakayama J. Cell Sci. 1998)を見出しました。ダイニン内腕では、内腕ダイニンfがリン酸化され鞭毛の活性制御に重要な役割を持ち、ダイニンcが鞭毛に掛かる抵抗が高い時に重要であることが示されています。研究代表者等は、ダイニンfの2種の重鎖のうちf β 重鎖の方がf α 重鎖よりリン酸化制御に重要な役割を持ち、運動活性も高いことを示しました(Toba, Fox, Sakakibara et al., Molec. Biol. Cell, 2011)。内腕ダイニンは、微小管に及ぼす運動の特性も外腕ダイニンと大きく違います。外腕ダイニンは1本の微小管に多分子が相互作用し滑りを発生します。対して、内腕ダイニンではc, e, fについて少数分子で微小管を保持しながら運動できるモータであることを研究代表者らが示しました(Sakakibara et al., Nature 1999, Kotani, Sakakibara et al., Biophys. J. 2007, Sakakibara, Shimizu et al., Biophys. J. 2014)。

鞭毛内におけるダイニンの力発生の詳細を知る為には、上記のような多様な運動特性を持つ鞭毛ダイニンが共存する時、互いにどのように影響し合い運動を生じるのか調べる必要があると考えられ、本研究を企画しました。

2. 研究の目的

真核生物の鞭毛内では、モータ活性の異なる複数種のダイニンが配列しています。本研究の目的は、活性の高い鞭毛ダイニンと低いダイニンを配列した時にどのように協調して

微小管と相互作用するのかを解明し、活性の異なるダイニンの配列が鞭毛運動にいかにより有利に働くのかをつきとめることです。

3. 研究の方法

クラミドモナスの内腕ダイニン尾部に存在する軽鎖、中間鎖の欠失変異株にタグ配列を含む遺伝子でレスキューし、内腕ダイニンの尾部にタグを導入します。アンチタグを持つDNAを足場にし、内腕ダイニンを1から数分子配列します。

タグをつけた内腕ダイニンが充分量精製できませんでしたので、外腕ダイニンに材料を変更しました。外腕ダイニンはダイニン外腕ドッキングコンプレックスを介して微小管上に24nm周期で配置することができます。鞭毛軸系から高塩濃度溶液でダイニンを抽出後脱塩した粗精製ダイニンを軸系を核にして重合した方向性の揃った微小管束に加え、外腕ダイニンを配列しました。

4. 研究成果

本研究課題では、複数種の鞭毛ダイニンを配列する実験の他、それぞれの鞭毛ダイニンのモータ特性や生体内における内腕ダイニンの配置や機能調節に役割を持つと考えられるラジアルスポークの特性の解明も鞭毛内における複数種ダイニンの協同的な機能発現の機構の解明に重要であると考え、実施しました。

(1) 内腕ダイニンc, e, f, gについては、単一分子で連続的に微小管の滑走運動を発生する能力を持つプロセッシビティの高いモータであることが示されています。内腕ダイニンのモータ特性の詳細を知るために、ダイニンcのプロセッシビティに静電相互作用がどのような効果をもつのかを調べました。その結果、ダイニンと微小管との静電相互作用を阻害するとダイニンが微小管を捕捉するステップで大きく働き、微小管を補足した後の微小管運動の維持には寄与が小さいことが分かりました。

(2) 単頭の内腕ダイニンはp28を軽鎖に持つ亜種とセントリンを軽鎖に持つ亜種がラジアルスポークを挟んで配置されています。特にダイニンcなどp28を軽鎖に持つダイニンはラジアルスポークと基部で接してラジアルスポークから活性制御を直接受けると考えられます。そこで、ラジアルスポークを精製しその特性を調べました。ネガティブ染色電子顕微鏡法で、分子形態を観察、角度分布から頭部と尾部との間の回転ばね定数を見積もりました。生体内におけるラジアルスポークの頭部-尾部間の角度の結果と併せると鞭毛運動中、ラジアルスポークと中心小管との間には約1 pNのずりの力が掛か

ることが分かりました。

(3) ダイニンの配列を確認するためにネガティブ染色電子顕微鏡法を使います。ネガティブ染色電子顕微鏡法の画像を改善するために簡便で制度の高い CTF 補正の方法を開発しました。バックグラウンドイメージとタンパク質分子の周辺には同種の酢酸ウラン分子が存在し、タンパク分子像を形作っています。電子顕微鏡像ではそれらは同じ CTF が掛かっています。バックグラウンドから CTF が抽出でき、ネガティブ染色電子顕微鏡像の CTF 補正が出来ることを見出しました。

(4) 単頭の内腕ダイニンのサブユニット、アクチンヘタグを付与し、配列を試みました。内腕ダイニン a、b、c、d、e、g のサブユニット、アクチンを欠失した変異株 *ida5* にアクチンの c 末に HA タグを付与した遺伝子を導入し、その株からダイニンを精製しました。その結果、タグを付与したダイニンをクラミドモナスより精製できました。しかしながら、ダイニンへのアクチンの結合が阻害されるためか、十分な量のダイニンを得ることができませんでした。

