

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07376

研究課題名（和文）軸系ダイニンの構造ダイナミクスと協働性

研究課題名（英文）Structural dynamics and cooperativity of axonemal dyneins

研究代表者

大岩 和弘 (Oiwa, Kazuhiro)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・主管研究員

研究者番号：10211096

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）：重要な生理機能を担う鞭毛・繊毛が示す波打ち運動創出のメカニズムを理解するために、生理学的条件下の軸系を分子レベルで可視化する液中高速原子間力顕微鏡技術（HS-AFM）と、溶液条件下で周期構造変化を鋭敏に検出するX線繊維回折技術を用いて、軸系内部構造の協調ダイナミクスを計測した。HS-AFM観察では、微小管上にダイニン外腕の24nm構造周期を確認、光開裂型ATPによる周期構造変化を計測した。X線繊維回折では、低Ca²⁺濃度下での高いらせん対称性を持つクラミドモナス鞭毛軸系が、高Ca²⁺濃度でその対称性を崩すことを見出した。らせん対称性の変化はダイニンと微小管との相対位置を変えて協働性を調整する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鞭毛・繊毛運動の理解は、その生理学的重要性と、繊毛の機能不全が引き起こす疾病群があることから、医学的重要性が高い。鞭毛運動の解析は前述の疾病発症メカニズムの解明につながり、さらには診断法、治療法の開発につながる事が期待される。

これに加えて、周囲の溶媒から激しい熱運動を受けながらも、高いエネルギー変換効率で一方向の運動を起こすダイニンの運動機能やアンサンブルとして機能する場合に示す高い協働性の知見は、分子マシン構築において重要である。自然が創り出した機能モジュールを組み合わせて構築する分子マシンの研究の進展において、軸系の運動メカニズムの知見は、新たな設計指針を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：To understand the coordination mechanism of dynein arms in the eukaryotic flagellar axoneme, we have investigated the structural dynamics of axonemal dyneins in the axoneme using the atomic force microscopy (AFM) and the X-ray fiber diffraction (XFD) under the physiological conditions. AFM confirmed the 24nm structural repeat of outer dynein arms in the topology of the axonemes. AFM imaging thus defined a detailed map of axonemal dyneins under the aqueous environment and provided the dynamics of these components.

In XFD studies, the axonemes aligned in the shear-flow were irradiated with the intense and stable X-ray in SPring-8, BL40XU. We explored the spatial arrangement of axonemal components under different [Ca²⁺], suggesting the change in the helical symmetry of 9 doublets in the axoneme coupled with [Ca²⁺]. Since Chlamydomonas changes the ciliary waveform to the flagellar one in response to the change in [Ca²⁺], the helical symmetric would relate to the waveform generation.

研究分野：生物物理学

キーワード：鞭毛 軸系 ダイニン タンパク質モータ X線繊維回折 原子間力顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の鞭毛・繊毛は気管や生殖管での異物排除、生殖産物の輸送など、体液の流れを介して様々な生理機能に参与する重要な細胞小器官である。この鞭毛・繊毛は、9本の周辺微小管が1対の中心小管を取り囲む「9+2構造」を基本構造としており、周辺微小管上に配列したダイニン腕が隣接する周辺微小管との間で引き起こす滑り運動によって、時間的・空間的に協調された波打ち運動を行なう。この波打ち運動の生成原理を明らかにするためには、約600種類の構成要素のそれぞれの特性を明らかにすること、軸系内部の構造を詳細に明らかにすることが必要である。鞭毛運動の変異株の蓄積があるクラミドモナスを用いた研究や、電子顕微鏡技術を用いた研究がこれまでに数多く行われて、鞭毛波形成に必須な要素が周辺微小管とダイニン腕であることが明らかになってきた(図1)。

申請者のグループは「軸系ダイニンの力学特性」を単一分子計測で明らかにし、「ATP加水分解に伴うダイニン分子の構造変化」を電子顕微鏡観察で明らかにし、「鞭毛軸系内の微小管とダイニン分子の3次元配置とその構造」をクライオ電子線トモグラフィーによって明らかにするなど、鞭毛波形成のメカニズムの解明に大きく貢献してきた。これらの成果は世界的に高く評価されている。しかしながら、鞭毛波形成の本質であるダイニンの自律的振動創出のメカニズムは未解明のままであった。軸系の構成要素のそれぞれの特性評価に続いて、次に取り組むべき重要な課題は、9+2構造という立体的な拘束条件の中で起きる構成要素間でのダイナミクスを分子レベルで理解することである。電子顕微鏡観察のようなスナップショットでなく、原子レベルに近い空間分解能でダイニンが真に機能する様子を可視化することは国際的な競争となっている。これを可能にするのは、液中高速原子間力顕微鏡(AFM)とX線繊維回折技術である。

