

論文の内容の要旨

論文題目

Three-dimensional structures of the flagellar dynein-microtubule complex by cryoelectron microscopy

和訳

クライオ電子顕微鏡を用いた鞭毛ダイニン-微小管複合体の三次元再構成

指導教員

廣川 信隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月 入学

医学博士課程
分子細胞生物学専攻
小田 賢幸

研究の背景

鞭毛は真核生物が持つ複雑な細胞小器官であり、細胞外に水流を生み出すことによって様々な生命現象に関わっている。近年注目されている現象としては、発生の左右非対称性の決定に関わるノード流や腎臓における水流センサー機能とその遺伝疾患である polycystic kidney disease が挙げられる。鞭毛が波打つ運動は ATP をエネルギー源とするモータータンパク質の鞭毛ダイニンによって引き起こされている。ダイニンがどのようにメカノケミカルエネルギー変換を行っているのか理解することは大変重要なことである。

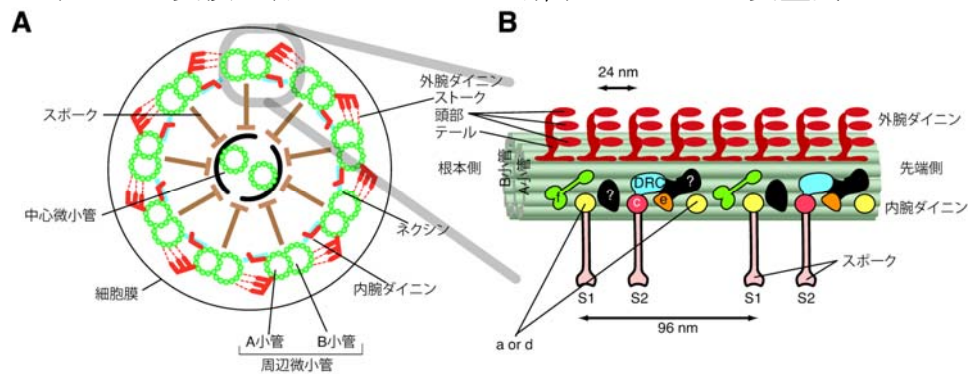
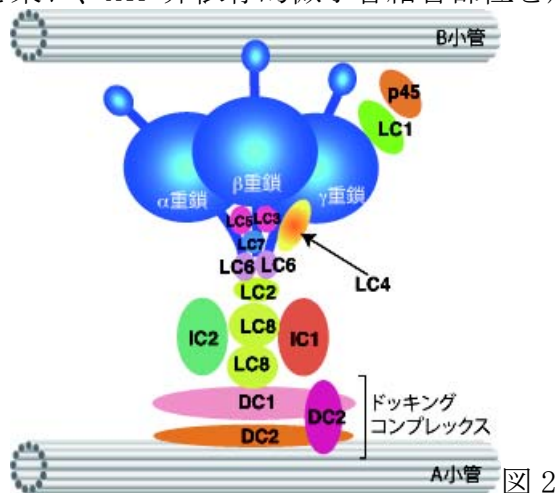


図 1

鞭毛や繊毛の内部には軸糸(axoneme)と呼ばれる構造があり、微小管が周辺に9本、中央に2本が収まっている(図1A)。この9本の周辺微小管の間には軸糸ダイニンが存在し、ATPの加水分解で得られるエネルギーを使ってA微小管とB微小管の間に滑り運動を起こす。軸糸ダイニンは、その位置から内腕ダイニンと外腕ダイニンに分けられる(図1A, B)。1965年の発見以来、外腕ダイニンについて多くの生化学的または構造学的研究がなされてきた。外腕ダイニンは分子量2MDaの大きなタンパク複合体で、 α 、 β 、 γ の3つの重鎖と2つの中間鎖、10ほどの軽鎖からできている(図2)。重鎖の4500アミノ酸のうち、C末端側2/3は6つのAAA+ドメインからなる頭部と、ATP依存的微小管結合部位であるストークが占める。中間鎖は3つの重鎖を束ね、ATP非依存的微小管結合部位を形成する。



