

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18513

研究課題名(和文)細胞質ダイニンの集団運動に特徴的な揺らぎの解析とその生物学的意義の解明

研究課題名(英文)Study on motility fluctuation of small group of cytoplasmic dynein

研究代表者

須河 光弘(SUGAWA, Mitsuhiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：80626383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モータータンパクの少数集団の運動性について研究を行っている。本研究では、細胞内輸送やアンカーの役割を担う細胞質ダイニンの数個程度の集団(ダイニン少数集団)の微小管上での運動を解析した。ダイニン少数集団は微小管のマイナス端方向に一方向性に運動するが、左右軸上ではバイアスされたランダムウォークをすることが分かった。得られた運動の軌跡に対して時系列解析とモンテカルロシミュレーションを行い、ダイニン同士の間で立体障害により左右へのバイアスが生じるが、ダイニンが微小管と結合解離することにより運動を駆動するモーター分子の実効的な数と配置がランダムに変化するために左右へのランダム性が生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Motility of motor protein's small group has been studied. I observed movement of small groups of cytoplasmic dynein molecules which were linked with each other via a nanoparticle. Dynein small groups show unidirectional movement toward the minus end of the microtubule but biased random walk in the left-right direction. Focused on the biased random walk on the left-right axis, I analyzed the trajectories with the time-series analyses and Monte-Carlo simulation. Results suggest that dynein arrangement in small group and steric hindrance of neighbor dynein molecules should constrain directionality of stepping to the right or left, while the randomness should be due to number fluctuation and changes in arrangement of dynein molecules in a small group because of their binding-dissociation events on the microtubule.

研究分野：生物物理

キーワード：ダイニン 微小管 少数性 ランダムウォーク

1. 研究開始当初の背景

アクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格が張り巡らされた細胞質において、タンパク質などの生体分子が拡散する駆動力は、熱揺らぎよりも、アクチン系が生み出す方向性のない力 (“ active force fluctuation ”) の寄与の方が大きい (Guo *et al.*, Cell, 2014)。これに対して、細胞骨格に沿った小胞輸送では、ミオシン 5、ミオシン 6、各種のキネシンや細胞質ダイニンなどによる方向性のある力によって駆動されている。輸送される小胞のサイズによって結合できる分子モーターの数は限られ、小さな小胞ほど分子モーターの集団サイズが小さくなる。小さな小胞が輸送される時、分子モーターの少数性に由来した運動の変動が期待される。メッシュ状に張り巡らされた細胞骨格を避け、細胞骨格上の障害物を避けて輸送するには、運動性 (速度、方向性、連続移動距離など) が固定的であるより変動的であった方が有利なこともあるだろう。しかし、分子モーターの少数集団の運動性についての知見はほとんど解析されていない。そこで、本研究では、細胞質ダイニン (以下ダイニン) をモデル分子として、分子モーターの少数集団の運動性についての研究を行った。

2. 研究の目的

本研究により、分子モーターの少数集団に特有の運動性のゆらぎを解析し、その分子メカニズムを解明して、運動モデルを構築し、細胞内小胞輸送における分子モーター集団の状態推定を行うことを目指す。

3. 研究の方法

ダイニン少数集団の微小管上での運動性の変動の分子メカニズムを明らかにするために、本研究では次の 2 つの研究を行った。

(1) ダイニン少数集団の微小管上での運動を 3D で観察し、さらに溶液中の温度を変化させて運動計測を行った。得られた運動の軌跡について時系列解析を行いゆらぎの特徴を抽出し、さらにモンテカルロシミュレーションによりダイニン少数集団に特徴的な運動を再現することで、その分子メカニズムについて考察を行った。

(2) (1) での研究結果に基づいて構築した作業仮説を検証するために、分子モーターの少数集団の 3次元位置と向きを高速・高精度で計測できる実験系の開発を進めた。そこで、3次元位置検出光学系に偏光素子を組み込んだ光学系を構築し、プローブには金ナノロッドを用いた。さらに、分子モーターと金ナノロッドを DNA origami を介して部位特異的に結合させる。以上により実験系を構築した。

4. 研究成果

(1) 櫛状に溝が掘られたガラス基板に微小管を貼り付け、His タグを介して複数のダイニンを結合させた微小ビーズが微小管上を動く様子を、連携研究者の矢島らが開発した 3次元位置検出光学系 (Yajima *et al.*, Nat. Struct. Mol. Biol. 2008) を用いて観察した。溶液の温度を 15 から 35 まで変化させ、運動の温度依存性を調べた。ダイニン少数集団は微小管のマイナス端方向に一方方向性に運動するが、左右軸に対してはバイアスされたランダムウォークをすることが分かった。さらに、このランダムウォークの拡散性は温度が上昇するほど強くなり、温度依存性があった (図 1)。

