

ウニ精子鞭毛運動を誘起するダイニン分子の活性制御機構の解明 Regulatory mechanisms of dynein molecule essential for flagellar movement in sea-urchin spermatozoa

真行寺千佳子

Chikako SHINGYOJI

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻・助教授
Associate Professor, Department of Biological Sciences,
Graduate School of Science, University of Tokyo

The objective of this study is to elucidate the mechanism regulating the activity of dynein, one of the major groups of molecular motors or motor proteins, in flagellar oscillatory movement. To gain an insight into the mechanism of oscillation, I examined whether the dynein is an independent oscillator or its oscillation is regulated through interaction with microtubules within the flagella. To achieve this purpose, I developed a new experimental system for analyzing the dynein oscillation at the molecular level. I succeeded to measure the force of a single dynein molecule, which is about 6 pN, and furthermore I found that the force of the single dynein molecule oscillated. The results indicate that the oscillation of the single dynein may be a basic mechanism underlying flagellar beating.

1. 研究目的

ダイニンは、様々な細胞機能に関わるモーター蛋白質である。ダイニンは、ATP分解酵素活性を持ち、ATP分解時に出る化学エネルギーを力学エネルギーに変換して力を出し、微小管の上を一定の方向に滑ったり、微小管同士の間を滑りを起こす。このような運動を行う際の化学エネルギー/力学エネルギー変換の機構、ダイニン1分子がどのようにして力を出し微小管上を滑るのか、また運動の方向がなぜ一定なのかなど、ダイニンの運動の制御の詳細はまだ明らかにされていない。

ところで、鞭毛・繊毛運動の最大の特徴は「振動」である。鞭毛は、根元で周期的に屈曲を形成し、その屈曲を後方へと伝える(図1 a)。この周期的屈曲形成の原動力は、鞭毛軸系の中でダブルレット微小管同士の間で起こる滑り運動であり(図1 c)、この滑り運動を担うのが、ダイニン分子である(図1 d)。ダイニンによる微小管の滑りの方向は一定であるが(図1 d)、鞭毛全体では屈曲は細胞体(図1 aでは精子の頭部)に対して両方向に交互

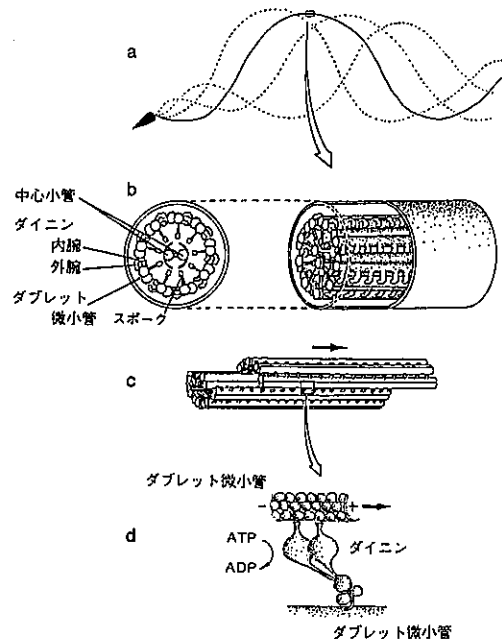


図1. a. ウニ精子鞭毛運動の模式図.
b. 鞭毛の横断面. c. 滑り運動.
d. ダイニン1分子.

