

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間： 2007～2008
課題番号：19570150
研究課題名（和文） 新規蛍光標識法を用いた軸系ダイニンの1分子運動特性の解析
研究課題名（英文） Analysis of the movements of single axonemal dyneins on microtubules visualized using quantum dots
研究代表者 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

研究成果の概要：

本研究では、鞭毛運動におけるモーター蛋白質ダイニンの機能を理解するために、新に開発した鞭毛蛋白質の特異的標識法を利用して、ダイニン1分子の運動の様子と力発生過程を調べた。その結果、鞭毛ダイニンの効率的な力発生と運動には多分子が必要であることが示唆された。また、精製した鞭毛ダイニンのモーター活性を生体内に近い条件で調べる方法も新たに開発した。その方法により、3種類のモーター蛋白質が分子内に共存するタイプの鞭毛ダイニンでは、それぞれが互いに制御しあい協調して機能していることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1800,000	540,000	2340,000
2008年度	1000,000	300,000	1300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2800,000	840,000	3640,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・生物物理学

キーワード： ダイニン、 微小管、 鞭毛・繊毛

1. 研究開始当初の背景

鞭毛・繊毛運動の基礎は、周辺微小管上のダイニン内腕・外腕が発生する微小管間のすべり運動である。このことは確立しているが、このすべり運動が規則正しい高速の波動運動に変換される機構はよくわかっていない。その機構には、ダイニンのモーター蛋白質としての特殊な性質が関わっている可能性が高い。そこで、本研究では、鞭毛ダイニンの力発生特性を1分子レベル

で解析する。

2. 研究の目的

(1) 鞭毛ダイニンの1分子運動解析

1分子の細胞質性ダイニンは、複数のATP加水分解サイクルの間に微小管上を数マイクロメートルにわたって運動する。このような運動(Processiveな運動)には、2つの頭部(モータードメイン)が必要であり、

頭部を1つしか持たない変異型ダイニンは Processive な運動を行わない。この結果は、細胞質性ダイニンが2つの頭部を交互に動かしながら微小管上を運動する、という歩行型運動モデルを支持する。一方、頭部を1つしか持たない(単頭型)鞭毛ダイニンが Processive な運動をおこなう現象も見つかっている。単頭でどうやって Processive な運動を行うのか? そのメカニズムを明らかにするために、頭部の数が異なる三種類の鞭毛ダイニン(三頭型、双頭型、単頭型)を、最近開発した標識法を用いて蛍光ラベルし、それぞれの1分子レベルの運動特性を比較する。

(2) 鞭毛ダイニンの力発生機構の解析

鞭毛ダイニンに力を加えたときの振る舞いを調べて、鞭毛ダイニンの力発生特性を明らかにする。光ピンセットを用いて、ダイニンを吸着した微小なビーズを補足し、ATP 存在下に微小管と相互作用させる。力を受けながら動くダイニンの運動を調べることで、力発生の性質を調べる。頭部の数が異なる各種鞭毛ダイニンの力発生特性の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、アビジンとビオチンの特異性の高い強固な結合を利用して、ダイニンの特異的蛍光ラベル、ビーズやガラス面への機能的固定を行う。そのために、まず、内腕ダイニンの効率的なビオチン化法を確立した。すでに、外腕ダイニンについては、遺伝子工学的にダイニンをビオチン化する方法を開発しているため、その方法を内腕ダイニンでも利用した。内腕ダイニンの軽鎖を欠失したクラミドモナス変異株に、その遺伝子とビオチン化蛋白質(BCCP)の遺伝子をつなげた組み換え型軽鎖遺伝子を形質転換し、ビオチン化された各種内腕ダイニンを作成した。

(1) 鞭毛ダイニンの1分子運動解析

まず、ビオチン化ダイニンが野生型と同じモーター活性を持つかどうかを調べた。次に、ダイニンの濃度を段階的に下げ、ダイニンが Processive に動くかどうかを大まかに見積った。さらに、Processive な運動をする可能性の高いダイニンを用いて1分子運動観察を行った。ビオチン化ダイニン1分子にアビジン Quantum-dot (Q-dot) を結合させた Q-dot ダイニンの運動を全反射型蛍光顕微鏡で観察した。ATP 濃度は、Caged ATP に

