

平成 22 年 2 月 25 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16083203

研究課題名（和文） 鞭毛の振動運動システムの制御メカニズム

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of flagellar oscillation

研究代表者

真行寺 千佳子 (SHINGYOJI CHIKAKO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：80125997

研究成果の概要：

真核鞭毛の運動の基本は、鞭毛軸糸を構成する 9 本のダブルレット微小管間に起こされる滑り運動であり、この滑りは、ダブルレット上に並ぶダイニンが力を出すことによって起こされる。鞭毛内にある多種類のタンパク質は周辺制御因子としてダイニンの dynamic states をモジュレートすることにより、屈曲形成にカップルしてダイニンの活性を制御し、その結果振動運動が時間空間的に巧みにコントロールされていると考えられる。本研究班では、ダイニンの特性をモジュレートする生理的条件および鞭毛の振動運動の発生に関わる要素を解明すると共に、ダイニンの活性制御に最も重要なダイニン結合制御因子と中心対微小管／スポーク系の分子構築を解明することにより、振動運動を生み出すダイニンの dynamic states の制御機構を明らかにすることを目指した。その結果、ウニ精子鞭毛を用いて、振動運動機構の基礎となるダイニンによる滑りの切り替え機構とダイニンのヌクレオチド結合による活性調節の機構の解明、クラミドモナス鞭毛を用いて内腕ダイニンの機能特性の完全な理解、ホヤ精子プロテオーム解析からいくつもの制御因子の特性解析に成功し、振動運動機構の制御の理解に大きく貢献した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	13,800,000	0	13,800,000
2005 年度	27,700,000	0	27,700,000
2006 年度	23,500,000	0	23,500,000
2007 年度	23,500,000	0	23,500,000
2008 年度	13,800,000	0	13,800,000
総計	102,300,000	0	102,300,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：分子モーター、ダイニン、微小管、精子、鞭毛、滑り運動、振動、屈曲

1. 研究開始当初の背景

真核鞭毛の運動の基本は、鞭毛軸糸を構成する 9 本のダブルレット微小管間に起こさ

れる滑り運動であり、この滑りは、ダブルレット上に並ぶダイニンが力を出すことによって起こされる。鞭毛内にある多種類のタ

ンパク質は周辺制御因子としてダイニンの dynamic states をモジュレートすることにより、屈曲形成にカップルしてダイニンの活性を制御し、その結果振動運動が時間空間的に巧みにコントロールされていると考えられる。ダイニンの基本的特性はかなり明らかとなっていたが、鞭毛内のダイニンの制御の実体の解明は容易ではなく、特に振動機構の概要は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ダイニンの特性をモジュレートする生理的条件および鞭毛の振動運動の発生に関わる要素を解明すると共に、ダイニンの活性制御に最も重要なダイニン結合制御因子と中心対微小管/スポーク系の分子構築を解明することにより、振動運動を生み出すダイニンの dynamic states の制御機構を明らかにすることを旨とする。具体的には、ウニ精子・クラミドモナス鞭毛を用いて、ヌクレオチド、屈曲、中心小管などが微小管滑り運動や鞭毛の振動に及ぼす効果を解析し、ダイニンの活性制御機構を解明する。また、ホヤ精子鞭毛を用いて、鞭毛の各サブ構造体を構成するタンパク質をプロテオミクス的手段により同定し、さらに抗体を用いたタンパク質-タンパク質相互作用の解析を行い、ダイニンの活性状態を制御する分子ネットワークを明らかにする。これらを基礎に、高次ナノシステムとしての鞭毛における「動的で柔軟な特性を備えたダイニンの機能制御」分子モデルを提案する。

3. 研究の方法

屈曲効果の解析：ウニ精子鞭毛を用い、振動運動の基礎となる滑りの切り替えと鞭毛の（微小ガラス針による）屈曲方向との関係、及び振動運動開始を誘導する屈曲条件を明らかにする。ウニ精子エラストーゼ処理鞭毛軸糸から得たダブルット束を用いる。また、鞭毛軸糸および単離ダイニンを用いて、蛍光ヌクレオチド（ATPまたはADP）アナログ結合による1分子観察と滑り運動の観察とを行い、ダイニン分子レベルの活性制御と振動制御の関係を調べる。

クラミドモナス鞭毛ダイニンを用いた解析：ある種類の内腕ダイニンだけを欠失したクラミドモナス変異株をあらたに単離・解析し、そのダイニンの機能と重鎖遺伝子の配列を明らかにする。

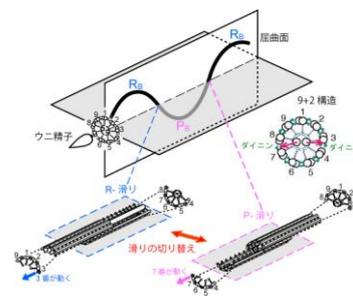
ホヤ精子鞭毛を用いて、鞭毛の各サブユニット構造体を構成するタンパク質をプロテオミクス的手段により同定する。また、サブユニット間の相互作用について、抗体を用いた解析を行なう。具体例としては、新規カルシウム結合タンパク質カラクシンの

機能解析、新規ラジアルスポークタンパク質NDK/DPY26、CMUB116、LRR37のタンパク質間相互作用の解析などを行なう。さらに、蛍光タンパク質と軸糸タンパク質の融合タンパク質を発現するトランスジェニックホヤ精子の作製を試みる。これを用いて、軸糸タンパク質の状態を可視化し、ダイニンの活性状態を制御する分子ネットワークを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ウニ精子鞭毛を用いた振動の基本機構とその制御因子の解明（新規モデルの提唱）

ウニ精子鞭毛を用いて、鞭毛の振動の基礎となる微小管滑り運動の切り替え機構を解析した。その結果、滑りの切り替えは鞭毛の一定方向への屈曲により誘導されることを証明することに成功した。振動運動の基本は、軸糸内の中心小管の両側に位置するダイニンの活性が交互に切り替わる制御であることを示し、さらに、この切り替えが、ダブルット微小管の屈曲によって中心小管とダブルット間に与えられる規則性をもった力学的変形により誘導されることを示した（下図）。



また、ウニ精子鞭毛を用いて、振動運動を誘導する実験系を構築し、振動運動の開始条件

を特定した。具体的には、低濃度ATP中で自発的に運動のできない除膜鞭毛に力学的変形を与えることにより、屈曲の誘導に成功した。この実験系を用いて、ADP結合が振動運動の誘導に必須であることを明らかにした。さらに、蛍光ヌクレオチドアナログを用いたダイニンへの結合実験等により、ATPの加水分解活性はダイニンの滑り運動活性の誘導に十分な条件とはならず、ATPおよびADPの結合が必要であることを明らかにした。このヌクレオチド結合が力学シグナルに依存して変化するという点、この変化が軸糸内に誘導される滑りの切り換えの引き金となるらしいことを明らかにした。

これにより、ウニ精子鞭毛の「振動は力学シグナルによる自律制御により引き起こされる」とするモデルが証明され、さらにその力学制御には、ダイニン分子内の力発生制御部位へのATPとADPの直接結合が関わる可能性を示す、新しいモデルを提唱した。また、

鞭毛基部における振動の発生と鞭毛先端方向への振動の伝播には、鞭毛の前方と後方の反応性の差と、局所的滑り量の差の創出とが重要である可能性を示した。これらの成果により、振動運動の基本機構の全体像がほぼ明らかとなった。

(2) クラミドモナス鞭毛ダイニンを用いた解析

多種類存在する内腕ダイニンは屈曲の形成に必須であることから、その機能解析は重要である。ある種類の内腕ダイニンだけを欠失したクラミドモナス変異株をあらたに単離・解析し、そのダイニンの機能と重鎖遺伝子の配列を明らかにした。クラミドモナスゲノムデータベースを利用し、他のダイニンの重鎖に対応する遺伝子も同定した。さらに、クラミドモナスダイニンのモーター活性を高く保った状態で解析する系を開発し、3つの重鎖の違いを明らかにした。鞭毛内に新に3種類の内腕ダイニンを見出し、そのうちの1つは基部に局在していることを明らかにした。ダイニン分子の動作機構を調べるために、クラミドモナス鞭毛内の特定のタンパク質に蛍光色素を導入する遺伝子工学的な方法を新たに開発し、蛍光外腕ダイニンの1分子運動活性を調べた。その結果、外腕ダイニンがプロセスに運動できることがわかった。鞭毛の根元にのみ局在する内腕ダイニンの存在は、先の、ウニ精子鞭毛で明らかとなった振動機構における前方と後方との差を考える上で興味深い。

(3) ホヤ精子を用いた鞭毛タンパク質のプロテオーム解析

精子鞭毛を構築する各分子の機能解析を行うために、ホヤ精子を用いて軸系の分子構築に関してプロテオミクス的手法を用いた解析を行った。その結果、外腕の新奇ドッキングタンパク質、スポーク HSP40, MORN repeat protein, p33 を精子軸系の成分として同定した。また、外腕ダイニンに結合する新規カルシウム結合タンパク質「カラクシン」を同定し、これがカルシウム依存的に外腕ダイニンを調節していることを明らかにした。ホヤ精子のカラクシンは、 10^{-8} - 10^{-7} M という濃度のカルシウム存在下でダイニンと相互作用することを見いだした。In vitro motility assay を用い外腕ダイニンへのカラクシンの影響を調べた結果、カルシウム存在下でカラクシンがダイニンによる微小管滑り運動を抑制することを明らかにした。また、鞭毛運動活性化時に起こる細胞内 cAMP の増加に、カルパインによるタンパク質分解が必須であることを明らかにした。

ホヤ精子鞭毛軸系のラジアルスポーク成分を合計で 12 種類同定した。また抗体を用いて、これらの成分のラジアルスポークにおけるトポロジーを解析した。さらに、精子鞭

毛を構築する各分子の機能解析を行うために、トランスポゾンを用いてホヤ精子軸系成分の遺伝子の導入を試みた、その結果、新規カルシウム結合タンパク質であるカラクシンと GFP の融合タンパク質の導入に成功し、GFP-カラクシンが軸系に結合した精子を単離することに成功した。

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) *Corresponding author.

[雑誌論文] (計 40 件)

1. Hayashi, S. and *Shingyoji, C. Bending-induced switching of dynein activity in elastase-treated axonemes of sea urchin sperm—Roles of Ca^{2+} and ADP. *Cell Motil. Cytoskel.*, 66: 292-301. (2009) 査読有.
2. Ueno, H., Yasunaga, T., Shingyoji, C. and *Hirose, K. Dynein pulls microtubules without rotating its stalk. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 105: 19702-19707. (2008) 査読有.
3. Hayashi, S. and *Shingyoji, C. Mechanism of oscillation— bending-induced switching of dynein activity in elastase-treated axonemes of sea urchin sperm. *J. Cell Sci.*, 121: 2833-2843. (2008) 査読有.
4. Yoshimura, A., Nakano, I. and *Shingyoji, C. Inhibition by ATP and activation by ADP in the regulation of flagellar movement in sea urchin sperm. *Cell Motil. Cytoskel.*, 64: 777-793. (2007) 査読有.
5. Ishikawa, R. and *Shingyoji, C. Induction of beating by imposed bending or mechanical pulse in demembrated, Motionless sea urchin sperm flagella at very low ATP concentrations. *Cell Struct. Funct.* 32: 17-27. (2007) 査読有.
6. Inoue, Y. and *Shingyoji, C. The roles of noncatalytic ATP binding and ADP binding in the regulation of dynein motile activity in flagella. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64: 690-704. (2007) 査読有.
7. Morita, Y. and *Shingyoji, C. Effects of imposed bending on microtubule sliding in sperm flagella. *Current Biol.*, 14: 2113-2118 (2004) 査読有.
8. Mizuno, K., Padma, P., Konno, A., Satouh, Y., Ogawa, K. and *Inaba, K.

- A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca²⁺-dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella. *Biol. Cell*, 101: 91-103. (2009) 査読有.
9. Hozumi A, Padma P, Toda T, Ide H and *Inaba K. Molecular Characterization of Axonemal Proteins and Signaling Molecules Responsible for Chemoattractant-Induced Sperm Activation in *Ciona intestinalis*. *Cell Motil. Cytoskel.*, 65, 249-267. (2008) 査読有.
 10. Hozumi A., Satouh Y., Makino Y., Toda T., Ide H., Ogawa K., King S.M. and *Inaba, K.. Molecular characterization of *Ciona* sperm outer arm dynein reveals multiple components related to outer arm docking complex protein 2. *Cell Motil. Cytoskel.*, 63: 591-603 (2006) 査読有.
 11. Murata Y., Iwasaki H., Sasaki M., Inaba K. and *Okamura Y. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature*. 435: 1239-1243. (2005) 査読有.
 12. Satouh Y., Padma P., Toda T., Satoh N., Ide H. and *Inaba K. Molecular characterization of radial spoke subcomplex containing radial spoke protein 3 and heat shock protein 40 in sperm flagella of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol Biol Cell.*, 16: 626-636. (2005) 査読有.
 13. Yagi T., Uematsu K., Liu Z., and Kamiya R. Identification of novel dyneins that localize exclusively to the proximal portion of *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Sci.* 122:1306-1314. (2009) 査読有.
 14. *Omran H, Kobayashi D, Olbrich H, Tsukahara T, Loges NT, Hagiwara H, Zhang Q, Leblond G, O'Toole E, Hara C, Mizuno H, Kawano H, Fliegauf M, Yagi T., Koshida S, Miyawaki A, Zentgraf H, Seithe H, Reinhardt R, Watanabe Y, Kamiya R, Mitchell DR, *Takeda H. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature*. 456: 611-616. (2008) 査読有.
 15. Yagi T., Minoura I., Fujiwara A., Saito R., Yasunaga T., Hirono M., and *Kamiya R. An axonemal dynein particularly important for flagellar movement at high viscosity: Implication from a new *Chlamydomonas* mutant deficient in the dynein heavy chain gene *dhc9*. *J. Biol. Chem.* 280(50):41412-20. (2005) 査読有.
- [学会発表] (計 137 件)
1. Chikako Shingyoji Roles of motor protein in the regulation of melanophore responses in zebrafish. The 2nd International Symposium on Bio-nanosystems, University of Tokyo, Tokyo (2008 年 10 月 31~11 月 2 日)
 2. Hironori Ueno, Takuo Yasunaga, Chikako Shingyoji and Keiko Hirose Structural analysis of outer arm dynein molecules bound to microtubules. The 2nd International Symposium on Bio-nanosystems, University of Tokyo, Tokyo (2008 年 10 月 31~11 月 2 日)
 3. 中野泉、真行寺千佳子 ウニ精子鞭毛外腕ダイニンによる微小管滑り運動に対する ATP アナログの効果. 日本動物学会第 79 回大会、福岡 (2008 年 9 月 5 日~7 日)
 4. 林周一、真行寺千佳子 ウニ精子鞭毛における屈曲によるダイニン活性部位の切り替え誘導に対する ADP の効果. 日本動物学会第 79 回大会、福岡 (2008 年 9 月 5 日~7 日)
 5. 上野裕則、安永卓生、真行寺千佳子、広瀬恵子 ダイニン・微小管複合体の構造学的研究 (Structural analysis of outer arm dynein molecules bound to microtubules) . 日本生物物理学会第 46 回年会 福岡 (2008 年 12 月 3 日~5 日)
 6. Chikako Shingyoji Regulation of dynein activity in flagellar motility: Roles of ATP, ADP and mechanical signals. 2007 FASEB Summer Research Conferences, the Biology of Cilia and Flagella. Vermont Academy, Saxtons River, Vermont, USA. (2007 年 8 月 4~9 日)
 7. Yoshimura, A., Ishikawa, R., Inoue, Y., Nakano, I. and Shingyoji, C. Roles of ATP, ADP and mechanical signals in the regulation of dynein activity in flagellar motility., The 56th Fujihara Seminar,

International Conference on Molecular Mechanism of Intracellular Transport: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins, 2007. Grand Hotel New Oji in Tomakomai, Hokkaido, Japan. (2007年8月23~26日)

8. 吉村安寿弥, 真行寺千佳子 ウニ精子鞭毛運動の制御における ATP・ADP の役割. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前大学, 青森 (2007年9月20~22日)
9. 林周一, 真行寺千佳子 ウニ精子鞭毛において屈曲により誘導されるダイニン活性部位の切り替え. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前大学, 青森 (2007年9月20~22日)
10. Konno A and Inaba K, Comparative studies of cilia and flagella in the ascidian *Ciona intestinalis*. 1st Int. Congress on Invertebrate Morphology, Copenhagen, 2008.8.17-21.
11. 水野克俊, 志鷹裕司, 榊原斉, 大岩和弘, 稲葉一男 新奇カルシウムセンサー「カラクシン」の鞭毛運動における機能解析. 第 79 回日本動物学会大会, 福岡, 2008.9.6.
12. 保住暁子, 笹倉靖徳, 稲葉一男 Cancer/Testis antigen Sp17 様タンパク質 Ci-Sp17RP のホヤ精子活性化における機能解析. 第 79 回日本動物学会大会, 福岡, 2008.9.6.
13. 野村守, 稲葉一男 カタユウレイボヤ精子運動活性化に関与する 26kDa タンパク質の同定. 第 79 回日本動物学会大会, 福岡, 2008.9.6.
14. 八木俊樹, 植松圭吾, 劉中美, 神谷律 クラミドモナス鞭毛の根元に局在する新規内腕ダイニンの同定. 日本生物物理学会第 46 回年会. 福岡国際会議場, 2008年12月3日-12月5日
15. Yagi T, Uematsu K., Liu Z., and Kamiya R. Identificaiton of three minor inner-arm dynein heavy chains in *Chlamydomonas* flagella. EMBO Workshop on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Hyeres-les-Palmiers, Var, France, 2008年5月27日-6月1日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

プレス発表: 分子モーターのメカニズムを解明 -ダイニン分子モーターの「腕」を可視化. 広瀬恵子, 上野裕則, 安永卓生, 真行寺千佳子, 2008年12月2日, (東大理学部)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真行寺 千佳子 (SHINGYOJI CHIKAKO)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 80125997

(2) 研究分担者

稲葉 一男 (INABA KAZUO)
筑波大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 80221779

八木 俊樹 (YAGI TOSHIKI)

京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 40292833

(3) 連携研究者

なし