これまでダイニンがどのようにモーター活性を持つのかについての議論は微小管と結合していないダイニンの構造変化をnegative stainingを用いて二次元的に解析した研究が中心となっていた。より生理的条件に近いデータを得るには微小管と結合したダイニンの三次元構造変化を観察する必要があった。この条件を満たすために、私は*in vitro*で再構成した外腕ダイニンと微小管の複合体をクライオ電子顕微鏡で撮影し、そのATP依存的構造変化を三次元レベルで観察することに成功した。

実験の方法

鞭毛を持つ植物プランクトンであるクラミドモナスから鞭毛を単離し、高濃度のカリウム塩で外腕ダイニンを溶出した。バッファー交換後、ダイニンを濃縮しチューブリン二量体と混合して30°Cで共重合させた。その後、スクロースクッション超遠心法によりダイニン-微小管複合体を精製した。

精製した複合体を直径2ミクロン程度の穴の開いたカーボン膜に吸着させ、-180°Cの液体エタンで急速凍結した。この凍結試料をクライオ電子顕微鏡で撮影し、無固定無染色の原子顕微鏡像を得た。

得られた写真は自作のプログラムによって小さなフィラメント断片に切り出され、三次元再構成に必要な角度及び平行移動パラメータを与えられた。これらの断片画像に対してBrandeis大学のDr. Grigorieff研究室より公開さ

れている FREALIGN プログラムを用いてパラメータ補正と三次元再構成を行った。

補足実験として、ダイニン-微小管複合体の急速凍結レプリカの作成や水溶液中での微小管滑り運動観察を行った。

実験結果

チューブリンと外腕ダイニンを共重合すると、すでに 1979 年に Haimo らによって報告されている通り、二本の微小管がダイニンによって架橋され、捻れ構造をもつ複合体が形成された(図 3)。この捻れ構造により複合体の 360° すべての方向からの投影像を得ることができた。また、この複合体上には軸糸上と同じく 24nm 周期でダイニンが規則正しく並んで微小管に結合していたため、データ解析がより容易になった。微小管上を一系列に並んでいるダイニンがモーター活性を有することは、溶液中で実際に微小管がダイニン列の上を滑ることを観察して証明した。また、 α 鎖の欠失変異株から外腕ダイニンを抽出して同様に複合体を作り、野生株と変異株の三次元像の比較から複合体における重鎖の並び順が軸糸内と同じであることを確認した。

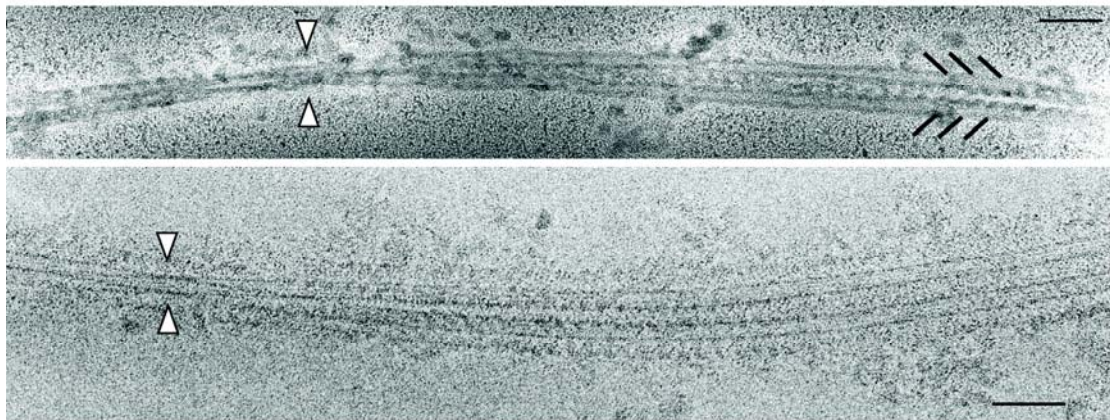


図 3

この複合体に ATP とバナジン酸を加えると、ATP の加水分解によって生じるリン酸と Va イオンが入れ替わり ADP+Pi 状態を維持したまま試料の撮影をすることができる。これにより apo 状態(図 4A)だけでなく ADP+Pi 状態(図 4B)の電子顕微鏡像を得ることができた。