あてる紫外線フラッシュの時間と強度を調整することで変化させた。単頭型、双頭型、三頭型ダイニンの1分子運動観察を行い、それぞれの運動の違いを明らかにした。

(2) 鞭毛ダイニンの力発生機構の解析

直径1 μm のアビジンビーズに、単離・精製したビオチン化ダイニンを機能的に固定した。このビーズを光ピンセットで保持しながら、ATP 存在下にダイニンと微小管を相互作用させると、光ピンセットによる力を受けながら動くダイニン(ビーズ)が観察された。その動きを、フォトダイオードを用いたセンサーによりナノメートル、ピコニュートンのレベルで検出し、ダイニンの力発生特性を調べた。

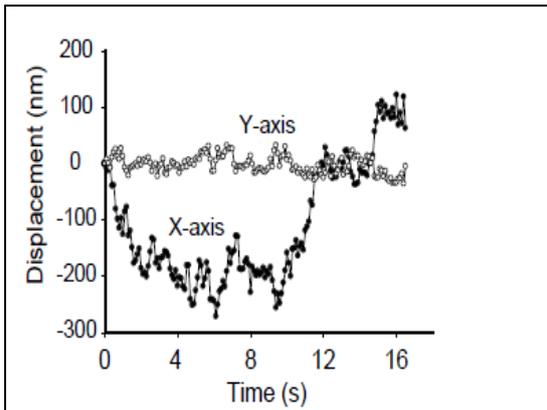
4. 研究成果

(1) ビオチン化内腕ダイニンの作成

まず、内腕ダイニン軽鎖 p 28 がビオチン化される組み換え型クラミドモナスを作出した。これにより、6種類存在する単頭型内腕ダイニン(a,b,c,d,e,g)のうち、p 28 を軽鎖としてもつダイニン a, c, d をビオチン化できるようになった。実際にそれらが機能的にビオチン化されていることを *in vivo* および *in vitro* の実験から確認した。一方、双頭型内腕ダイニン f では、中間鎖による同様のラベルを試みたが、機能的なビオチン化ダイニンを精製する段階には至らなかった。以下の1分子レベル運動解析および力発生解析は、単頭型内腕ダイニンと三頭型($\alpha\beta\gamma$)および双頭型($\alpha\beta$, $\beta\gamma$, $\alpha\gamma$)の外腕ダイニンを用いて、実験を行った。

(2) 鞭毛ダイニンの1分子運動解析

ビオチン化した三頭型および双頭型外腕ダイニンをアビジン Q-dot を用いて可視化した。ATP の存在下に Q-dot ダイニンと微小管との相互作用を調べたところ、ほとんどのダイニンは微小管から解離したが、約1マイクロメートルに渡って微小管上を運動する分子も観察された。ただし、その運動は方向性のない拡散運動であった(図1)。この結果から、外腕ダイニンは、1分子だけでは一方向に連続的に運動できないことが示唆された。一方、ビオチン化した単頭型内腕ダイニン c を用いた実験を行ったところ、ダイニン c では、ATP の存在下にすべてのダイニンが微小管から解離した。この結果は、ダイニン c が Processive な運動を行うことができるとする過去の実験結果と合致しない。今後は、溶液条件などをより細かく変え、Processive な運動が観察されるかどうかをさらに検討する必要があると考える。

