

3-2 情報素子としてのダイニンの作動機構

3-2 *Mechanisms of Dynein Functions as Information Processing Devices*

榊原 斉

SAKAKIBARA Hitoshi

要旨

我々、生体物性研究グループは、タンパク質モータを情報素子として技術応用することを目指して、その作動機構の研究を行っている。これまでに、真核生物鞭毛の原動力であり鞭毛の振動発生に重要なタンパク質モータ、“鞭毛ダイニン”の1種である内腕ダイニン亜種cの運動特性の計測を単一分子レベルで成功した。この測定によって、ダイニン亜種c分子が、レールである微小管の上を解離することなく連続的に運動することを見いだした。また、負染色電子顕微鏡法とその分子像の単粒子画像解析によって、ダイニン分子の詳細な構造を明らかにして、明らかになった構造状態から微小管の運動を引き起こすパワーストロークの実態を明らかにした。これらの研究成果はダイニン作動機構解明に大きく近づく成果であり、タンパク質モータを情報素子として利用する為に必要な基本情報が得られた。

We study mechanisms of motor-protein functions to find sources of new technology of information processing devices. I introduce here our recent results of the functions of flagellar dynein, which generate the force of flagellar beating of eukaryote and function as oscillator. We succeeded to measure the motility of single molecules of inner-arm dynein subspecies c (dynein c) and found that dynein c is a single headed processive motor, which is capable to move on protein filament without detachment in multiple steps. We also revealed new structure details of dynein c by using negative staining electron microscopy and single particle image analysis. In the work, we compared the structures of pre- and post- power stroke of dynein c and indicated aspects of dynein power-stroke. These evidences are very important to clarify the mechanisms of dynein functions.

[キーワード]

ダイニン, 微小管, in vitro 運動アッセイ, 負染色電子顕微鏡法, 単粒子画像解析

Dynein, Microtubule, In vitro motility assay, Negative-staining electron microscopy, Single-particle image analysis

1 まえがき

現在、ナノテクノロジーに関する研究が盛んに行われている。ところが、我々人間がナノマシンに興味を示すはるか以前(数十億年前)より、ナノマシンそのものを手に入れて利用してきた者たちがいる。それが生物である。そのナノマシンはタンパク質分子である。生物は、コンピュータや人工機械にはまねのできないような、柔軟で、巧みな能力を持っている。自律性、自己集合、自己修復、自己複製、学習、創造的な

どの能力である。この能力の基礎となる素子が「超分子」と呼ばれる生体高分子集合体で、タンパク質はこの超分子の代表的メンバーである。この超分子はナノメートルサイズの大きさながら、巧みな情報処理を行う能力を有する。これら超分子が細胞内で自律的に構築され機能することによって、生体特有の情報蓄積、適応能、情報伝達、情報受容等の知的な情報処理機能が発揮されるのである。

我々生体物性グループでは、この超分子、特にタンパク質の動作原理の解明と超分子の操

作・構築技術の開発を目指した研究を行っている。生物に見られるような柔軟な働きを備えた知的情報処理素子開発や新たなネットワークアルゴリズムへの発展が期待される研究分野である。研究対象として扱っている超分子は、タンパク質モータと呼ばれるタンパク質である。タンパク質モータは、生体の動き、細胞内の物質輸送・細胞の形態変化などの動力を発生するタンパク質である。筋肉やアメーバ運動などの担い手であるミオシンはアクチンというタンパク質が重合した繊維をレールとして運動する。また、鞭毛運動や神経軸索輸送などを起こすダイニンやキネシンはチューブリンというタンパク質が重合してできた微小管という繊維をレールとして運動する。大きさ十数nmのタンパク質モータ分子は、その一分子一分子が力発生するだけでなく、情報処理することのできる究極のナノマシンである。例えばダイニンは、微小管を特異的に認識し、普段は低いATP分解活性を微小管と結合したときのみ、上昇させて運動エネルギーを効率よく獲得する。また、ある種のタンパク質モータは、リン酸化及び脱リン酸化を受けることで機能のオン・オフが行われることが知られる。タンパク質モータの作動機構の解明によって得られた知識は、将来の情報素子開発技術として応用することができると考えられる。ここでは、タンパク質モータの中でも極めて特徴のある運動を生じるダイニンに着目して、その研究を紹介する。

