

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770170

研究課題名（和文） 鞭毛ダイニン中間鎖の構造と機能の解析

研究課題名（英文） Structural and Functional Analyses of Axonemal Dynein Intermediate Chain

研究代表者

小田 賢幸 (ODA TOSHIYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20569090

研究成果の概要（和文）：

鞭毛は波打ち運動によって液体の流れを生み出す細胞小器官で、人間を含む多くの生物の細胞運動や発生に重要な役割を担っている。鞭毛ではダイニンと呼ばれる多種多様なモーター分子が働いているが、異なる種類のダイニンがどのように協働しているのか分かっていなかった。本研究で、私は超低温電子顕微鏡などを用いて、外腕ダイニンと内腕ダイニンを繋ぐ役割をしているタンパク質 ODA-IC2 を同定した。さらに超高速カメラ等による多角的解析から、この ODA-IC2 を遺伝子操作によって乱すと、外腕ダイニンは制御から外れて暴走し、内腕ダイニンは逆に働きが低下することが分かった。これらの結果は、ODA-IC2 が鞭毛の動きを制御する上で「司令塔」として働いており、そこに手を加えるとダイニン全体に影響が及ぶ急所であることを示している。

研究成果の概要（英文）：

In flagella, outer dynein arm (ODA) and inner dynein arm (IDA) play distinct roles in generating beating motion. However, functional communications between the two dyneins have not been investigated. Here, we demonstrated by cryo-electron microscopy and chemical crosslinking that intermediate chain 2 (IC2) of ODA interacts with the dynein regulatory complex in the axoneme and constitutes part of the outer-inner dynein (OID) linker. Furthermore, we identified IC2 as a functional hub between ODA and IDA based on the phenotypes of *Chlamydomonas* mutants expressing biotinylation-tagged IC2. The flagella of the IC2 mutant showed activated microtubule sliding and enhanced ATPase activities of ODA, as well as an altered waveform, indicating attenuated IDA activity. We concluded that the OID linker controls both ODA and IDA and regulates flagellar beating.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：構造生物学、鞭毛・線毛、ダイニン、分子モーター、クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

鞭毛は単細胞生物から高等動物まで多くの生物が有する運動性細胞小器官である。その機能は単純な遊泳だけでなく気管支の粘液除去、卵管での卵細胞運搬、発生初期における左右非対称性など高度な役割を担っている。ダイニンは鞭毛に波打運動を与えるモータータンパク質であり、細胞質ではキネシンと共に微小管の上を走るトランスポーターとしても働いている。鞭毛ダイニンはその位置から内腕と外腕に分類され、特に外腕ダイニンはその発見以来 40 年以上にも渡って解析されてきた。しかし、2 MDa という大きな分子量、高い自由度および活性の不安定性から、ダイニンの構造に関する知見は極めて限られていた。

2. 研究の目的

私の前研究などにより鞭毛ダイニン重鎖の 3 次元構造とモーター活性機構についての知見は集まりつつある。しかし、外腕ダイニンはモーター活性を持つ重鎖だけでなく、中間鎖、軽鎖、ドッキングコンプレックスといった多くのタンパク質によって構成されている。特に中間鎖については、それが複合体を束ねる基部になるだろうと推察されていたが、それがどのようにモーター活性に関与するかは断片的な情報しか得られていなかった。私は中間鎖が複合体を連結するという静的な機能だけでなく、モーター活性に対して動的に関与しているのではないかと考え、中間鎖に変異を持つ緑藻クラミドモナス変異体作成して中間鎖の機能、構造解析を行った。