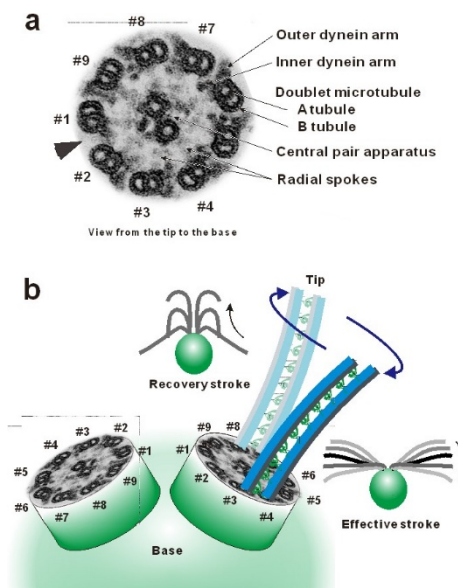


図1. 鞭毛軸系の横断面(電子顕微鏡観察像)。9本の周辺微小管が中心小管を取り囲む9+2構造を示す。ダイニン腕は、周辺微小管の側壁に配列している。

2. 研究の目的

鞭毛波形成の振動創出と波形伝播の理解のために、9+2構造という分子集合体の中で起きる構成要素間、特にダイニン分子間のダイナミクスを理解することを目的とする。生理学的条件下での軸系構造とその構造的束縛の中で機能するタンパク質集合体のダイナミクスを高い空間分解能で調べることは、先端的電子顕微鏡技術や単一分子計測を擁しても容易ではない。分子集合体のダイナミクスを観察するためには溶液状態でナノメートルの空間分解能を持つ計測が必要である。そこで、鞭毛軸系の中でダイニンの力発生を、高速原子間力顕微鏡によって実時間直接観察して、X線繊維回折によって軸系構造のダイナミクスを計測することで、ダイニン分子内の構造遷移ダイナミクスとダイニン分子間の協働性の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

実験に用いた材料は、クラミドモナスの鞭毛軸系と軸系ダイニン、および発現系を用いて調製したヒト細胞質ダイニンである。発現系が未だ確立していない軸系ダイニンの研究においては、鞭毛構成要素の変異株が豊富に得られるクラミドモナスの鞭毛軸系を利用して進めることが最善策の一つであり、構造知見が蓄積している細胞質ダイニンを比較対照とすることで、軸系ダイニンの構造変化を明確に評価できる(図2)。

計測手法は、分子レベルの空間分解能で生理学的条件下のダイニン腕を実像として可視化できる液中高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)技術と生体に近い環境下で原子レベルの空間分解能をもって時間的構造変化を検出するX線回折である。

HS-AFM 観察の第一段階は、ダイニン分子の構造ダイナミクスである。単離精製したダイニン分子のヌクレオチド依存的な構造変化を生理学的条件下で時間分解能 100-500msec で計測する。この時の構造状態を尾部ないし微小管結合部位・ストロークの角度で評価して、2 状態遷移、あるいは中間状態の存在を評価する。この際、単一分子の長時間計測と多数の単一分子によるアンサンブル平均の両者を用いて評価を行う。次に、微小管上に自己組織的に配列したダイニン腕の運動の可視化を行なう。脱膜した鞭毛軸糸を基板面に固定、低濃度 ATP 存在下で HS-AFM 観察する。この外腕ダイニンの動きを検出、単離精製したダイニン分子の構造変化と比較し、隣接するダイニン腕との構造比較を行うことで、ダイニン腕の局所的協働性を明らかにする。

X 線繊維回折実験では、タンパク質分子による X 線の回折はわずかであるため、強力かつ高コヒーレントな X 線源としてシンクロトロン放射光 SPring-8、BL45-XU 並びに BL-40-XU を用いて、軸糸の構造ダイナミクスの X 線回折解析を進めた。これまでに、報告者のグループは、X 線ビームに垂直な方向に鞭毛軸糸を流動配向させる技術を開発、鞭毛軸糸からの繊維回折計測に成功している。また、報告者らは、高輝度 X 線マイクロビームを用いることでショウジョウバエ精子の単一鞭毛から X 線回折像を得ることに世界で初めて成功するなど、その技術力と独創性は他に類を見ないものがある。