2 ダイニン

2.1 鞭毛ダイニン

ダイニンは、真核生物鞭毛の動力として発見されたタンパク質モータである。鞭毛運動のほかに細胞核の運動、神経軸索内の細胞小顆粒の輸送など細胞内の運動にも大きな役割を持つ。細胞内の運動にかかわるダイニンを細胞質ダイニン、鞭毛運動の動力となるダイニンを鞭毛ダイニンと呼ぶ。

図1は、鞭毛横断面の電子顕微鏡像である。鞭毛と繊毛は基本的に同一で、細胞上の数が多いものを繊毛と呼ぶ。この構造は、ミドリムシの鞭毛から私たちヒトの気管の繊毛、精子の鞭毛

に至るまで共通である。中心に一对の微小管、周りに完全な円柱と半円の微小管が合体した九つのダブルレット微小管が存在することから9+2構造と呼ぶ。鞭毛ダイニンは、周辺ダブルレット微小管のA小管上に配列する。ダイニンは隣り合ったB小管と相互作用してその上を動くことにより、二つの周辺微小管の間に滑りを生ずる。その滑りが時間的空間的に制御され、鞭毛の規則正しい波打ち運動に変換される。最近の研究で、ダイニン自身に振動発生の能力があることが示されている [1]。鞭毛のダイニンは、1種類ではない。鞭毛には多数のダイニン亜種が存在し、それぞれ微小管を滑走させる能力を持つ独立したモータである。また、その特性、例えば滑り速度は、それぞれ異なっている。単細胞緑藻のクラミドモナスの鞭毛には、1種類の外腕ダイニンと7種の内腕ダイニンが存在するが [2]、私達のグループではこのうちの亜種cとfに着目している。

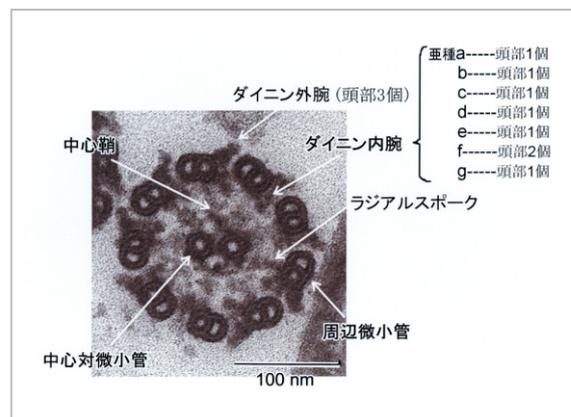


図1 クラミドモナス鞭毛軸糸横断面の電子顕微鏡像

2.2 ダイニンc

ダイニン亜種c (以降ダイニンc)の微小管を滑らせる速度は、亜種の中でもっとも速い [2]。ダイニンcは、1本の重鎖と2種類の軽鎖からなるタンパク質複合体で、その分子量は600 Kに及ぶ大型のタンパク質である。直径12 nmほどのリング状の頭部には二つの突起がある (図2)。そのうち長さ約13 nmの細い突起をストークと呼ぶ。この頭部とストークを合わせた構造は、ダイニン種間の共通性が高く、モータとしての機能を

この中に備える。ATPの加水分解は頭部で起こる。一方、微小管とはストーク先端で結合する [3][4]。ダイニンがATPと結合していない時、ストーク先端部は微小管と強く結合する。ATPがリング状頭部に結合すると、ストークと微小管から解離する。このように、ATPの結合とストークの微小管への結合は拮抗的に生ずる。長距離離れている二つの領域の間を何らかの情報が伝わっているはずである。

幹部及び基部は、ダイニン種間で差の大きな部位である。それぞれのダイニンは、機能する場所、輸送するものなどを基部で認識する。

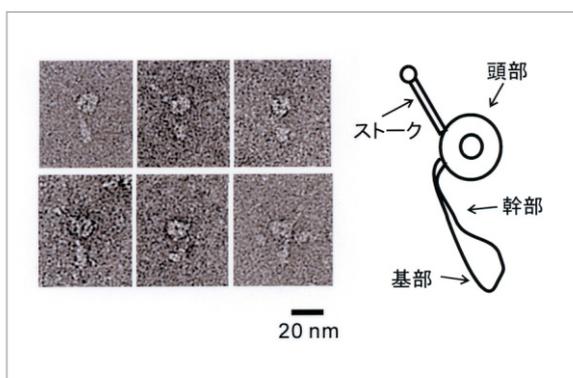


図2 ダイニンc分子の構造

ネガティブ染色したダイニンcの電子顕微鏡像と模式図。筆者自身が撮影。スケール=20 nm

3 ダイニンc単一分子による微小管滑り運動

3.1 in vitro運動アッセイによる解析

タンパク質モータの中には、たった1個の分子でアクチンや微小管などのタンパク質繊維の上を解離することなく複数ステップ連続的に運動を行うことのできるものがある。それらをプロセッシブモータと呼ぶ。プロセッシブモータであることの最大の条件は、タンパク質モータが運動サイクルを繰り返す過程で、常に繊維を保持し続けることである。モータ分子と繊維が解離すると、二つは熱揺動により短時間のうちに相互作用しない距離に引き離されてしまう。我々は、in vitro運動アッセイによる解析からダイニンcがプロセッシブモータであることを示した [4]。

ガラス基板上にダイニンcを吸着させてその上を運動する微小管を観察するin vitro運動アッセイ系において、ガラス面への吸着とそれに続く滑り運動を示した微小管の単位時間単位面積当たりの観察頻度とガラス基板上的ダイニンc密度との関係から、微小管と結合し運動するために必要なダイニンc分子数が推定できる [5]。測定した結果、微小管と結合し、運動するためには一分子のダイニンcがあればよいことが示された (図3)。微小管滑り運動は、0.1 分子/ μm^2 以下の低いダイニン密度においても観察された。そのとき、微小管はガラス基板上的1点で支持され、その点を中心に前後両端を左右に振りながら運動した (図4)。微小管を支持した1点には、ダイニンc一分子が存在し、連続的に微小管滑りを起こしたものと考えられる。前に述べたように、ダイニンcはモータ活性を持つ頭部を1個しか持たない。これまで、タンパク質モータの運動には最低2個の頭部が繊維と交互に結合解離を繰り返し、繊維を保持する必要があるとされてきた。ダイニンcの場合、これに当てはまらず、繊維(微小管)を保持する新しい機構が存在するはずである。このようにダイニンc単一分子により運動した微小管の滑った距離は、指数関数分布を示し、その距離定数は $3.6 \mu\text{m}$ だった。

3.2 Duty Ratio

従来、タンパク質モータが単一分子でアクチンや微小管などの上を解離することなく複数ステップ連続的に運動を行うためには、運動中のアクチン又は微小管との強い結合時間の割合 (duty ratio=強い結合時間/(強い結合時間+それ以外の時間)) を大きくすることが重要であると考えられてきた。代表的なプロセッシブモータ、キネシンの場合、二つある頭部のどちらか一方は運動中常に微小管と強い結合状態にある。ところが、ダイニンcのduty ratioは低い値であった。このことは、ダイニンcはduty ratioを増すということとは別の戦略で微小管を保持し続けていることを示している。

Duty ratioは、ガラス基板表面上のダイニンc密度と微小管滑り速度の関係から求めることができる [6]。タンパク質モータは、力発生過程において力を伝えるために繊維と強く結合すると

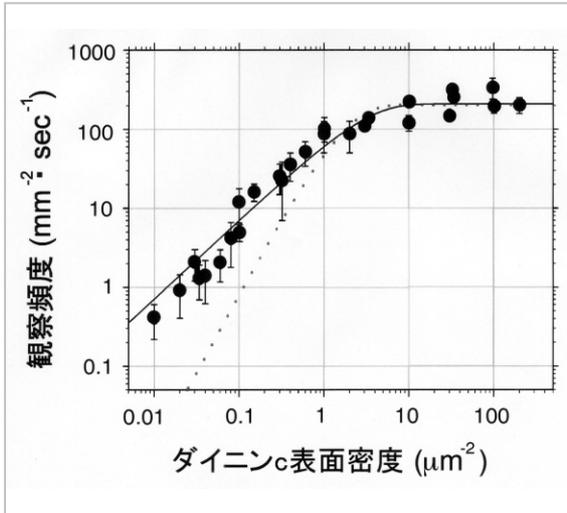


図3 ガラス面へ吸着し滑り運動を示した微小管の観察頻度 (Landing rate) とダイニンc表面密度との関係

ガラス表面への吸着とそれに続く滑り運動を示した微小管の時間当たり面積当たりの観察数をダイニンcの表面密度に対して両対数プロットした。実線は微小管滑り運動の発生にダイニン一分子で充分としたモデル。ダイニンの表面密度が低い領域で傾きが1に近づく。破線は微小管滑り運動の発生にダイニンが最低二分子必要であるとしたモデル。この場合、ダイニンの表面密度が低い領域で傾きは2に近づく。

考えられる。ダイニンcが1回の結合解離サイクルで一定距離 d 進むとすればATP濃度が十分高いときダイニンc一分子によって発生する運動の平均は $d / (\text{強い結合時間} + \text{それ以外の時間})$ となる。ダイニンc多分子により微小管が運動するとき、微小管は常に一分子以上のダイニンcと強く結合すると考えられる。ダイニンc多分子による速度は $d / \text{強い結合時間}$ となる。よって duty ratio は $(1 \text{ 分子による速度}) / (\text{多分子による速度})$ で求められる。ダイニンcによる微小管滑り速度は、ガラス表面上のダイニンc密度により大きく変化した(図5)。ダイニン密度が低く微小管が1点で支えられながら運動する条件では微小管滑り速度は平均 $0.7 \mu\text{m}/\text{秒}$ だった。一方、ダイニンc密度が高くなると微小管滑り速度は約 $5.1 \mu\text{m}/\text{秒}$ で飽和した。よって、duty ratio は、14%と見積もられる。運動中、微小管中のチューブリン分子と1対1の強い結合をしない間も、ダイニンc分子は微小管全体と結合を保ち続けるはずである。その結合は、複数のダイニンc分子が互いに運動を阻害しないような緩やかな結合なのであろう。

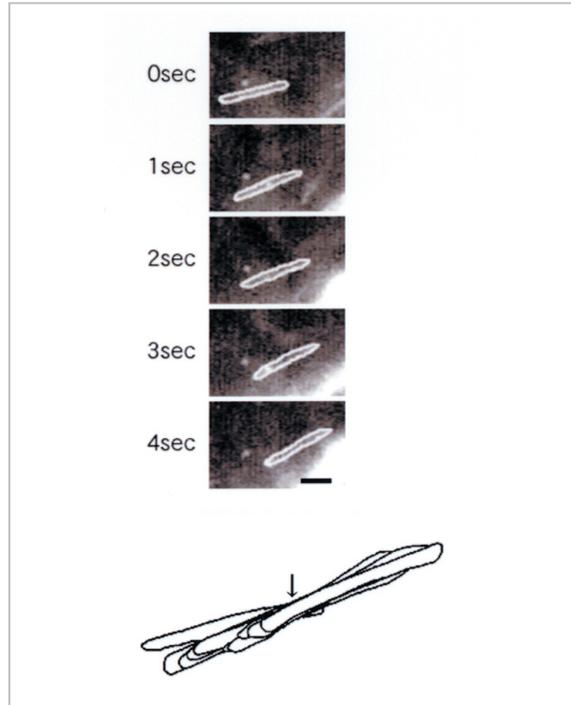


図4 ダイニンc、一分子上の微小管滑り運動

上図は暗視野顕微鏡像。微小管の暗視野像の縁取りをトレースした。下図は微小管像のトレース。微小管は1点(矢印)で支持され、両端を左右に回転しながら一方向に進んでいる。スケール= $2.5 \mu\text{m}$ 。ダイニンの表面密度は $1 \mu\text{m}^2$ 当たり平均0.05分子。

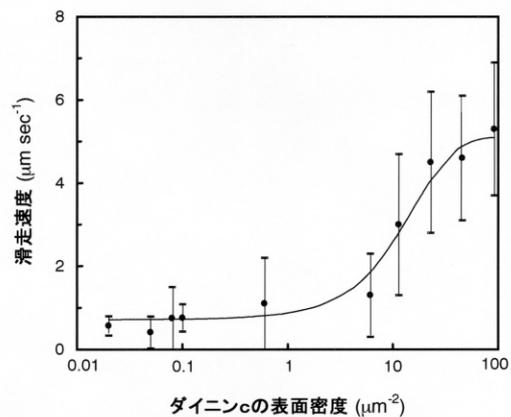


図5 微小管滑り速度とダイニンc表面密度との関係

微小管滑り速度はダイニンc表面密度上昇に伴い増加した。実線はUyedaらのモデル [6] で求めた式に近似したもの。

3.3 ダイニンcの単一分子力学測定

ポリスチレンビーズ(直径 $1 \mu\text{m}$) にビーズ1個当たり活性のあるダイニンcを平均1個以下吸着し、レーザートラップ法でダイニンcの単一分子力学測定を行った(図6)。ビーズはレーザーによ

り捕捉されているので微小管上を滑ることはないが、それでも 100 nm 程度(ダイニンc分子の数倍)の距離を連続的に運動した(レーザートラップの弾性係数は約 0.02 pN/nm)。これはダイニンcがプロセシブモータであることを補強するデータでもある。1分子のダイニンcが発生した力は1-2 pNだった。ビーズの変位を詳細に解析すると微小管を構成するタンパク質“チューブリン”二量体の構造周期に相当する 8 nm のステップ状変位が確認された。これは、ダイニンcが微小管上のチューブリン分子ごとに相互作用して運動を生じることを示唆する。また、負担のかかった状態でダイニンcが微小管上を運動するとき、数ステップ分後戻りすることがしばしば確認された。後戻りの発生頻度は、負担に応じて大きくなった。この負担に応じた後戻り運動は、ダイニンc分子が小さな分子のサイズで情報変換して自律的に出力調整を行う能力を持っているために生じると考えられる。これらの力学測定の結果は著名な国際科学誌である「Nature」に掲載された [4]。

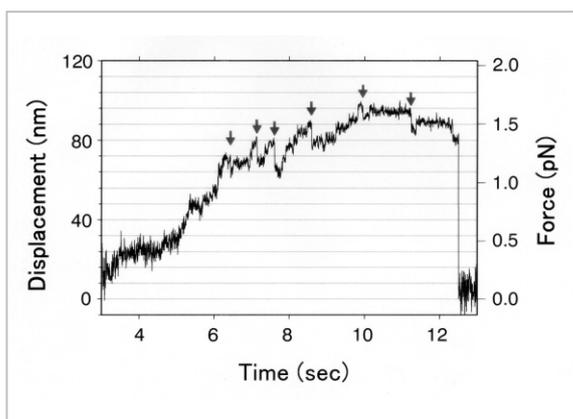


図6 ダイニンc単一分子の運動と力発生

ダイニンcは、1回微小管と相互作用すると複数ステップ連続的に運動した。8 nmステップが分かりやすいように 8 nm 間隔で架線を入れる。矢印は後戻り運動を示す。

4 ダイニンcの構造とパワーstroke

ダイニンcの分子像をネガティブ染色電子顕微鏡法と単粒子画像解析法を用いて解析した。その結果、ダイニンcの構造が 2 nm の精度で明ら

かとなり、また、ダイニンの運動サイクル中の異なる状態における構造の比較から、ダイニンが微小管に相互作用し滑り力を生じる過程、“パワーstroke”、でダイニン全体が 15 nm に及ぶ構造変化を起こすことを明らかにした [7]。

ダイニンcを最適な条件でネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察すると図7のようにリング状頭部、ストーク及び幹部がはっきり認識できる分子像が得られる。しかし、ダイニンcはいろいろな向きで透過電顕用グリッドのカーボン膜に吸着しており、しかも伸長しているものから折れ曲がっているものまで様々な形態の像が得られる。そこで、単粒子解析によるクラス分けと平均化による画像高精度化を行った。まず、ダイニンc電子顕微鏡写真から 10,000 を超す単粒子と認識されるすべてのダイニン分子像を切り出し、平行移動と回転移動でその位置を合わせる。位置のあった画像を 200 以上のクラスに分類し、クラス内で重ね合わせて平均化した。単粒子解析により、元のダイニン像では認識できなかった詳細な分子構造を見られるようになる(図8)。ダイニン頭部は、単純な対称的なリング構造ではなく、複雑で、表と裏の表面形状が異なるということが初めて分かった。また、頭部には7個のサブドメインがあることがはっきりした(図8A g)。

次に、ダイニンの力発生過程における構造変化を調べるためにパワーstroke前後の状態に相当するダイニンcを用意して構造解析を行った。ATP存在下でバナジン酸(Vi)をダイニンに作用させると、バナジン酸はリン酸(Pi)と入れ替わりにダイニンと結合し、パワーstroke前の中間状態(ダイニン-ADP・Pi)に対応する安定な複合体を作ることが、反応速度論的解析から分かっている [8]。バナジン酸を使いパワーstroke前に相当するダイニンc(ダイニン-ADP・Vi)と、パワーstroke後に相当するADPとリン酸を放出した後のダイニンc(アポーダイニン)を作り出し、電子顕微鏡像の単粒子画像解析を行った。その結果、パワーstroke前後の頭部構造に幾つかの点で違いがあることを見いだした。ADP・Vi-ダイニンの頭部は図8A-c,dのように比較的対称的でコンパクトであるが、頭部中央の間隙ははっきりしな