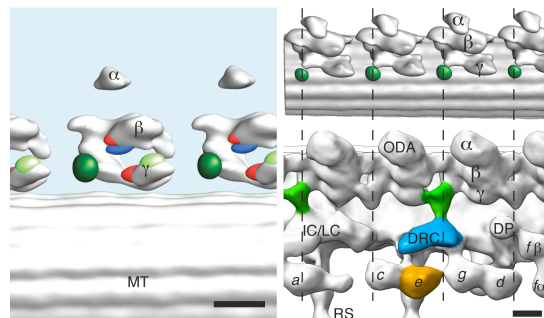
3. 研究の方法

ビオチン化タグを付加した外腕ダイニン中間鎖を発現しているクラミドモナス変異体を作成し、それから精製された外腕ダイニンと微小管の複合体をクライオ電子顕微鏡により観察した。さらにビオチン化タグをストレプトアビジンでラベルした複合体の 3 次元構造を電子顕微鏡像から再構成した。鞭毛内における中間鎖の結合相手を検索するために、化学架橋剤を用いて軸糸タンパク質を架橋し、ストレプトアビジンビーズでビオチン化中間鎖の pull-down assay を行った。中間鎖へのビオチン化タグ付加が鞭毛運動にあたる影響を調べるために、高速度カメラや暗視野顕微鏡等を用いてクラミドモナス細胞の挙動を解析した。

4. 研究成果

私はビオチン化された中間鎖を持つ外腕ダイニンと微小管の複合体をつくり、

ストレプトアビジンで中間鎖の位置をラベルした。単粒子解析を応用して外腕ダイニン-微小管複合体の 3 次元構造を再構成し、ラベルされた構造とラベルされていない構造を比較すれば、ラベルの位置を余分な“出っ張り”として特定することができる。この“出っ張り”が統計的に有意であることを示すために、t 検定を行った。一つの 3 次元像は約 4000 セグメントの投影像から再構成されているので、このデータセットをランダムに 3 等分して、それぞれから 3 次元像を求め、個々のボクセルを独立な標本とみなして自由度 4 の検定を行った。私はこの方法を用いて IC1 のアミノ末端、IC2 のアミノ末端、カルボキシル末端の位置を特定した。同様にビオチン化 ADP とバナジン酸を用いて重鎖の ATPase 活性部位の位置も特定した。これらの結果の中で私達が注目したのは IC2 のアミノ末端の位置である。外腕ダイニンの端から内腕ダイニンの方向へ飛び出すような位置にある IC2 のアミノ末端は、軸糸のクライオ電子トモグラフィーによって観察されていた外腕-内腕ダイニン連絡の位置と丁度一致し



ていたのである（下図）。

IC2 が 外腕-内腕ダイニン連絡の構成要素ではないかという仮説は IC2 が dynein regulatory complex (DRC: 内腕ダイニンと隣接し、周辺微小管の間を連絡するとされる複合体) と化学架橋されるといふ実験結果によって証明された。さらに、IC2 のアミノ末端に付加されたビオチン化タグは、この IC2-DRC 連絡を破壊ないし変質させることが分かった。クライオ電子顕微鏡による 3 次元構造再構成と化学架橋の組み合わせにより、軸糸内の分子間連絡が物理的に存在することを証明することができたのである。

次に私達は暗視野顕微鏡と高速度カメラにより、この外腕-内腕ダイニン間連絡がどのような機能を持っているか解析した。IC2 のアミノ末端にビオチン化タグを付加した外腕ダイニンを持つクラミドモナ

ス変異体は、野生株と比べて遊泳速度がほぼ半分に低下していた。そこで変異株の波形を高速カメラで観察すると、振幅が野生株の半分になっていた。外腕ダイニンは波形の振幅に寄与しないので、IC2 変異株では内腕ダイニンの活性が低下していることが示唆された。外腕ダイニンの構成要素である IC2 にタグを付加したにもかかわらず、内腕ダイニンの活性が変化するという結果は IC2 が外腕-内腕ダイニン連絡を成すという構造上の観察を機能面から支持するものである。

IC2 と内腕ダイニンの関係を証明するために、私達は遺伝学的手法を用いた。IC2 の変異株において、ある特定の内腕ダイニンの活性が低下しているならば、その内腕ダイニンを欠損した変異株と掛け合わせてできる二重変異株の振幅は元の変異株と同じはずである。逆に IC2 の変異株において、活性が変化していない内腕ダイニンを欠損した変異株との二重変異株は、元の変異株よりもさらに小さな振幅を示すと予想される。