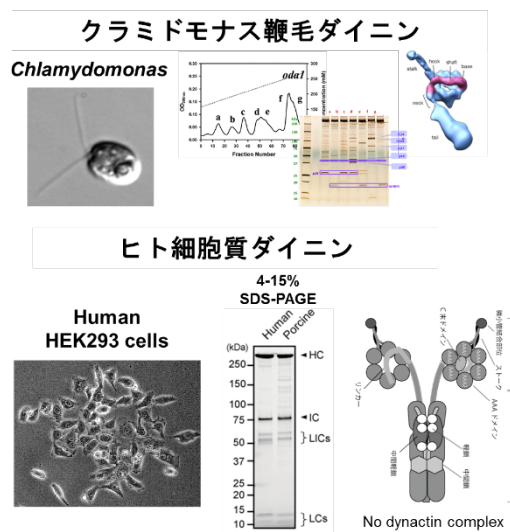


図 2. ダイニンの調製。軸糸ダイニンはクラミドモナスから、細胞質ダイニンは HEK293 細胞から採取する。

4. 研究成果

(1) ダイニン分子の HS-AFM 観察 (図 3)

ダイニン分子単体での構造変化を確認することにした。この観察では低解像度のダイニンの分子像を得ることができた。尾部と微小管結合部位が確認され、熱揺動でその位置を大きく変えることが確認できた。また ATP 添加に伴う構造変化を明らかにするために、ダイニンの結晶構造から HS-AFM 像を再構築するシミュレーションプログラムを作り、結晶構造と HS-AFM 像の対応を付けた。これによって、ATP 添加時のダイニン分子の頭部リング内の構造変化を明らかにできる可能性が拓けた。

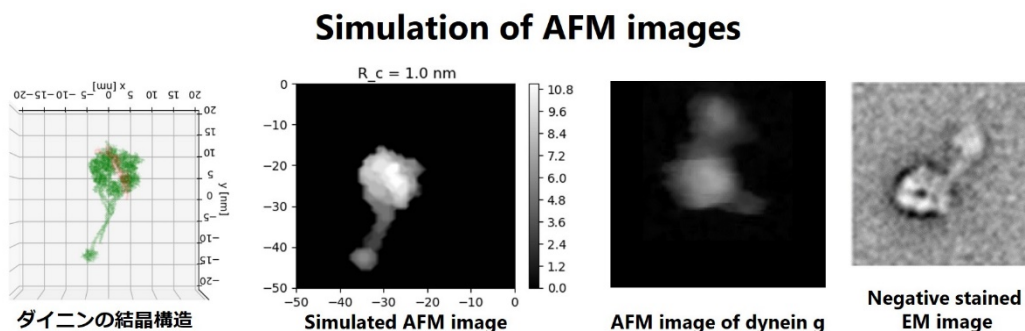


図 3. AFM によって得られたダイニンの分子像とそのシミュレーション。ダイニンの結晶構造(左端)から AFM 像を計算(左から 2 目)、実際の AFM 像(右から 2 番目)と比較。右端はネガティブ染色で得られた電子顕微鏡像。対応がよく取れていることがわかる。

(2) 軸糸内のダイニン腕の HS-AFM 観察 (図 4)

軸糸の観察とその中で生じているダイニン外腕の構造変化の可視化を試みた。マイカ基板上に吸着した大きさ 50nm ほどのダイニン分子の観察にくらべて、直径 200nm ほどの軸糸内にある 50nm の大きさのダイニン分子の観察は難易度が高い。クラミドモナスの鞭毛軸糸変異株を活用して、この困難を克服した。具体的には、軸糸の周辺微小管を束ねている DRC(ダイニン制御複合体)の欠損株を利用した。この軸糸を利用すると、細胞膜の脱膜によって周辺微小管が軸糸からほつれてくる。このような軸糸では、周辺微小管とダイニン腕の大きさがほぼ同程度であるために、その観察は軸糸全体に対してはるかに容易になる。かつ、ダイニン腕の統合性は維持され

ているので、協働性を観察するには適切な試料となった。さらに、マイカ表面に吸着させた鞭毛試料、および特定部位に分子マーカーを融合させた細胞質ダイニンを対象とした。軸糸では、周辺微小管とダイニン外腕に特異的な 24nm 構造周期が可視化された。光開裂型 ATP によるダイニン腕の構造変化は十分な分解能が得られず、明確な結論は得られていない。これは、軸糸がマイカ表面から 200nm ほどの高さを持つためである。そこで、チューブリンから重合させたシングルレット微小管にダイニン結合複合体 (DDC) を介して外腕ダイニンを 24nm 周期で配列させる方法を導入して HS-AFM 観察を試みたところ、24nm 周期構造は確認されるが、DDC の安定性が悪く HS-AFM 探針の掃引で周期構造が容易に破壊されてしまった。タンパク質架橋剤の処理によって構造は安定して観察できるようになるが、ATP 添加後の構造変化は判別できず、ダイニンの動的特性は化学架橋によって維持できていないようであった。この軸糸構造内でのダイニン腕の観察に関しては、解像度を上げるためのさらなる研究が必要である。

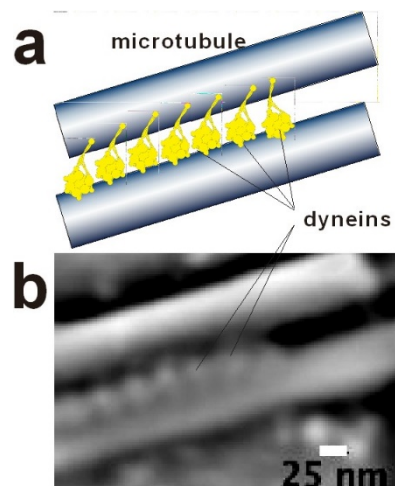


図 4. 軸糸の AFM 像。ODA の 24nm 周期とダイニンの内部構造がわかる。

(3) X 線繊維回折によるらせん対称性の変化の検出(図 5)

X 線繊維回折では、クラミドモナス鞭毛変異株の鞭毛を用いて計測を進めた。中心小管欠損株 *pf18*、ラジアルスポーク欠損株 *pf14*、 Ca^{2+} 濃度変化に対して波形変化を生じないクラミドモナス変異株 (*mbol*) の鞭毛軸糸を流動配向させて繊維回折像を得て、その子午線反射のプロファイルの解析を進めた。低 Ca^{2+} 濃度下では、 $1/24\text{nm}^{-1}$ の反射は子午線上の反射強度が低く、ローブを持つ層線反射のプロファイルを示した。一方、 $1/32\text{nm}^{-1}$ の反射は子午線上の強度が強い単一峰の強度プロファイルを示していた。高 Ca^{2+} 濃度下の鞭毛軸糸では、 $1/24\text{nm}^{-1}$ の反射は強度が弱まるとともに子午線上の強度を最大とする単一峰の強度プロファイルに変わり、 $1/32\text{nm}^{-1}$ の反射は層線反射のプロファイルに変化した。これらの結果は、周辺微小管上のコンポーネントはその構造周期を変えないが、軸糸全体として周辺微小管のらせん周期が Ca^{2+} 濃度に応じて変化したことを示している。興味深いことに、 Ca^{2+} 濃度変化に対して鏡像関係になる鞭毛波形の反応を示すホヤの精子鞭毛を用いてこのらせん対称性の変化を調べると、層線の出現がクラミドモナスと鏡像関係になっていることが明らかになった。このらせん対称性の変化はダイニンと微小管との位置関係をシフトさせるものであることから、鞭毛屈曲運動における協働性の調整メカニズムとしての重要性を示唆するものである。