に形成され、振動する。では、「振動」の起源はどこにあるのだろうか？ 鞭毛軸系には200種類以上の蛋白質が存在し、その内のいくつかがダイニンの活性を様々な形で制御していると考えられている。本研究では、ダイニン以外の蛋白質がダイニンの滑り活性を「振動」するように制御しているのか、それともダイニンそのものに「振動」の特性があるのかを解明することを目指した。

2. 研究経過

鞭毛運動にみられる振動は、9本のダブルレット間に引き起こされる滑りの「量と速度」の変化として制御されていると予想される。9本のダブルレット内で、ダイニンの滑り活性は規則的に切り替わるように制御されている可能性もある。しかし、振動を起こす機構は、鞭毛の根元付近のみに存在するのではなく鞭毛のすべての場所に同じように存在している（文献1）。したがって、鞭毛の振動の起源は、「9+2」構造における滑りの制御機構と密接に関連しているのだろうと想像される。鞭毛軸系から微小管の滑りを誘導するには酵素が用いられる。トリプシンにより処理した軸系ではダブルレットが滑り出すが、鞭毛の振動現象は見られないので、トリプシン処理等を用いると滑りの制御は失われてしまうと考えられる（文献2）。これに対し、エラスターゼで処理した軸系はある条件でダブルレット間に滑りを起こすことができるが、同時にこの軸系は滑りの制御機構を保持している（文献3）。そこで、エラスターゼ処理軸系を用いてダイニンの力学特性を解析する実験を計画した。

まず、1 mM ATP中でエラスターゼ処理をした軸系を滑らせるると、図2に示したようなダブル

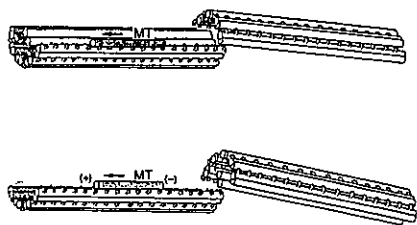


図2. エラスターゼ処理軸系の滑り運動では、ダブルレット微小管の束に分かれる。

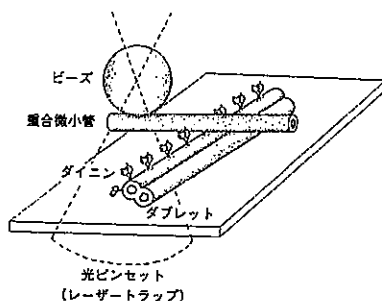


図3. ダイニン1分子の力測定。

レットの束を得ることができる。この束の端のダブルレット上に露出したダイニンに対して重合微小管を作用させた。図2のように、重合微小管をダイニンの列に添わせるように作用させると、微小管はダイニンの列にそって滑る。しかしこのような状態では、多数のダイニンが微小管と相互作用してしまうため、ダイニン1分子の力学特性を解析することはできない。そこで、重合微小管をダブルレット上のダイニンの列に対して斜めまたは直角に作用させた。

微小管に直径1 μm の蛍光ポリスチレンビーズを付着させ、このビーズを光ピンセット（レーザー光）で捕捉して、ダイニンが微小管を動かしたときのビーズの変位をnm分解能で計測し、ビーズの変位からダイニンによる微小管の変位とダイニンの出す力を求める（文献4）。ダイニンの列に対して作用させる微小管の角度が小さくなれば微小管と相互作用するダイニンの数は増え、角度が大きくなれば相互作用するダイニンは少なくなると予想される。ほぼ直角に作用させた時、内腕と外腕のそれぞれ少なくとも1つずつ、合計2分子が微小管と相互作用できる。

次に、さらに測定の精度を上げるために、1本の独立したダブルレット上に露出したダイニンについて測定を行った（図3）。エラスターゼ処理をした軸系をcaged ATPとともにチェンバーに入れ、紫外線を照射することによりcaged ATPからATPを放出させて軸系からダブルレットを1本1本になるまで滑らせる。このチェンバーにはビーズを付けた重合微小管も入れておき、微小管を直角に近い角度でダブルレット上のダイニンと相互作用させた。ここで紫外

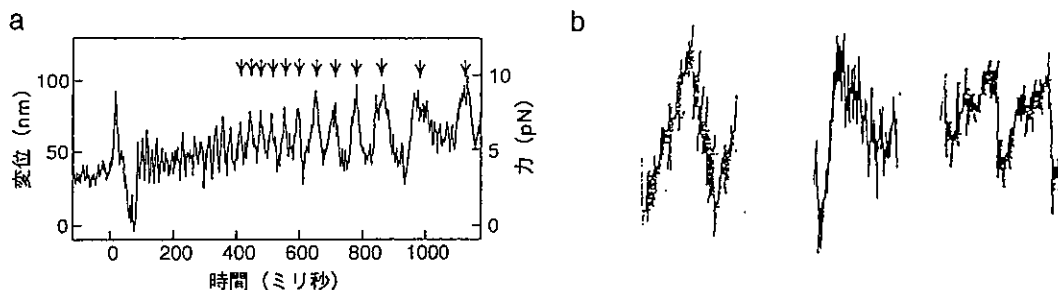


図4. a. ダイニンの発生する力の振動の例. 矢印は、力のピーク。
b. 振動波系の3つの異なる例.

線照射をするとその直後に微小管の変位が観察されるはずである。この実験系では、1本のダブルレットがガラス面上で様々な方向を向くので、多くの場合内腕と外腕のうちのいずれか一方のダイニンの1つが微小管と相互作用する確率が高いと予想される。また、軸系をあらかじめ高塩濃度処理してダブルレットから外腕のみを抽出した後の残りの軸系を用いて同様の実験を行った。この場合は、1本のダブルレット上に内腕のみしか存在しないので、ほとんど1分子のダイニンの力を測定できる。

3. 研究成果

紫外線照射により ATP を与えるとその直後に微小管の変位が観察された。ダブルレットの束の端のダイニンに対して微小管をほぼ直角に作用させた時、内腕と外腕のそれぞれ少なくとも1つずつ、合計2分子が微小管と相互作用できると予想されるが、この時測定された力は、約12 pNであった。これに対し、ダブルレット1本と微小管を相互作用させた場合には、微小管の変位は約100 nmであった。この実験系では、1本のダブルレットがガラス面上で様々な方向を向くので、多くの場合内腕と外腕のうちのいずれか一方のダイニンの1つが微小管と相互作用する確率が高いと予想される。この時測定されたダイニンの力の平均値は、約6 pNであった(文献4)。また、ダブルレット上に内腕のみしか存在しない条件では、1分子のダイニンの力を測定できる確率がさらに高くなるが、この時の力は、やはり約6 pNであった。従って、内腕

も外腕も同じ大きさの力を出すと考えられる。以上のように、少なくとも1本のダブルレットを用いた測定では1分子のダイニンの特性を測定できていると考えられ、ダイニン1分子が出す力は約6 pNであることが明かとなった。

さらに興味深いことに、これら1本のダブルレット上のダイニンの力測定の際に、変位と力の発生にともなって振動が観察されることがわかった(図4 a)(文献4)。内腕と外腕が共に存在するダブルレットでは、測定例中約50%で、内腕のみのダブルレットでは約80%で振動が認められた。ダブルレットの束を用いた実験では、今のところ振動は見られていない。振動の周波数は、0.7 mM ATP のとき約70 Hzであり、時間とともに小さくなった。Caged ATP の光分解後 ATP 濃度は時間とともに減少するので(溶液中に hexokinase と glucose を含むため)、この周波数の減少は、ATP 濃度に依存したダイニンの活性の変化を反映しているものと思われる。

鞭毛の振動運動は鞭毛のどこにおいても起こるので、振動の起源がダイニンにあるかもしれないと予想はしていた。しかし、軸系上に付着させたビーズの高速振動も観察されているので、ダイニンはいくつもの分子が集まったとき振動するのではないかと推測していた。しかし、今回の発見は1分子のダイニンの振動である。まさか1分子のダイニンで振動が起こるとは、この現象を見つけた私にとっても大きな驚きであった。

図4 bは、振動の3つの例について一部を括

大したものである。このように振動は、行き（力の増大方向）と帰り（力の減少方向）とが対称なもの（左）、行きが速く帰りが遅いもの（中央）、行きが遅く帰りが速いもの（右）というように一定していない。しかしいずれの場合にも、1サイクル中にくつつかのステップが認められる。ステップの大きさは8 nm に近いようであるが、多くのサイクルでは2-4ステップがみられる。各ステップが1分子のATPの分解に相当するのかどうかはよく解らない。しかし、いずれにしてもダイニンの2つの頭部が交互に数ステップ行っては戻るといった過程で振動しているようである。では何がこの前進と後退を制御しているのだろうか？その答えは残念ながらまだ解らない。力を発生しているときにしか振動が見られていない事を考えると、ダイニン分子のどこかに力を感知している部分があり、それがダイニンの2つの頭部の動きを制御している可能性も考えられる。

4. 今後の課題と発展

以上のように、鞭毛の振動の基本はダイニン1分子にあるのかもしれないということが明らかとなった。鞭毛の振動は、「9+2」構造の中のどのダブルレット上のダイニンがいつどのくらいの活性をもつかを制御することにより起こるのだらうと思われる。この活性制御機構の基本がダイニン1分子の振動の変化にあるのかもしれない。鞭毛の振動は50-100 Hzと高速なのでダイニンの活性状態の制御は、たぶん鞭毛軸系の屈曲の大きさ（曲率）等の力学状態の変化などを感知して行われるのではないかと想像される。私は最近、屈曲がダイニンの活性を変えることを実験的に示すことにも成功している。したがって、ダイニン1分子の振動の制御も力学状態の変化をフィードバックする機構であるとする、この力学状態を感知する機構が鞭毛軸系全体のダイニンの活性の制御のループの基本として（またダイニン1分子の中にも？）組みこまれていると考えることもできそうである。この点が解明されれば、鞭毛の振動の仕組みだけではなく、モーター蛋白質1分子の機能の理解にも大きな一歩となるにちがいない。

ダイニンは、細胞の多様な機能（プロテインキネシス、DNAトランスアクションなど）に関わるAAA⁺スーパーファミリーの一つである。このファミリーの他のメンバーは六量体、五量体、七量体などの多分子で機能するのに対し、ダイニンは1分子

内に6つのドメイン構造をなすことにより、1分子で多分子と同等の機能を持っている可能性が高いと考えられている。今後、このようにユニークな特性を持つダイニンの機能を解明することにより、AAA⁺スーパーファミリーの機能の解明にも繋がることが期待される。

5. 参考文献 (1, 2) および 発表論文リスト (3-6)

- 1) Takahashi, K., Shingyoji, C. and Kamimura, S. (1982)
Microtubule sliding in reactivated flagella. *Soc. Biol. Symp.* XXXV, 159-177.
- 2) Shingyoji, C. and Takahashi, K. (1995)
Cyclical bending movements induced locally by successive iontophoretic application of ATP to an elastase-treated flagellar axoneme. *J. Cell Sci.*, 108: 1359-1369.
- 3) Yoshimura, M. and Shingyoji, C. (1999)
Effects of the central pair apparatus on microtubule sliding velocity in sea urchin sperm flagella. *Cell Struct. Funct.*, 24: 43-54.
- 4) Shingyoji, C., Higuchi, H., Yoshimura, M., Katayama, E. and Yanagida, T. (1998)
Dynein arms are oscillating force generators. *Nature*, 393: 711-714.
- 5) Omoto, C. K., Gibbons, I. R., Kamiya, R., Shingyoji, C., Takahashi, K. and Witman, G. B. (1999)
Rotation of the central pair microtubules in eukaryotic flagella. *Mol. Biol. Cell*, 10: 1-4.
- 6) Bannai, H., Yoshimura, M., Takahashi, K. and Shingyoji, C. (2000)
Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *J. Cell Sci.*, 113: 831-839.