IC2 の変異株と内腕ダイニンの一つである *subspecies e* が欠損した株 (*ida6*) を掛けあわせた二重変異株は、元の変異株とほぼ同じ振幅と遊泳速度を示した。これに対し、*subspecies f* を欠損した株 (*ida3*) および *subspecies a, c, d* を欠損した株 (*ida4*) との二重変異株は元の変異株よりも更に小さい振幅と遊泳速度を示した。これら結果は IC2 の変異株においては内腕ダイニンの *subspecies e* の活性が低下していることを示している。

暗視野顕微鏡は動いている鞭毛の観察だけでなく、微小管のすべり運動も蛍光色素無しに直接観察することができる。鞭毛の研究においては軽いプロテアーゼ処理をした軸糸に ATP を加えると、鞭毛ダイニン特に外腕ダイニンのモーター活性により周辺微小管がすべり運動を起こし 9+2 構造が壊れる *sliding disintegration* という現象が用いられる。生理的な条件に近い 1mM ATP 存在下では外腕ダイニンの活性はほとんどの周辺微小管上で抑えられており、1-2 本の周辺微小管が軸糸から滑り出る程度である。ATP の濃度を 20 μ M まで落とすと外腕ダイニンが活性化し、ほとんどの周辺微小管が滑り出して 9+2 構造が完全にバラバラになることが知られている。興味深いことに、私達の作った IC2 の変異体から得た軸糸は 1mM ATP 存在下でも 9+2 構造がバラバラになるほど外腕ダイニンが活性化していた。IC2 のアミノ末端にビオチン化タグを付加することは内腕ダイニン *e* の活性を低下させるだけでなく、外腕ダイニンの非特異的な活性化も引き起こ

すところが分かった。ところが、外腕ダイニンの微小管滑り活性を軸糸から単離、精製した後に測定すると、野生型と IC2 変異体との間に差が無くなってしまった。これは外腕ダイニンの活性制御が他の軸糸タンパク、すなわち外腕-内腕ダイニン連絡の存在に依存していることを示唆している。

以上の結果から、本研究で発見されたダイニン間連絡は、外腕および内腕ダイニンの双方を制御する司令塔として働いていることが判明した。このような制御装置は、多くの鞭毛研究者がその存在を予想していたが、鞭毛の非常に複雑な構造に阻まれて証拠を示せずにはいた。本研究ではじめて、鞭毛運動の中央制御装置の存在が確かめられた。今回得られた知見は、鞭毛運動の制御機構についての理解を深めるだけでなく、鞭毛に関わる不妊、呼吸器疾患、水頭症等の研究に貢献することが期待される。

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 1 件)

著者 Oda, Toshiyuki, Yagi, T., Yanagisawa, H., and Kikkawa, M.

発表年 2013

題名 Identification of the Outer-Inner Dynein Linker as a Hub Controller for Axonemal Dynein Activities.

雑誌名 *Current Biology* 23. 656-664.

査読有

[学会発表] (計 3 件)

学会名 American Society of Cell Biology Annual Meeting 2012

発表者 Toshiyuki Oda

表題 The Outer-Inner Dynein Linker Regulates Flagellar Beating

場所 Moscone Center, San Francisco, USA

発表期日 December 18, 2012

学会名 American Society of Cell Biology Annual Meeting 2011

発表者 Toshiyuki Oda

表題 Communication between Flagellar Outer and Inner Dynein Arms.

場所 Colorado Convention Center, Denver, USA

発表期日 December 4, 2011

学会名 第 6 回鞭毛・ダイニン機能研究会

発表者 小田賢幸

表題 外腕ダイニン中間鎖の構造的および機能的解析

場所 東京大学理学部 2 号館
発表期日 2011 年 10 月 1 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔その他〕

プレスリリース

http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20130415.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 賢幸 (ODA TOSHIYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 20569090

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :