

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07332

研究課題名(和文) ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の構築による軸系ダイニンの力発生機構の研究

研究課題名(英文) Motile mechanism of axonemal dynein studied using the dynein-microtubule-DNA-origami complex

研究代表者

広瀬 恵子 (Hirose, Keiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90357872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：鞭毛・繊毛の周期的屈曲運動の制御機構を明らかにするために、鞭毛軸系外腕ダイニン、微小管、およびDNA折り紙構造体からなるモデル系を作成した。作成した複合体は、2本の微小管の間にダイニンが2種類の向きに規則的に並んだ構造をもち、微小管同士はDNA折り紙で架橋されていることが電子顕微鏡で観察できた。光ピンセット法で複合体の運動を計測したところ、微小な振動的往復運動が観察された。この研究結果は、ダイニン、微小管、架橋のみから成る単純な系が自律的な振動を起こす能力をもつことを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鞭毛・繊毛の周期的屈曲運動のためには、鞭毛・繊毛軸系の逆側に配置したダイニンが交互に活性化する必要があるが、これがダイニン・微小管に固有の性質によるのか、鞭毛内に多数存在する他の制御蛋白質や鞭毛・繊毛の特徴的な立体構造によるのかは不明であった。本研究では、DNA折り紙構造体を用いることにより、軸系ダイニン、微小管、架橋構造から成る単純な系が自律振動的に運動することを示し、鞭毛・繊毛運動の制御機構を理解するうえで重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the regulatory mechanism of the periodic bending movement of cilia and flagella, we constructed a model system consisting of axonemal outer arm dyneins, microtubules, and DNA origami structures. Electron microscopic observation revealed that the complex has a structure in which dyneins are regularly arranged in two opposite orientations between two microtubules crosslinked by DNA origami. In optical trapping experiments, the complex showed back and forth movement. These results showed that a simple system composed of dynein, microtubules, and crosslinkers has an ability to move in a self-oscillatory manner.

研究分野：生物物理学

キーワード：ダイニン 微小管 鞭毛・繊毛 DNA折り紙 ナノ計測

### 1. 研究開始当初の背景

鞭毛・繊毛は、円周状に並んだ9本のダブルレット微小管上に軸系ダイニンが規則的に配列した「9 + 2」構造と呼ばれる構造をもつ。隣り合うダブルレット微小管は架橋されているため、ダイニンが力を発生すると鞭毛・繊毛の屈曲が起こる。9本の微小管上のダイニンのうち、逆側のダイニンは鞭毛を逆向きに屈曲させる力を発生する(図1)。従って、周期的屈曲運動を起こすためには、逆側にあるダイニンが、交互に活性化する必要がある。しかし、ダイニンの活性化のスイッチングが、ダイニン・微小管相互作用に固有の性質であるのか、ラディアルスプークや中心対微小管複合体などの制御系、あるいは「9 + 2」という特殊な構造にあるのかは不明であった。

振動運動がダイニン・微小管のもつ固有の性質かという問いに答えるためには、制御蛋白質を含まず、微小管、逆向きに力を発生するように配置したダイニン、および微小管同士を架橋する構造のみから成る複合体を作成し、振動運動の有無を調べればよい。しかしこのような複合体を作成することは困難であった。

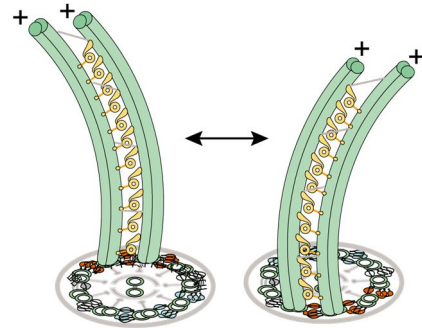


図1. 鞭毛・繊毛の構造とその屈曲運動。

### 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、微小管、逆向きに力を発生するように配置した軸系ダイニン、および微小管同士を架橋する構造のみからなるモデル系を作成し、その構造を電子顕微鏡で観察するとともに、運動を計測し、振動運動の有無を調べることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 逆向きに力を発生するダイニンを含むダイニン・微小管複合体の作成

In vitro で重合した微小管と軸系外腕ダイニン分子を混合すると、ダイニンはストークと tail で異なる微小管に結合することにより、2本の微小管を架橋する。それぞれがどちらの微小管に結合するかにより、2種類の結合方向が考えられるが、微小管の極性が揃っているとき、これらは逆向きに力を発生する(図2)。この性質を利用して、2本の微小管の間に逆向きに力を発生するダイニンが配列した複合体を作成した。複合体の構造は、電子顕微鏡観察で確認した。

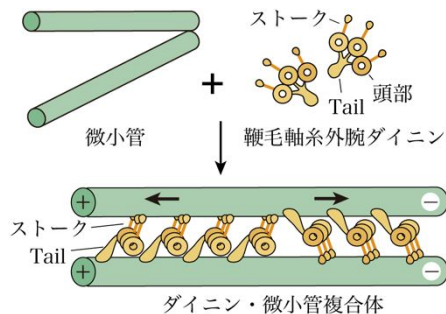


図2. 軸系外腕ダイニンと微小管の複合体の作成。

#### (2) ダイニン・微小管複合体のDNA折り紙構造による架橋

ダイニン・微小管複合体を架橋するために、長さ約80 nmの棒状のDNA折り紙構造体をデザイン、作成した(図4a)。微小管に強く結合する変異体キネシンモータードメインをDNA折り紙の2箇所に結合することにより、複合体の微小管同士を架橋した。DNA折り紙構造体のデザインや架橋条件は、電子顕微鏡観察で確認しながら検討した。

ATPを加えてダイニンが活性化したとき、微小管同士の相対運動をある程度可能にするように、DNA折り紙とキネシンの間にフレキシブルなリンカーを挿入した。リンカーの長さから、微小管同士の滑り距離は、最大で前後に約100 nm(計200 nm)と計算された(図3)。

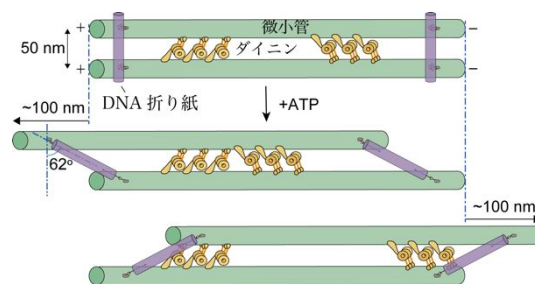


図3. ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体のデザインと、予想される運動範囲。

#### (3) 光ピンセット法を用いた運動計測

ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の微小な運動を検知するため、光ピンセット法を用いた計測を行った。ビオチン化チューブリンを混合した微小管を用いて複合体を作成し、これをガラス表面に吸着させた。ストレプトアビジンを介して200 nmまたは500 nmのビーズを複合体の微小管に結合した。ガラス表面に直接結合した微小管は動かないが、他の微小管にビーズが結合した場合は、運動の計測が可能になる。Caged ATPを用いてATPを放出した直後のビーズの運動を計測することにより、複合体を構成する微小管の相対運動を計測し(図5)解析した。

また比較実験のために、同じ方向を向いたダイニンのみを含む複合体を作成した。まず、通常の方法で複合体を作成し、ATPを加えて複合体を解離させると、それぞれの微小管には tail で結合したダイニンが残るが、これらの向きは揃っている。ここに新たに微小管を加えることにより、向きの揃ったダイニンのみを含む複合体を作成した。

#### 4. 研究成果

(1) ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の作成  
 クラミドモナス鞭毛から軸系外腕ダイニンを抽出し、微小管と混合すると、ダイニンで架橋された微小管の束ができる。この構造を電子顕微鏡で観察し、微小管の間にダイニンが一層になって観察されるように蛋白質濃度や溶液条件を調節した。予想されたように、ダイニンのストーク、tail がどちらの微小管に結合するかによって2種類の向きが観察されたが、多くの場合、ダイニンはパッチ状に結合し、一つのグループ内のダイニンは同じ方向を向いていた(図2, 4c)。

電子顕微鏡観察の結果、ダイニンで架橋された2本の微小管は、約80%の場合に極性が揃っていた。このとき、逆向きに微小管を架橋したダイニンは逆向きの力を発生することが予想される(図2)。すなわち、逆向きに力を発生する2種類のダイニンを含むダイニン・微小管複合体を作成することができた。

次に、複合体の微小管同士を架橋するために、図4aのようなデザインのDNA折り紙複合体を作成し、電子顕微鏡で構造を確認した(図4b)。作成したDNA折り紙複合体に変異体キネシンを結合し、ダイニン・微小管複合体を架橋した。複合体がDNA折り紙で架橋されていることを電子顕微鏡ではっきりと観察することができた(図4c)。

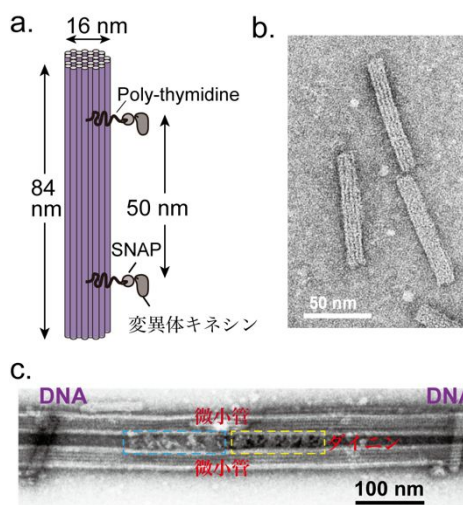


図4. DNA折り紙のデザイン(a)、電子顕微鏡像(b)、および、ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の電子顕微鏡像(c)。シアン、黄色のボックス内のダイニンは、異なる向きで微小管を架橋している。

(2) ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の運動

蛍光ラベルした微小管を用いて複合体を作成し、Caged ATP光分解によってATPを加えた時の複合体の運動を、まずin vitro微小管滑り運動アッセイで観察した。DNA折り紙による架橋がないとき、ATPを加えると微小管同士が滑り合って複合体は解離した。しかし、DNA折り紙で架橋することによって複合体の解離が抑えられることを確認できた。

次に、光ピンセット法を用いてダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の運動を高分解能で計測した。DNA折り紙で架橋したダイニン・微小管複合体をガラスに吸着させ、ビーズを結合して複合体中の微小管の相対運動を計測したところ、多くの複合体で、図5のような振動的運動が観察された。往復運動の振幅は平均約40 nmで、平均周波数は約40 Hzだった。また、振動中の前進、後退運動両方でステップ状の変位が観察された。ステップサイズは平均7-8 nmだった。この結果は、前進、後退運動の両者がダイニンのステップングによることを示した。

向きの揃ったダイニンのみを含むダイニン・微小管複合体では、振動運動は観察されなかった。即ち、逆向きに配列したダイニンを含むことによって振動運動が起こることがわかった。

上記の実験では複合体の全長をガラス表面に吸着させているため、鞭毛・繊毛のような屈曲運動は起こらない。しかし、複合体の一部のみが固定されている場合、繰り返し屈曲運動が観察される場合があった(図6)。

本研究により、微小管、逆向きに力を発生するように結合した2グループのダイニン、架橋構造のみからなり、ラディアルスポークや中心対微小管複合体などの制御系をもたず、「9 + 2」構造もとらない単純な系で、振動運動および繰り返し屈曲運動が起こることを示すことができた。

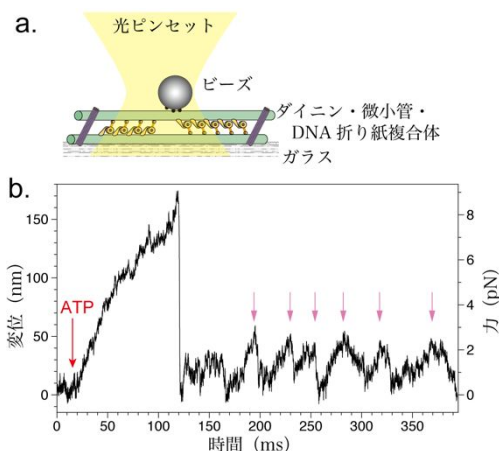


図5. (a) ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の運動計測の方法を示す模式図、(b) 複合体の運動の一例。

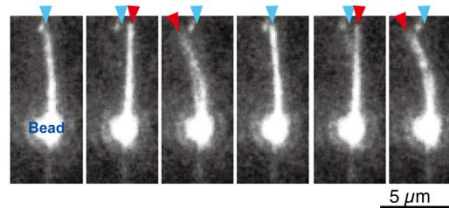


図6. ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の屈曲運動。複合体の先端の位置(赤)が、ATPを加える前の位置(シアン)と比較して左右に動いている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1 . 発表者名 Shimaa A. Abdellatef , Hisashi Tadakuma, Yuichi Kondo, Kangmin Yan, Hideo Higuchi, and Keiko Hirose
2 . 発表標題 Oscillatory movement of the dynein-microtubule complex crosslinked with DNA-origami
3 . 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shimaa A. Abdellatef, Hisashi Tadakuma, Yuichi Kondo, Kangmin Yan, Rofia Boudria, Kodai Fukumoto, Takashi Fujiwara, Hideo Higuchi, and Keiko Hirose
2 . 発表標題 Oscillatory movement of a dynein-microtubule complex crosslinked with DNA-origami
3 . 学会等名 Annual Meeting of the Biophysical Society, US ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Shimaa A. Abdellatef、多田隈尚史、近藤雄一、巖康敏、樋口秀男、広瀬恵子
2 . 発表標題 Motility and structure of the dynein-microtubule complex crosslinked with DNA-origami
3 . 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Keiko Hirose, Rofia Boudria, Shimaa Abdelaleem, Yuichi Kondo, Kangmin Yan, Hideo Higuchi, Hisashi Tadakuma
2 . 発表標題 Analysis of the dynein-microtubule complex cross-bridged with DNA
3 . 学会等名 International Workshop Dynein 2017 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 広瀬恵子, Rofia Boudria, 巖康敏, 近藤雄一, 樋口秀男, 多田隈尚史
2. 発表標題 ダイニン・微小管複合体のDNA折り紙をもちいた架橋
3. 学会等名 生体運動合同班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shimaa A. Abdellatef, Hisashi Tadakuma, Yuichi Kondo, Kodai Fukumoto, Kangmin Yan, Hideo Higuchi, and Keiko Hirose
2. 発表標題 Analysis of motility and structure of the dynein-microtubule complex: application of DNA-origami based tools for mehanobiology.
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Amos, L. A. and Hirose, K.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Pan Stanford Publishing Pte Ltd.	5. 総ページ数 25
3. 書名 Dynein: Ancient protein complexes gradually reveal their secrets. Chapter 1 of 'Handbook of Dynein (Second edition)'	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	樋口 秀男  (Higuchi Hideo)  (90165093)	東京大学・大学院理学系研究科・教授    (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	多田 隈 尚史 (Tadakuma Hisashi) (10339707)	大阪大学・蛋白質研究所・助教  (14401)	