

平成21年6月22日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16083102

研究課題名（和文） モーター・レール系運動制御の高分解能構造解析

研究課題名（英文） High-resolution structural analysis
of the molecular-motor-rail system

研究代表者

広瀬 恵子 (HIROSE KEIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・主任研究員

研究者番号：90357872

研究成果の概要：

ダイニン・微小管複合体の電子顕微鏡構造研究を行い、従来のモデルに反して、力発生の前後に対応する状態でストロークの角度が変化しないことを示し、新たなモデルを提唱した。キネシンファミリー分子 Kar3 と微小管の複合体の立体構造を約 12Å の分解能で解き、ヌクレオチド状態に依存した構造変化を明らかにした。骨格筋ミオシンとアクチンの硬直複合体構造を 1 nm を超える分解能で得た。また、高速ミオシンのアクチン結合での構造変化を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	8,900,000	0	8,900,000
2005年度	22,100,000	0	22,100,000
2006年度	17,000,000	0	17,000,000
2007年度	16,300,000	0	16,300,000
2008年度	10,000,000	0	10,000,000
総計	74,300,000	0	74,300,000

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、キネシン、ダイニン、ミオシン、微小管、電子顕微鏡、構造、画像解析

1. 研究開始当初の背景

キネシン・微小管、ダイニン・微小管、ミオシン・アクチンに代表される分子モーター・レール系は、数々の分子が複雑な制御のもとに状況に応じた運動機能を司る、きわめて精巧なシステムである。このようなナノシステムの複雑な機構を理解するためには、これを構成する個々の分子の性質を調べるだけでなく、システムそのものを単位とした研究の観点が必要になる。

構造研究に関して言えば、キネシンおよび

ミオシンファミリーに属する様々な分子モーターのモータードメイン、微小管を構成するチューブリンなど個々の分子の原子構造がX線や電子線結晶構造解析によって発表されているが、分子同士がどのように相互作用し、構造を変化させ、互いの働きを制御しているかについての情報はごく限られたものでしかなかった。

さらに、巨大で複雑な分子構造をもつダイニンについては、現在までに結晶構造も知られておらず、構造研究が著しく遅れている分

野である。単離したダイニン分子のストークと尾部のなす角度がヌクレオチドに依存して変化することが報告されたが (Burgess et al., 2003)、微小管と結合したときの構造やその変化についてはほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ナノシステムである分子モーター・レール系の複合体としての構造とその変化を高分解能で捉えることにより、その力発生と制御の機構を理解することを目的とする。具体的には、下記の(1)-(3)を目的とした。

(1) キネシン・微小管系については、複合体の立体構造を ATP 加水分解中の異なるステップに対応すると思われる幾つかの状態、サブナノメータに迫る分解能で解いて比較することにより、微小管への結合および ATP 加水分解に伴う構造変化を明らかにする。

(2) アクチン・ミオシン系では、ミオシン II, VI, IX などの異なる種 of ミオシンを用い、その双頭、単頭の性質を決定し、単粒子解析法を適用して、細胞内での機能発現のメカニズムを三次構造の観点から明らかにする。

(3) ダイニン・微小管系では、微小管に結合した状態でのダイニンの構造変化を調べるとともに、電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いて単体としてのダイニン分子の高分解能構造解析をおこなう。

これらを併せることにより、ナノシステムである分子モーター・レール系が、どのように運動機能を発現しているかを、高分解能の構造を通して捉えることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) キネシン・微小管複合体の立体構造研究

キネシンとしては、主に、Kar3 と呼ばれるキネシンファミリーモーターの頭部 (モータードメイン) をもちいた。微小管に Kar3 を過剰に加えて、微小管を構成するチューブリンダイマーとほぼ 1 対 1 に結合させ、低温電子顕微鏡法によって画像を撮影した。得られた画像の中から、15 本のプロトフィラメントから成り、らせん対称性をもつ微小管の画像を選択し、らせん再構成法によって立体構造を得た。ここに、これまでに報告されている Kar3 およびチューブリンの結晶構造をフィッティングすることにより、構造変化を高分解能で調べた。

(2) ミオシン・アクチン系の構造研究

アクチン・ミオシン硬直複合体に関しては、

らせん対称性を用いた三次元再構成を行った後、らせん構造を考慮した単粒子解析を行うシステムを構築した。ミオシン単体の構造に関しては、画像分類後、参照画像を使って投影方向を決定し、三次元再構成を行った。ミオシンとしては、骨格筋由来のミオシン II, ミオシン VI, ミオシン IX、及び、車軸藻からの高速ミオシンについて解析を行った。