ダイニン少数集団の運動

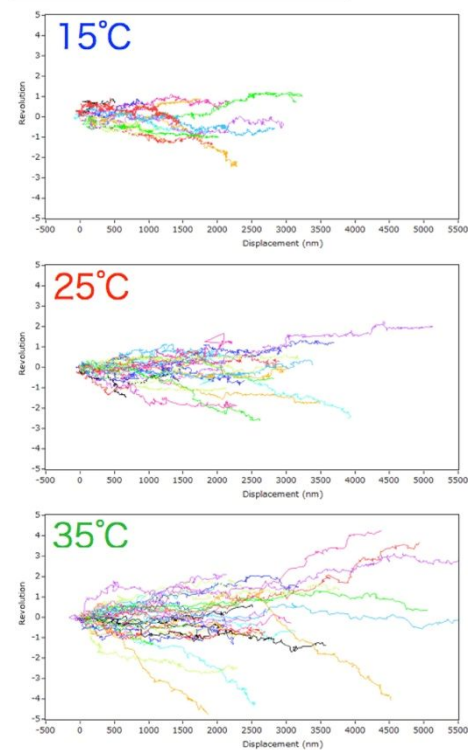
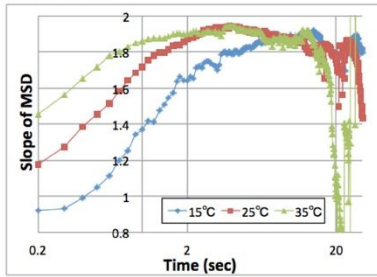


図 1 (横軸が微小管上での進行方向の変位、縦軸が左右方向の変位。)

得られた運動の軌跡について、特に左右方向への運動に着目した。連携研究者の高木氏の協力を得て、時系列解析を行った。左右方向へのランダムウォークは、拡散の時間スケールから熱揺らぎよりもダイニンと微小管との間に生じる分子摩擦により駆動されていることが示唆された (図 2)。さらに、運動速度の分布が非ガウス型で指数型であったことから、運動を駆動するノイズには加算性のノイズに加えて乗算性ノイズも含まれ、分子摩擦の変動を示唆した。これらのことから、運動のランダム性は運動を駆動する微小管上の実効的なダイニンの数の変動との関係が示唆された。

平均二乗変位の傾き

進行方向



左右方向

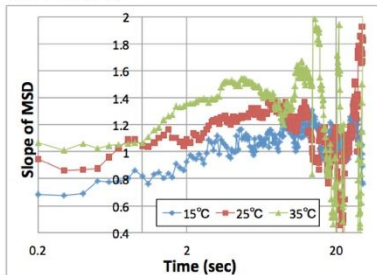


図2 (時間ごとの平均二乗変位の傾き。傾きが1より小さいとき sub diffusion、傾きが1のとき normal diffusion、傾きが1より大きいとき super diffusionとなる。等速直線運動において平均二乗変位の傾きは2となる。)

一方、ビーズ上のダイニンの配置により立体障害が生じてダイニンの進行方向が制限されることで左右へのバイアス性が生じると考えられた。これを検証するために、モンテカルロシミュレーションを行った。その結果、左右へのバイアスされたランダムウォークが生じるには、ビーズ上のダイニンの配置が微小管に対して向きが固定されている必要があった。一方、左右へのランダム性は、ダイニンが確率的に微小管と結合解離をして運動を駆動するダイニンの実効的な数と配置が変動することにより生じることがモンテカルロシミュレーションによって示唆された。さらに解析を進めるためには、ビーズを用いたアッセイ系では微小管に対するダイニンの配置を検出することや、ビーズに結合しているダイニンの分子数をコントロールすることが難しい。そこで、新たな実験系の構築を行う必要があった。

(2)(1)での研究結果を受けて、ダイニン少数集団の3次元位置と向きが計測でき、さらに集団のダイニンの数をコントロールできる実験系を開発することとした。3次元位置検出光学系に偏光素子を組み込み(図3)プローブには金ナノロッド(60 nm×27 nm)を使用し、レーザー暗視野照明により金ナノロッドの位置と向きを高速・高精度で計測可能とした(図4)。

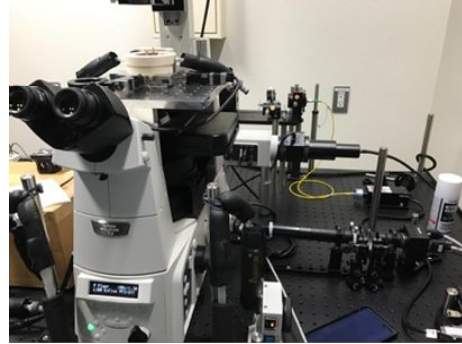


図3 (構築した光学系の写真)

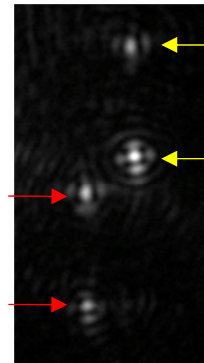


図4 (同じ色の矢印は同じ金ナノロッドの輝点で、上の輝点が縦偏光(↓)で下の輝点が横偏光(←)である。)

金ナノロッドを結合でき、さらにダイニン分子の数をコントロールできるようにするためにシート状の DNA origami を設計した。この DNA origami を用いることで金ナノロッドと分子モーターを部位特異的に結合させることができる(図5)。金ナノロッドで標識された DNA origami に分子モーターを結合させ、この分子モーターの少数集団が微小管上を動く様子を先に構築した光学系を用いて観察し、少数集団の微小管上での変位と配向の変化を高速・高精度で計測できるようになる。現在、ダイニンに加えてキネシンでも少数集団の運動解析を進めている。

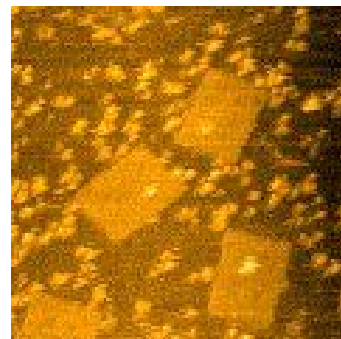


図5 (長方形のシート状の物体が DNA origami。DNA origami の上に見られるスポットは DNA origami の特定の部位に特異的に結合した kinesin-1。)

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2件)

Sugawa M, Okazaki K, Kobayashi M, Matsui T, Hummer G, Masaike T, Nishizaka T. "F₁-ATPase conformational cycle from simultaneous single-molecule FRET and rotation measurements." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 査読有, vol.113(21), 2016, E2916-24. DOI:10.1073/pnas.1524720113.

Yamagishi M, Shigematsu H, Yokoyama T, Kikkawa M, Sugawa M, Aoki M, Shirouzu M, Yajima J, Nitta R. "Structural Basis of Backwards Motion in Kinesin-1-Kinesin-14 Chimera: Implication for Kinesin-14 Motility." Structure, 査読有, vol.24(8), 2016, 1322-34. DOI: 10.1016/j.str.2016.05.021.

[学会発表](計7件)

須河光弘、山口真、高木拓明、柴田桂太郎、豊島陽子、矢島潤一郎 "Off-axis motion of yeast cytoplasmic dynein takes a biased random walk" 第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13-15日、金沢大学(金沢県・金沢市)

須河光弘、高木拓明、山口真、柴田桂太郎、豊島陽子、矢島潤一郎 「細胞質ダイニンの少数集団運動に観られる回転ゆらぎの解析」生体運動合同班会議 2016、2016年1月8-10日、キャンパスプラザ京都(京都府・京都市)

須河光弘、岡崎圭一、小林大、松井貴志、Gerhard Hummer、政池知子、矢島潤一郎、西坂崇之 "F₁-ATPASE CONFORMATIONAL CYCLE FROM SIMULTANEOUS SINGLE-MOLECULE FLUORESCENCE MEASUREMENT AND ROTATION MEASUREMENTS." Biophysical society 60th annual meeting, 2016年2月27日-3月2日、Los Angeles, (USA) 坂田樹哉、小林琢也、須河光弘、島知弘、矢島潤一郎、豊島陽子 「1分子 FRET 観察による細胞質ダイニンの構造変化の計測」第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25日-27日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

小磯由里加、山口真、須河光弘、小林琢也、豊島陽子、矢島潤一郎 「IFT(繊毛内輸送)に関する基底小体微小管の機能に関する研究」第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25日-27日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市) 松田恭平、小林琢也、須河光弘、豊島陽子、矢島潤一郎 "Actomyosin

contraction with a contractile ring related cross-linker in an *in vitro* active gel model system" 第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25日-27日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

松田恭平、小林琢也、須河光弘、豊島陽子、矢島潤一郎 "Autonomous structure formation and contraction of actomyosin regulated by contractile ring related cross-linking proteins (CRCPs)." Biophysical Society 61st Annual Meeting, 2017年2月11日-15日、Louisiana (USA)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

須河光弘(SUGAWA, Mitsuhiro)
東京大学・総合文化研究科・助教
研究者番号: 80626383

(2)研究分担者

(3)連携研究者

高木拓明(TAKAGI, Hiroaki)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10444514

矢島潤一郎(YAJIMA, Junichiro)
東京大学・総合文化研究科・准教授
研究者番号: 00453499

(4)研究協力者

山口真(YAMAGUCHI, Shin)