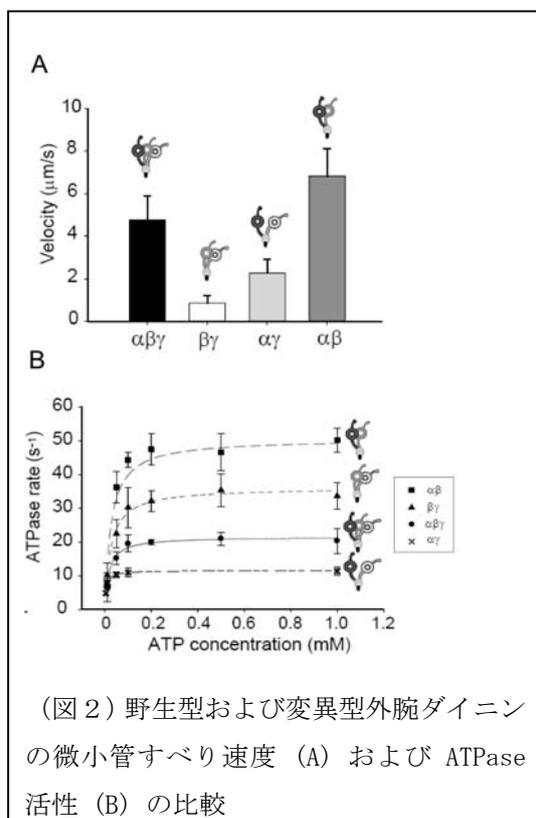


(図1) 20 μ MATP の存在下に微小管上を運動する Q-dot 外腕ダイニン

X軸:微小管長軸方向, Y軸:垂直方向

(3) 鞭毛ダイニンの力発生機構の解析

ダイニンのモーター活性を *in vitro* で調べる新しい実験系の構築を行った。この実験系では、ビオチン標識したダイニンをアビジンを介してガラスに固定した。そのようなダイニンのモーター活性は、これまで行ってきた非特異的な固定法よりもモーター活性が高いことが確かめられた。この方法を用いて、三頭型外腕ダイニンのもつ3つの重鎖 ($\alpha\beta\gamma$) の違いを調べる実験を行った。一本の重鎖のみを欠失した3種類の双頭型ダイニン



(図2) 野生型および変異型外腕ダイニンの微小管すべり速度 (A) および ATPase 活性 (B) の比較

($\alpha\beta$, $\beta\gamma$, $\alpha\gamma$) の ATPase 活性とモーター活性を比較した (図2)。 β 重鎖がなくなると、微小管すべり速度、ATPase 活性ともに低下した。逆に、 γ 重鎖がなくなると、両者はともに上昇した。一方、興味深いことに、 α 重鎖がなくなると、微小管すべり速度は低下したが、ATPase 活性は上昇した。この結果は、外腕ダイニンの3つの重鎖はそれぞれ異なる性質をもち、それぞれのモーター活性が相互に制御されていることを示唆する。これは、鞭毛運動におけるダイニンの分子内および分子間の協調性に関して重要な知見である。

さらに、ビオチン化外腕ダイニンをアビジンビーズに固定し、ダイニンの出す力発生過程を、光ピンセットを用いて調べる実験を行った。その結果、外腕ダイニンの出す力は1 pN程度であること、1分子では連続的な運動が起きないことがわかった。この結果は、さきに述べた Q-dot 外腕ダイニンの運動解析の結果とおおまかに一致する。以上の結果から、微小管を効率的に運動させるには多分子の外腕ダイニンが必要であることが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計7件)

1. 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.
2. Hook P, Yagi T, Ghosh-Roy A, Williams J, Vallee RB. The dynein stalk contains an antiparallel coiled coil with region-specific stability. *Biochemistry*. 2009 Feb 17. [Epub ahead of print]
3. Ikeda K., Yamamoto R., Wirschell M., Yagi T., Bower R., M. E. Porter, W. S. Sale and R. Kamiya. A Novel Ankyrin-Repeat Protein Interacts with the Regulatory Proteins of Inner Arm Dynein f (I1) of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 2008

Nov 19. [Epub ahead of print]

4. Furuta A, Yagi T, Yanagisawa HA, Higuchi H, Kamiya R. (2009). Systematic comparison of in vitro motile properties between *chlamydomonas* wild-type and mutant outer arm dyneins each lacking one of the three heavy chains. J Biol Chem. 284(9):5927-35.
5. Omran H, Kobayashi D, Olbrich H, (他著者 23人中、14番目) (2008). Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. Nature. 456(7222):611-6.
6. Liu Z., Takazaki H., Nakazawa Y., Sakato M., Yagi T, Yasunaga T., King S. M., and Kamiya R. (2008) Partially functional outer arm dynein in a novel *Chlamydomonas* mutant expressing a truncated γ heavy chain. Eukaryotic Cell 7(7) 1136-1145.
7. Yamamoto R, Yanagisawa HA, Yagi T, Kamiya R. (2008) Novel 44-kilodalton subunit of axonemal Dynein conserved from *chlamydomonas* to mammals. Eukaryot Cell. 7(1):154-61.

[学会発表] (計5件)

1. 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 (2008年12/3-12/5)
2. Yagi T, Uematsu K., Liu Z., and Kamiya R. Identificaiton of three novel dyneins localized exclusively to the proximal region of *Chlamydomonas* flagella, 2nd International Symposium on Bio-nanosystems (2008年10/31-11/2)
3. Yagi T, 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* (2008年5/27-6/1)

4. 八木俊樹、神谷律 クラミドモナス鞭毛における3種のマイナーダイニン重鎖の同定、日本生物物理学会、第45回年会 (2007年12/21-23)
5. Yagi T, and Kamiya R. Identificaiton of three minor inner-arm dynein heavy chains in *Chlamydomonas* flagella, FASEB Summer Research Conferences, Biology of Cilia and Falgella (2007年8/4-8/9)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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