(5) 配列に使用するダイニンを変更し、ヘテロトリマーの外腕ダイニンを配列し、外腕ダイニンが協同的に働く様子を観察する実験系の構築を行いました。足場には、鞭毛軸系断片を核として重合した微小管を使用しました。これにより 2-9 本の方向性の揃った微小管の束を作成することに成功しました。粗精製外腕ダイニンの添加により、微小管束は硬くなりました。負染色電子顕微鏡法で観察したところ、微小管上に 24nm 周期でダイニン外腕とサイズ、形状が一致する構造が、配列していました(図 1)。遠心分離で微小管に結合する成分を共沈させ、電気泳動で確認すると、ATP 非存在下では外腕ダイニンと内腕ダイニン f が微小管と共沈しましたが、ATP 存在下では外腕ダイニンだけが共沈しました。束化した微小管に ATP を加えると、

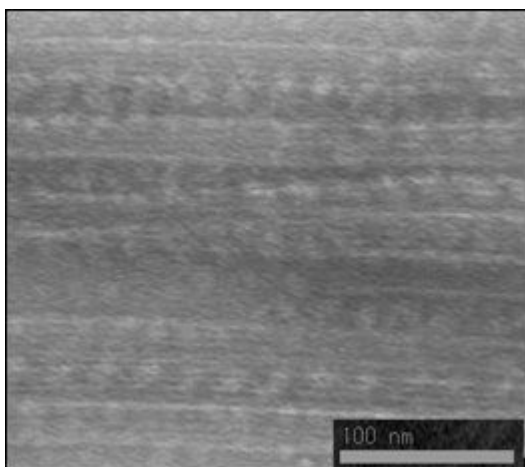


図 1 . 微小管上に配列した外腕ダイニン

微小管束に屈曲が発生する様子を観察できました。まれに、周期的に屈曲-微小管束の乖離-再結合する運動も観察できました。方向性を揃えた微小管束間に外腕ダイニンを橋渡しするように配列、微小管との相互作用を観察する実験系が構築できたと考えています。これまでの実験結果は現在論文投稿準備中です。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

1) 榎原 斉、清水洋輔、小嶋 寛明 . Properties of the purified radial spokes of *Chlamydomonas* flagella. The 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. 2016 年 6 月 京都国際会館

2) 榎原 斉、清水洋輔、Yang, Pinfen、小嶋 寛明 . クラミドモナス鞭毛から精製したラジアルスポークの特性 . 第 54 回日本生物物理学会年会 . 2016 年 11 月 つくば国際会議場

3) 榎原 斉、清水洋輔、Yang, Pinfen、小嶋 寛明 . Properties of the purified radial spokes of *Chlamydomonas* flagella . The 28th CDB Meeting. "Cilia and Centrosomes". Current Advances and Future Directions . 2016 年 11 月 Riken Center for Developmental Biology, Kobe, Japan .

4) Sakakibara, H. The CTF correction of negative-staining electron micrographs by using the CTF extracted from the background image. 日本生物物理学会 第 55 回年会 . 2017 年 9 月 熊本大学白髪キャンパス.

5) 菊本真人、中森鈴奈、小嶋 寛明、榎原 斉 . 内腕ダイニンのプロセスビティに於ける静電相互作用の働きについて . 第 8 回 繊毛研究会 . 2017 年 10 月 筑波大学下田臨海実験センター.

6) Sakakibara, H. The CTF correction of negative-staining electron micrographs by using the CTF extracted from the background image. International Workshop Dynein2017. 2017 年 10 月 淡路夢舞台.

7) Kikumoto, M., Nakamori, R., Kojima, H. and Sakakibara, H. The contribution of electrostatic interactions to

the processivity of inner-arm dynein-c.
ASCB/EMBO 2017. 2017 年 12 月
Philadelphia Convention Center

〔図書〕(計 1 件)

1) King, S. M. 編. Oiwa, K., Sakakibara, H. and Furuta, K. Dyneins. 2nd Edition. Dynein Mechanics, Dysfunction, and Disease. Elsevier Science. (2017). 総 530 頁 (pp 2-35) .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 斉 (SAKAKIBARA, Hitoshi)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来
ICT 研究所 フロンティア創造総合研究室 .
主任研究員
研究者番号 : 90359076

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

小嶋 寛明 (KOJIMA, Hiroaki)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来
ICT 研究所 フロンティア創造総合研究室 .
上席研究員
研究者番号 : 00359077

古田 健也 (FURUTA, Kenya)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来
ICT 研究所 フロンティア創造総合研究室 .
主任研究員
研究者番号 : 40571831

(4)研究協力者 なし