(3) ダイニン分子の高分解能構造解析

細胞性粘菌で発現したダイニン頭部及び、クラミドモナス鞭毛から抽出したダイニン分子を精製して、電子分光クライオ電子顕微鏡法で観察を行った。また、微小管との相互作用様式を、電子線トモグラフィー法により観察した。

三次元再構成法も、従来の重み付き逆投影法から、SIRT法による再構成を可能にした。投影角の決定方法についても、特徴量を用いた三次元再構成法を新たに考案して、検討を行った。

(4) ダイニン・微小管複合体の構造研究

ウニの精子軸糸から外腕ダイニンを抽出し、これを微小管に結合させた。「パワーストローク」の前後に対応すると思われる 2 状態 (ADP・Pi 状態およびヌクレオチド非存在下) で複合体を急速凍結固定し、我々の開発した「クライオポジティブ染色電子顕微鏡法」で観察した。

得られた画像は、安永らが開発した画像解析システム Eos をもちいて分類し、各クラスの平均像を計算した。これを、2 つのヌクレオチド状態で比較した。

4. 研究成果

(1) キネシンファミリーモーター Kar3 と微小管の複合体の立体構造解析

ADP 存在下、AMPPNP 存在下、ヌクレオチド非存在下の 3 状態での Kar3・微小管複合体の立体構造を、らせん対称性をもちいた三次元再構成法により、約 12Å の分解能で解

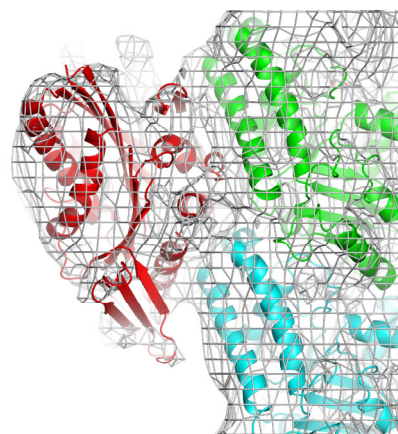


図1. Kar3・微小管複合体の立体構造

くことに成功した (図1)。得られた立体構造に Kar3 およびチューブリンの結晶構造をフィッティングすることにより、ヌクレオチドに依存した構造変化の部位を調べた。これにより、ヌクレオチド非存在下における Kar3 のモータードメインが、スイッチ領域や中央ベータシートにこれまで観察されなかったような大きな構造変化を起こすことを明らかにした。中央ベータシートに観察された構造変化はヌクレオチド非存在下におけるミオシンの結晶構造でも報告されており、キネシンとミオシンの力発生の分子メカニズムの類似性を示唆した。この研究結果をもとに、キネシンモーターの運動機構について新たなモデルを提唱した。

(2) 単粒子解析法の新規アルゴリズムの開発

単粒子解析法を用いた画像処理法については、まだ困難が多いため、本研究では新規のアルゴリズム開発を進めた。分類法に関しては、従来のクラスター解析法を精密化することで、像分類の精度をあげた。この手法を用いて、八木らと鞭毛軸系ダイニンの2連微小管上での配置について新しいモデルを提案した。また、筋肉の細いフィラメントの構造解析に適用し、筋肉弛緩のメカニズムを提唱した。また、単粒子解析における粒子のピックアップを簡易にするために、SVM, Adaboost 法を用いた新規アルゴリズムを開発した。また、三次元再構成した画像の解釈のために原子モデルこうちくのために SR MD (Spatial-restricted Molecular Dynamics)法を開発し、その有効性を検討した。さらに、三次元再構成アルゴリズムとして、特徴量コモンライン探索法を開発し、その有効性を示した。

(3) ミオシン・アクチン系の立体構造解析

ミオシン VI の三次元構造を ATP の有り無しの二状態で解き、レバーアームの動きが存在することを示した (図2)。橙色がアポ状

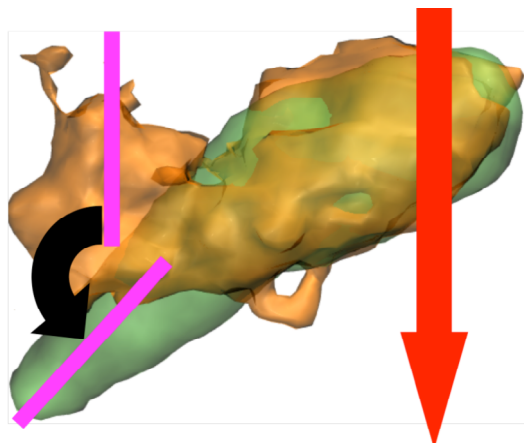


図2. ミオシンVIの立体構造変化

態、緑が ATP 存在下の構造である。

アクチン・ミオシン硬直複合体に関しては、らせん対称性による構造解析に単粒子解析を加えたシステムを構築して構造解析を行った。ミオシン II では、PPDMにより修飾を受けたミオシンが新奇の構造をとることを見出した。アクチン結合タンパク質トロポミオシンの結晶構造解析と電子顕微鏡によるモデリングに成功した。ミオシンとの複合体に関しては、1 ナノメータを超える分解能の3次元像を得た。

(4) ダイニン分子の構造解析

ATP 存在下でのダイニン分子の構造を明らかにした。ATP 活性部位とは反対側に、特徴的なクレフトを持つことを見出された。また、八木、神谷らと共同研究により、電子顕微鏡法と画像処理法により、鞭毛・外腕ダイニン γ 鎖の位置を同定した。図3の等高線に示されるように、根本の部分の密度が γ 鎖の欠損によって減少した。それに伴い、他の二つの鎖の配置も大きく変化することがわかった。

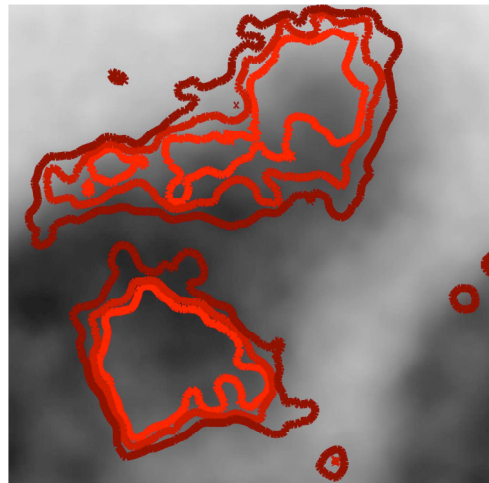


図3. 外腕ダイニン γ 鎖欠損による密度変化

また、単離精製した外腕ダイニンのクライオ・電子顕微鏡画像の撮影、ストックの可視化に成功した。

さらに、電子線トモグラフィー技術を使って、微小管と相互作用している状態での構造を負染色ではあるが、三次元で再構成することに成功した。

(6) 微小管に結合したダイニン分子の構造変化の研究

ダイニン分子は、頭部、ストック、尾部と呼ばれる3つの部分を持ち、ストックの先端にある微小管結合部位で微小管と相互作用する。これまでダイニンは、ストックをオールのように回転させて微小管を動かすという運動モデルが広く信じられていた。しかし、ストックは太さ約2nmの微細な構造であるため、実際に観察して確かめるのは困難だっ

た。我々は、ウニ精子から精製した外腕ダイニン分子を用いて、二本の微小管の間にダイニンが規則的に一列に結合した複合体を作成し、これを低温電子顕微鏡法で観察した。従来の低温電子顕微鏡法では画像のコントラストが低く、ストーク構造の観察が困難だったが、「クライオポジティブ染色電子顕微鏡法」と呼ぶ新たな方法を開発し、これを持ちいることにより、複合体の構造を、ストークを含めて高コントラストで観察することに成功した(図4)。

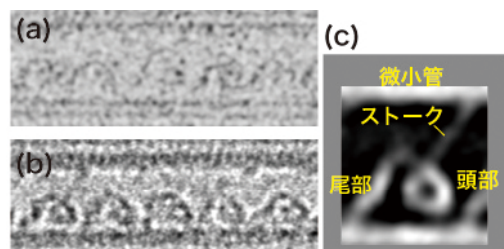


図4. 微小管に結合したダイニンの低温電顕像 (a)、クライオポジティブ染色電顕像 (b)、およびクライオポジティブ電顕像からの平均像 (c)。

「パワーストローク」の前後に対応すると思われる2状態(ADP・Pi状態およびヌクレオチド非存在下)で複合体の構造を観察し、得られた画像を解析した結果、広く信じられてきたモデルとは異なり、これらの2つの状態間でストークの角度は変わらないことがわかった。一方、頭部とストークの位置が尾部に対して変化することがわかった。これらの結果から、ダイニンが頭部とストークを前方に移動させて微小管に結合し、微小管を引っ張るようにして動くという新たなモデルを提唱した(図5)。