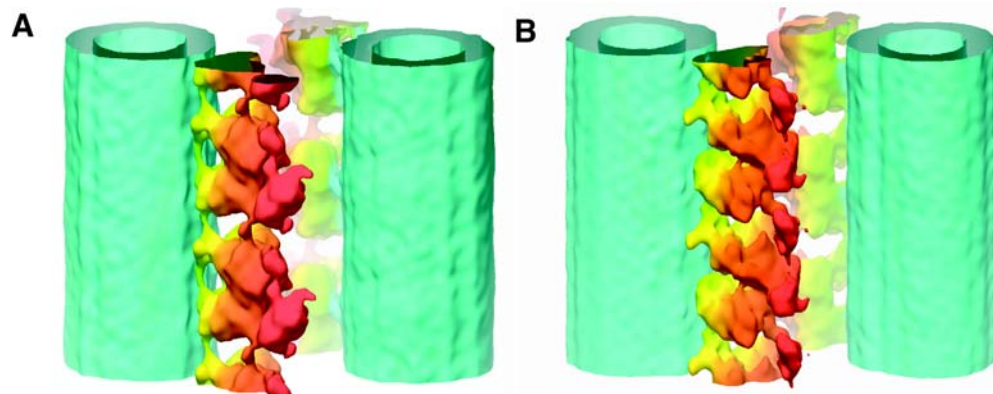


図 4

これら 2 種類の異なるヌクレオチド状態の構造を比較することによって、これまで知られていなかったダイニンの三次元構造変化を観察することがで

きた(図5:モデル)。 α 、 β 、 γ の3つの重鎖の内、 α 鎖は可動性が高すぎたため構造を比較するに至らなかった。 γ 鎖はほとんど構造変化を起こしていなかった。 β 鎖はその頭部の重心が3.7nm B微小管方向に移動し44°内側へ傾いた。これにより apo 状態において14nm あった β 鎖とB微小管との距離が10nm になった。