い。一方、アポ-ダイニンの頭部は図8 A-g, hのように非対称的で中央の間隙が明瞭だった。また、ストークと幹部の頭部からの突出する位置はADP・Vi-ダイニンのそれが頭部上で大きく離れていたのに対し、アポ-ダイニンのそれは互いに近接していた(図8 B)。頭部構造中に目印になるものを探し検討したところ、ストークの位置は移動しておらず、幹部の突出位置が頭部に対して移動していることが分かった。試料中に約6%という低い頻度で観察される分子形態があった。その分子の持つ幹部は大多数の分子像のそれに対して約10 nm長く、1アポ-ダイニンの幹部突出位置に対して180°反対に位置した。この延びた部分は正常分子では頭部上に位置しているものであった。幹部本体と頭部のドメインをつなぐ領域であるので、この構造を“リンカー”と名づけた。パワーストローク中、頭部はリンカーの付け根を中心に平均約25°回転することになる。ADP・Vi-ダイニン、アポ-ダイニンそれぞれの平均的なクラス像を幹部の位置で重ね合わせをすると微小管結合部位(ストーク先端)は15 nm近く動くことが分かった。このストロークにより微小管が動くものと考えられる。単分子計測で測ったステップサイズは8 nmであったが、単粒子画像解析で得られたストロークサイズは無負荷状態に相当する。負荷がかかるとステップサイズが小さくなるのかもしれない。

我々は、リンカーの存在と二つのヌクレオチド状態に対応する分子構造の比較(図8 B)から、ダイニンのパワーストロークモデルを提唱した。頭部における7個のサブドメインのうち運動に関係するATP加水分解は、幹部に一番近いサブドメイン1で起こるとされている。ストーク先端に微小管が結合すると、頭部ドメイン4と5の間が構造変化する。この構造変化がドメイン3、2、1と伝わり、ドメイン1に結合していたADP+Piの放出を促進する。その結果、ドメイン1が構造変化してドメイン1につながっているリンカーの角度が変化する。この角度変化後、リンカーは頭部リングに沿うようにドッキングを始める。このリンカーの頭部リングへのドッキングが頭部を回転させ、その結果、微小管を結合したストーク先端が大きく15 nm近くストロークし、微

小管が滑り運動するのである。ストーク先端から頭部への情報伝達、頭部サブドメイン間の協同的な働きがないとダイニンのパワーストロークはうまく機能しないはずである。ADP・Vi結合状態と非結合状態の頭部の形態変化は、頭部サブドメインが協同的に構造変化した結果であると考えられる。ダイニンの詳細な構造解析とパワーストロークの研究の成果は著名な国際科学誌である「Nature」に掲載された[7]。

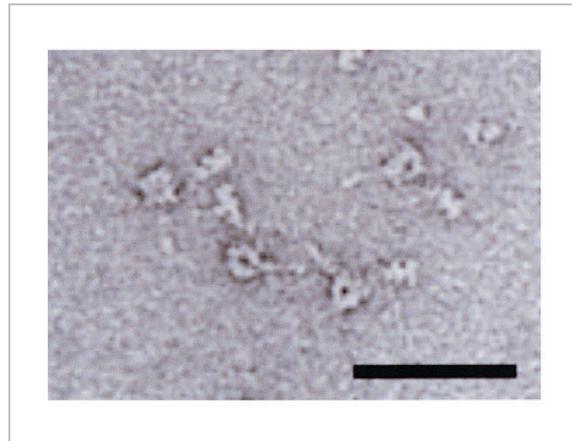


図7 単粒子画像解析に用いたダイニンcの負染色電子顕微鏡像

幹部、ストーク等、ダイニンの微細構造が明確に認識できる。スケール=50 nm

5 情報素子としてのダイニンの機能

タンパク質モータは、ナノテクノロジー、特にナノマシン構築に必要なキーテクノロジーをすべて持っている。例えば、タンパク質モータは繊維状の集合体を構築することができる。また、生体内において、この繊維の長さや太さはきちんと制御されている。これはナノ粒子の自己組織化・集合能にかかわる重要なキーテクノロジーである。また、タンパク質モータは、化学エネルギーを力学エネルギーに変換する超小型アクチュエーターである。常温、水溶液中で機能し、その入力レベルは熱雑音の20倍程度にもかわらずそのエネルギー変換効率は30-100%にも及ぶ。この、高効率変換の機構は、nmサイズの信号処理システムを構築する上で手に入れるべき知識の一つである。タンパク質モータの研究は、生物学・生物物理学上の重要性のみ

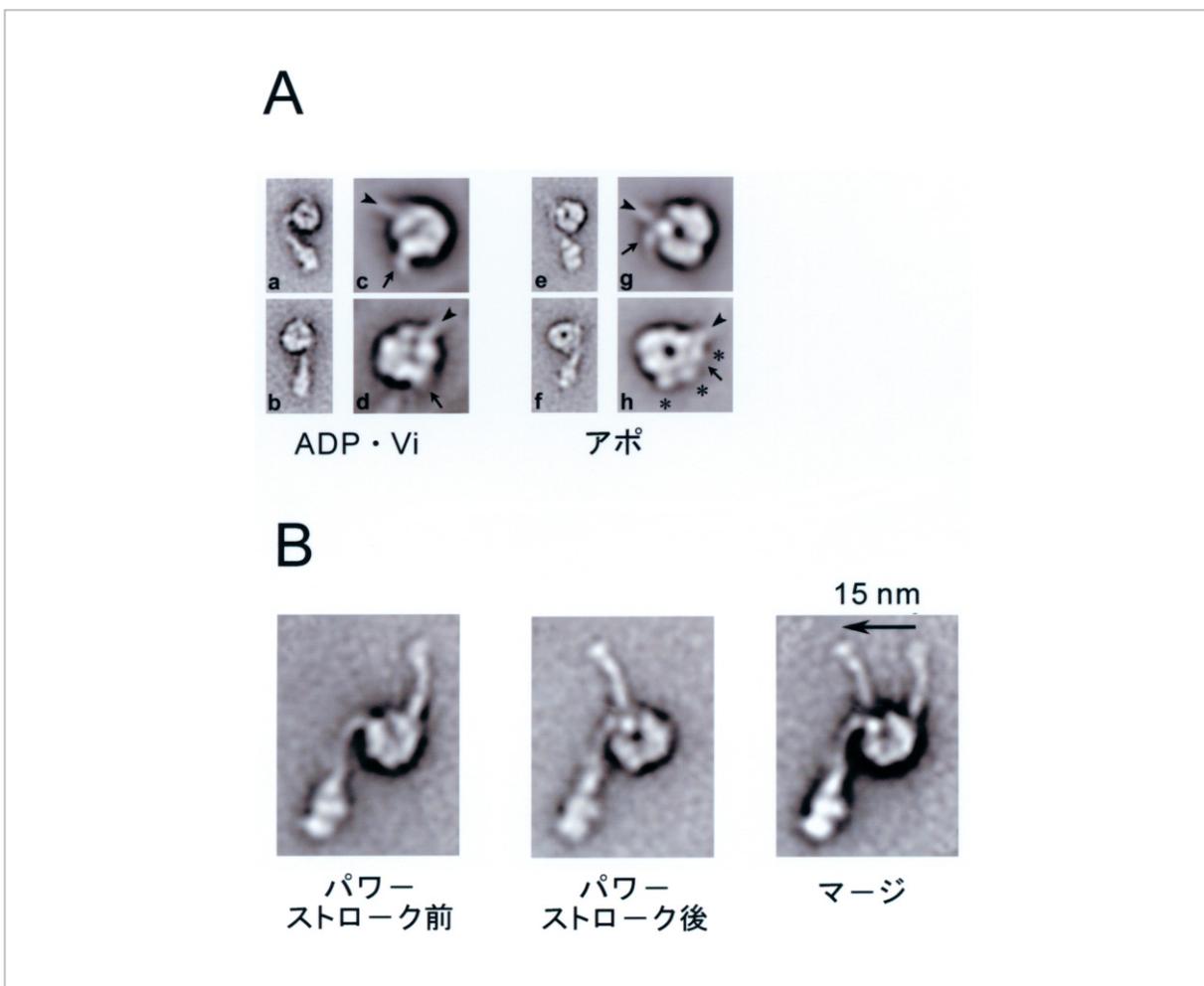


図8 ヌクレオチドによるダイニンの構造変化とパワーstroke

A:単粒子画像解析により明確化したダイニンc分子構造の詳細。支持膜への吸着方向によって左向き（上段）と右向き（下段）二つが、異なる様相を示した。(a-d)、ADP・Vi状態のダイニンc。(e-h)、加水分解物放出後のダイニンc。(c, d, e, h)、頭部のみで画像を平均化処理したもの。頭部の内部構造が明確に分かる。ADP・Vi状態のダイニンcに比べアポ状態のダイニンcは頭部内のチャンネルが明確で、頭部の非対称性が増す。hではサブドメイン(*)を確認できる。矢尻はストークの基部を、矢印は幹部の基部を表す。パワーstroke後、ストークと幹部の基部は近接した位置に移動した。B:ダイニンc分子全体のパワーstrokeにおける構造変化。頭部での構造変化の結果、ストーク先端の微小管結合部位は約15 nm移動する。[7]より加変引用。

ならず、工学的な意味でも貴重な知識を与えることができる基礎研究として位置付けられる。

ダイニンはタンパク質モーターの中でナノテクノロジーの基本情報を最も多く持つものの一つである。ダイニンを動力とするマイクロアクチュエーター・鞭毛は、200種以上のタンパク質から巧妙な9+2構造が自律的に構築される(図1参照)。その運動は、個々のダイニン分子が自律的に動作し、力発生を組織化・統合化して美しい正弦波様鞭毛波を作り出す。本研究では、ダイニンcが負担に応じた数ステップの後戻り運動することを見いだした。これは、ダイニンc分子が小さな分子のサイズで情報変換して自律的に出

力調整を行う能力を持っているために生じると考えられる。すなわち、ダイニン自身に張力センサーが内蔵されており、生体内においては他の分子の出力状況をフィードバックしてシステム全体の動きに反映、組織化していくと考えられる。このような自律分散の機構はナノマシン構築のキーテクノロジーであると考えられる。また、パワーstroke前後のダイニンの詳細な構造解析から頭部サブドメインが協同的に構造変化すること、ストーク及び頭部リングを何らかの情報が伝わることなどが示唆された。その機構の解明から、ナノマシン構築におけるサブドメインを組み上げていくときのドメイン間

の連絡、活性制御のキーテクノロジーにつながる情報が得られると考えられる。

6 むすび

単頭の鞭毛ダイニン“ダイニンc”を使い、ダイニンの単一分子運動計測を行った。その結果、ダイニンcがプロセシブモータであること、微小管上のチューブリン分子を認識しながら運動することが分かった。ネガティブ染色電子顕微鏡法と単粒子画像解析法によりダイニン頭部構造の詳細を明らかにした。頭部構造はADP・Piを結合したパワーストローク前には比較的対称的な形態を示したがADP及びPi放出で非対称的な形に変化した。頭部の上には幹部につながる

リンカーが存在し、パワーストロークでは頭部全体が回転していた。

ダイニンの作動機構の解明には、まだ、ダイニンが微小管を保持するための弱い相互作用の実態、ダイニン上の微小管結合部位-ATP結合部位間情報伝達の正体、リンカーと頭部リング間の相互作用などを明らかにしていく必要がある。

本研究は、生体物性グループの大岩和弘博士(グループリーダー)、小嶋寛明博士、及び坂井由佳子氏を中心として行ってきた研究であり、東京大学医科学研究所の片山栄作博士と英国リーズ大学構造分子生物学のStanley Burgess博士、Peter Knight博士との共同研究によって大きな進展を見せている。

参考文献

- 1 C. Shingyoji, H. Higuchi, M. Yoshimura, E. Katayama, and T. Yanagida, Nature, Vol. 393, 711-714, 1998.
- 2 O. Kagami and R. Kamiya, Journal of Cell Science, Vol. 103, 653-664, 1992.
- 3 M. A. Gee, J. E. Heuser, and R. B. Vallee, Nature, Vol. 390, 636-639, 1997.
- 4 H. Sakakibara, H. Kojima, Y. Sakai, E. Katayama, and K. Oiwa, Nature, Vol. 400, 586-590, 1999.
- 5 W. O. Hancock and J. Howard, the Journal of Cell Biology, Vol. 140, 1395-1405, 1998.
- 6 T. Q. P. Uyeda, H. M. Warrick, S. J. Kron, and J. A. Spudich, Nature, Vol. 352, 307-311, 1991.
- 7 S. A. Burgess, M. L. Walker, H. Sakakibara, P. J. Knight, and K. Oiwa, Nature, Vol. 421, 715-718, 2003.
- 8 T. Shimizu and K. A. Johnson, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 258, 13833-13840, 1983.



神原 啓

基礎先端部門関西先端研究センター生体物性グループ主任研究員 理学博士
タンパク質モータの生物物理