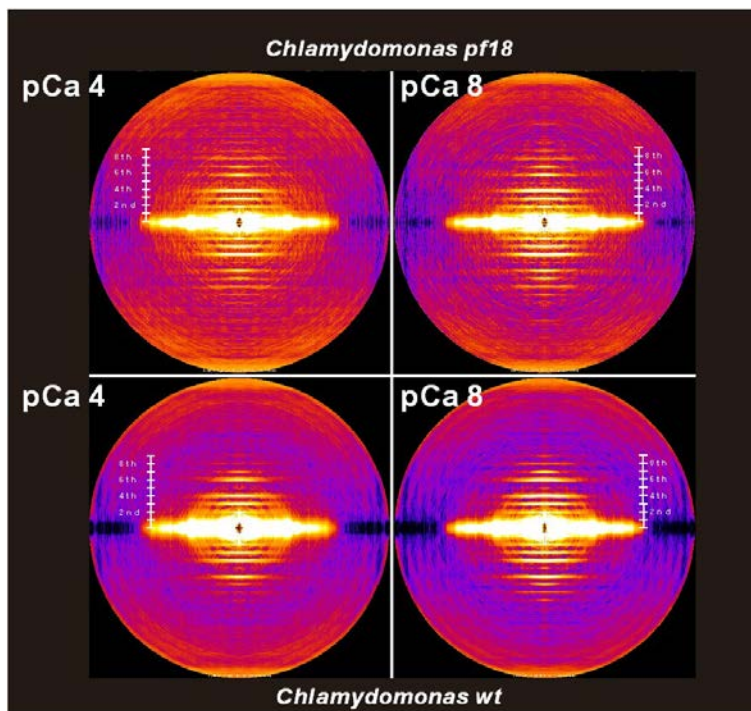


図 5. クラミドモナス鞭毛軸糸の繊維回折像。低濃度 Ca^{2+} 存在下では、らせん対称性が高いが、 Ca^{2+} 濃度が上昇すると対称性は崩れている。各層線のプロファイルを比較することでらせん対称性の変化が確認できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kaneko Taikopaul, Ando Suguru, Furuta Ken'ya, Oiwa Kazuhiro, Shintaku Hirofumi, Kotera Hidetoshi, Yokokawa Ryuji	4. 巻 0
2. 論文標題 Transport of microtubules according to the number and spacing of kinesin motors on gold nano-pillars	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 1,9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9NR01324E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Junya Kirima and Kazuhiro Oiwa	4. 巻 43
2. 論文標題 Flagellar-associated protein FAP85 is a microtubule inner protein that stabilizes microtubules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.17023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Kenta, Sakakibara Hitoshi, Oiwa Kazuhiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Force-Generating Mechanism of Axonemal Dynein in Solo and Ensemble	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2843 ~ 2843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21082843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Ryota Ibusuki, Akane Furuta, Kazuhiro Oiwa, Hiroaki Kojima, Ken'ya Furuta
2. 発表標題 Re-Design of Linear Molecular Motors
3. 学会等名 Biophysical Society Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Torisawa, Shuji Ishihara, Kazuhiro Oiwa
2. 発表標題 Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (Tppp3) facilitates microtubule bundling and network formation via its weak interaction with microtubules
3. 学会等名 Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Oiwa, Hiroyuki Iwamoto
2. 発表標題 Ca ²⁺ -dependent changes in helical symmetry of axonemal components of Chlamydomonas flagella studied by X-ray fiber diffraction
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Ishibashi, Kazuhiro Oiwa
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopic observations on demembrated Chlamydomonas axonemes and dynein arms
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misaki Sagawa, Misaki Shiraga, Hitoshi Sakakibara, Kazuhiro Oiwa
2. 発表標題 Repetitive buckling of microtubules driven by axonemal dynein arrays reconstituted on a microtubule
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro Oiwa, Ryota Ibusuki, Ken'ya Furuta
2. 発表標題 Creation of protein-based molecular motors moving on DNA nanostructure
3. 学会等名 THERMEC 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misaki Shiraga, Yuka Matsuda, Junya Kirima, and Kazuhiro Oiwa
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopic observations on demembrated Chlamydomonas axonemes and dynein arms
3. 学会等名 Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro Oiwa
2. 発表標題 Helical arrangement of axonemal components is a key for determination and Ca ²⁺ -dependent switching of waveforms of Chlamydomonas flagella
3. 学会等名 International Workshop Dynein 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenta Ishibashi and Kazuhiro Oiwa
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy on outer dynein arms aligned on microtubules
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Oiwa, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Hiroyuki Iwamoto, Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 Structural changes of Chlamydomonas and Ciona flagellar axonemes coupled with the change in [Ca ²⁺] studied with X-ray fiber diffraction
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Oiwa, Hiroyuki Iwamoto, and Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 Changes in the helical symmetry of the axoneme of Chlamydomonas flagella coupled with Ca ²⁺ concentrations
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology/European Molecular Biology Organization 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Oiwa, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Hiroyuki Iwamoto, Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 Change in the helical symmetry of Chlamydomonas and Ciona flagellar axonemes coupled with the change in Ca ²⁺ concentrations revealed by X-ray fiber diffraction
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Misaki Shiraga, Junya Kirima, Naoki, Kanatani, Yousuke Shimizu, Hitoshi Sakakibara, Kazuhiro Oiwa	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Pan Stanford Publishing, Ed. Keiko Hirose	5. 総ページ数 436
3. 書名 Handbook of Dynein (Second Edition) Chapter 9	

1. 著者名 ED. S.M. King, Vol 2 Chapter 1. Kazuhiro Oiwa, Hitoshi Sakakibara, Ken'ya Furuta	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 496
3. 書名 Dyneins: Dynein Mechanics, Dysfunction, and Disease, Chapter 1. Electron microscopy of isolated dynein complexes and the power stroke mechanism	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Google Scholar, Kazuhiro Oiwa https://scholar.google.com/citations?user=LT6CPAAAAAJ&hl=en 情報通信研究機構 未来ICT研究所 主管研究員 http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/oiwa/index.html 情報通信研究機構 未来ICT研究所 生体物性プロジェクト http://www2.nict.go.jp/frontier/seitai/

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
---------------------------	-----------------------	----