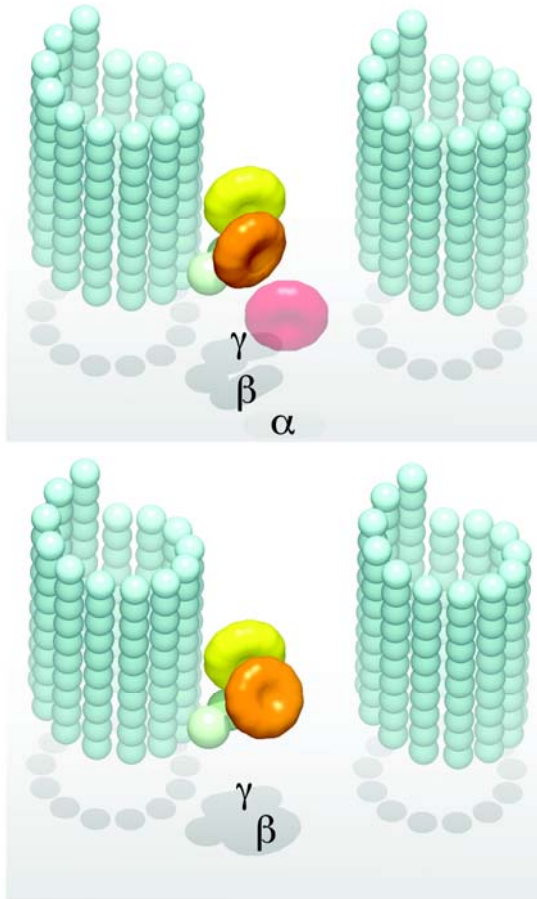


図5

考察

ダイニンの三次元構造変化を微小管に結合した状態で観察する方法を確立したことは、ダイニンの研究において大きな前進である。同時期にトモグラフィを用いて三次元再構成を行った研究が発表されたが、私の結果よりも解像度は低く、何よりも構造変化を観察することはできていなかった。軸糸はATPとバナジン酸を加えても円周上にある半分のダイニン列がADP+Pi状態になり、残り半分はapo状態のままであるから軸糸を用いてATP依存の構造変化を観察するのは今後も困難であろう。

この研究結果において最も興味深いのは、 β 鎖の構造変化の方向が軸糸の微小管の滑り運動と垂直になっていることである。つまり何らかの機構により90°の運動方向変換が行われていることが示唆される。私はこの変換にはストークドメインが関与していると考えている。ストークドメインとは重鎖の頭部からB微小管へ伸びているcoiled-coilドメインのことであり、その先端部はATP依存的に微小管に結合する。このストークドメインそのもの

は酵素活性をもっておらず、頭部の ATP 分解酵素からエネルギーやアロステリック効果が伝達され、微小管の滑り運動が起こると推測されている。ストロークドメインは非常に細く可動性が高いため、今回の研究では可視化することができなかった。そこで私は微小管と β 鎖の頭部との距離に注目した。構造変化によりこの距離は 14nm から 10nm に短くなる。これとストロークドメインの予想されている長さ (15nm 以下) を組み合わせて考え、“power pull model” 仮説を立てた。(図 6)

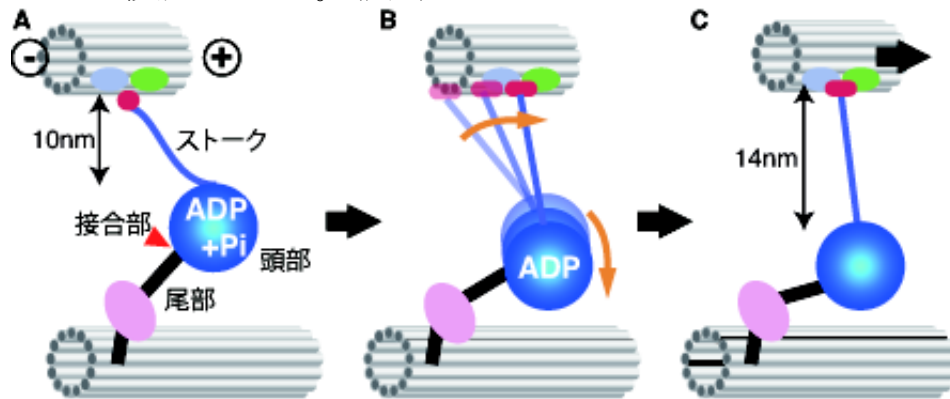


図 6

ストロークの長さが一定であると仮定すると、ADP+Pi 状態ではストロークは微小管に対して 40° の角度をなす。この状態から apo 状態に移行すると、3.7nm の距離の変化は微小管に結合しているストロークの角度の変化となり、微小管に結合した先端は 7 nm プラス方向に引っ張られるはずである。仮説を検証するためには、将来、ストロークを抗体等でラベルし、ストロークの動きをみる必要があると考えている。

これまでダイニンのモーター活性を説明する最も有力な仮説は Leeds 大学の Dr. Burgess チームによって提唱された “power stroke model” である。これは微小管に対して重鎖の頭部が回転することによりストロークがスイングするという仮説である。この仮説は背景で述べたように微小管と結合していない状態のダイニンの二次元構造変化を negative staining によって観察した結果に基づいている。今回の私の結果からは解像度の限界により頭部が回転しているのかどうか明確に言うことができなかった。この論文の発表後、抗体やビオチン化 ATP によって頭部のラベリングを試み、現在有意な結果を得ている。