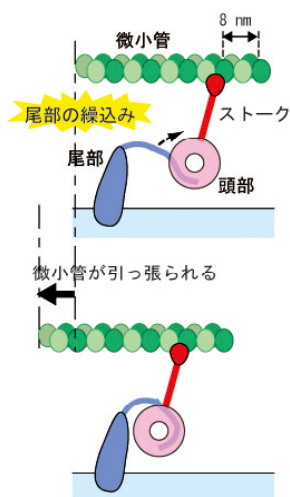


図5. ダイニンの運動を説明する新モデル

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 21 件)

- ① 広瀬恵子、上野裕則、ダイニン・微小管複合体の高分解能構造解析、顕微鏡 (査読有り) in press (2009).
- ② Kobayashi, H., Azuma, R., and Yasunaga T.: Expression of excess receptors and negative feedback control of signal pathways are required for rapid activation and prompt cessation of signal transduction, *Cell Communication and Signaling* (査読有り) 7, 3 (2009).
- ③ Ueno, H., Yasunaga, T., Shingyoji, C., and Hirose, K. Dynein pulls microtubules without rotating its stalk: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* (査読有り) 105, 19702-19707 (2008).
- ④ Kaseda, K., Crevel, I., Hirose, K. and Cross, R.A. Single-headed mode of kinesin-5: *EMBO Reports* (査読有り) 9, 761-765 (2008).
- ⑤ Liu Z., Takazaki H., Nakazawa Y., Sakato M., Yagi T., Yasunaga T., King S.M., and Kamiya R. Partially functional outer arm dynein in a novel *Chlamydomonas* mutant expressing a truncated γ heavy chain: *Eukaryotic Cell* (査読有り) 7, 1136-1145 (2008).
- ⑥ Murakami, K., Stewart, M., Nozawa, K., Tomii, K., Kudou, N., Igarashi, N., Shirakihara, Y., Wakatsuki, S., Yasunaga, T., and Wakabayashi, T. Structural basis for tropomyosin overlap in thin (actin) filaments and the generation of a molecular swivel by troponin-T: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* (査読有り) 105, 7200-7205 (2008).
- ⑦ Yasunaga, T., Wakabayashi, T. Evaluation of a 2k CCD camera with an epitaxially-grown CsI scintillator for recording energy-filtered electron cryo-micrographs: *Journal of Electron Microscopy* (査読有り) 57(3), 101-112 (2008).
- ⑧ Hirose, K. and Amos, L. A. A cool look at the structural changes in kinesin motor domains: *J. Cell Science* (査読有り) 120, 3919-3927 (2007).
- ⑨ Noguchi, T.Q.P., Kanzaki, N., Ueno, H., Hirose, K. and Uyeda, T. A novel system for expressing toxic actin mutants in *Dictyostelium* and purification and characterization of a dominant lethal yeast actin mutant: *J. Bio. Chem.* (査読有り) 282, 27721-27727 (2007).
- ⑩ Nishino, Y., Yasunaga, T. and Miyazawa, A. A genetically encoded metallothionein

- tag enabling efficient protein detection by electron microscopy: *Journal of Electron Microscopy* (査読有り) 56(3), 93-101 (2007).
- ⑪ Hara, F., Yamashiro, K., Nemoto, N., Ohta, Y., Yokobori, S., Yasunaga, T., Hisanaga, S. and Yamagishi, A. An actin homolog of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* that retains the ancient trait of eukaryotic actin: *J. Bacteriology* (査読有り) 189(5), 2039-2045 (2007).
- ⑫ Wachi, H., Sato, F., Nakazawa, J., Nonaka, R., Szabo, Z., Urban, Z., Yasunaga, T., Maeda, I., Okamoto, K., Starcher, B.C., Li, D.Y., Mecham, R.P., and Seyama, Y. Domains 16 and 17 of tropoelastin in elastic fiber formation: *Biochemical Journal* (査読有り) 402, 60-70 (2007).
- ⑬ 安永卓生 電子顕微鏡画像解析ソフトウェア統合環境 Eos の試み、顕微鏡 (査読有り) 42, 214-216 (2007).
- ⑭ Hirose, K. Akimaru, E., Akiba, T., Endow, A. S., and Amos, L. A. Large Conformational Changes in a Kinesin Motor Catalysed by Interaction with Microtubules: *Mol. Cell* (査読有り) 23(6), 913-923 (2006).
- ⑮ Yoshida, T., Iizuka, R., Itami, K., Yasunaga, T., Sakuraba, H., Ohshima, T., Yohda, M., and Maruyama, T. Comparative analysis of the protein folding activities of two chaperonin subunits of *Thermococcus* strain KS-1; the effects of beryllium fluoride: *Extremophiles* (査読有り) 11(2), 225-235 (2006).
- ⑯ Noda, K., Nakamura, M., Nishida, R., Yamaguchi, Y., Tamura, Y., Nakamura, H., and Yasunaga, T. Atomic model construction of protein complexes from electron micrographs and visualization of their 3D structure using VR system: *J. Plasma Phys.* (査読有り) 72(06), 1037-1040 (2006).
- ⑰ Sciambi, C. J., Komma, D. J., Skold, H. N., Hirose, K., Endow, S. A. A bidirectional kinesin motor in live *Drosophila* embryos: *Traffic* (査読有り) 6(11), 1036-1046 (2005).
- ⑱ 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: Implications from a new *Chlamydomonas* mutant deficient in the dynein heavy chain gene DHC9: *J. Biol. Chem.* (査読有り) 280, 41412-41420 (2005).
- ⑲ Murakami, K, Yumoto, F, Ohki, SY, Yasunaga, T., Tanokura, M, and Wakabayashi, T. (2005) Structural basis for Ca²⁺-regulated muscle relaxation at interaction sites of troponin with actin and tropomyosin: *J. Mol. Biol.* (査読有り) 352, 178-201.
- ⑳ Yang, J., Ohashi, T., and Yasunaga, T. Automatic detecting particles approach using adaboost-SVM: *Wseas Transactins on Biology and Biomedicine* (査読有り) 2, 163-168 (2005).

他 1 件.

[学会発表] (計 99 件)

- ① 広瀬恵子, **What cryo-EM images tell us about the mechanism of dynein motility.** 日本生物物理学会第 46 回年会, 2008 年 12 月 4 日, 福岡, 依頼講演.
- ② 安永卓生, クライオ電子顕微鏡法の現状と将来日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会 2008 年 12 月 久留米市, 招待講演.
- ③ Hirose, K. Cryo-EM studies of Microtubule Motors. Gordon Research Conferences on Muscle & Molecular Motors. 2008 年 6 月 29 日, New London, NH, USA, 招待講演.
- ④ 安永卓生, タンパク質の可視化技術の最前線, 市民フォーラム「生命科学の進歩とバイオマス利用最前線」、主催 日本生物工学会九州支部, 2007 年 8 月 10 日, 依頼講演.
- ⑤ 広瀬恵子, 微小管に結合した分子モーターキネシンおよびダイニンの構造解析. 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会研究討論会, 2006 年 12 月 21 日, 大阪, 招待講演.
- ⑥ 安永卓生, 齊藤良, 太田好則, 狩野要介, 若林健之: 生体内モータータンパク質の電子顕微鏡法による 3 次元構造解析, 第 50 回日本顕微鏡学会シンポジウム, 2005 年 11 月 1 日, 招待講演.
- ⑦ 安永卓生: 分子モーターのメカニズム解明に向けた電子顕微鏡による構造解析, 第 29 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2005 年 9 月 15 日, 招待講演.
- ⑧ Hirose, K., Nucleotide-Dependent Structural Changes in Kar3 Motor Domains Complexed to MTs. The American Society for Cell Biology, 44th Annual Meeting, 2004 年 12 月 4 日, Washington, USA, 依頼講演.

他 91 件

〔図書〕（計 5 件）

- ① 安永卓生（株）NTS、「ナノイメージング」
第一編ナノイメージングを可能にする顕微
鏡法・第3章電子顕微鏡を用いたナノイメ
ージング. p.44-57 (2008)
- ② Hirose, K. and Amos, L. A. Humana
Press (USA), Methods Mol. Biol.392
巻, 213-230 (2007)
- ③ Amos, L. A. and Hirose, K. Humana Press
(USA), Methods Mol. Med. 137 巻, 65-91
(2007).
- ④ Murakami K, Yumoto F, Ohki SY, Yasunaga
T., Tanokura M, Wakabayashi T.:
Structural basis for calcium-regulated
relaxation of striated muscles at
interaction sites of troponin with
actin and tropomyosin. Adv Exp Med Biol.
592, 71-86 (2007). Review.
- ⑤ 安永卓生, 丸善、実験化学講座 日本化
学会・編 共著 電子顕微鏡の節 p642-650
(2006) .

〔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

広瀬 恵子 (HIROSE KEIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエン
지니어リング研究部門・主任研究員

研究者番号：90357872

(2) 研究分担者

安永 卓生 (YASUNAGA TAKUO)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：60251394