

「高輝度 X 線マイクロビームを用いた真核生物鞭毛軸系の構造ダイナミクスの解析」

国立研究開発法人 情報通信研究機構 未来 ICT 研究所 大岩 和弘

1 研究の背景と目的

真核生物の鞭毛・繊毛は気道や生殖管での異物排除、生殖産物の輸送のなど、様々な生理機能に關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。この波打ち運動を理解するために、申請者のグループは「軸系ダイニンの力学特性」を単一分子計測によって明らかにし、内腕ダイニン亜種cが単一のモータ部位にもかかわらず微小管と結合したまま8nmのステップ幅で連続的に運動できる能力を持つことを明らかにした。また、「ATP加水分解に伴ってダイニン分子はリンカーと呼ばれる構造を頭部の異なる部位にドッキングさせることで、モータ部位を大きく動かす」ことを電子顕微鏡観察で明らかにした(図1)。さらに、クライオ電子線トモグラフィーによって「鞭毛軸系内の微小管とダイニンの3次元構造」を明らかにして、ダイニンが軸系という三次元的な立体拘束の中でどのように力を発生するのかを明らかにしてきた(図2)。これらの成果は世界的に高く評価されている。構成要素の特性に続いて、次に取り組むべき重要な課題は、9+2構造という分子集合体の中で起きる構成要素の集合体がどのように分子レベルでダイナミックに協調するかを理解することであり、この課題解明が世界的な競争になりつつある。

一方、生理学的条件下で機能状態にある生物試料からナノメートル精度で構造情報を抽出する技術としては、X線繊維回折が有用な計測手法となっている。特に、標的分子が周期的に配置される構造体の場合には、周期的な配列によって散乱されたX線が相互に干渉して強い信号となるため、構造周期に関して有用な情報を与えてくれる。この観点から、高

軸系ダイニンの力発生メカニズム

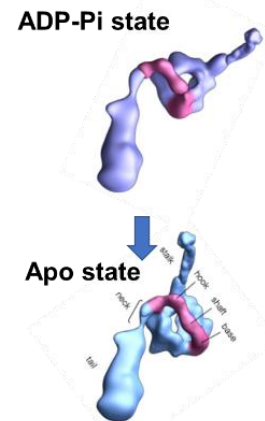
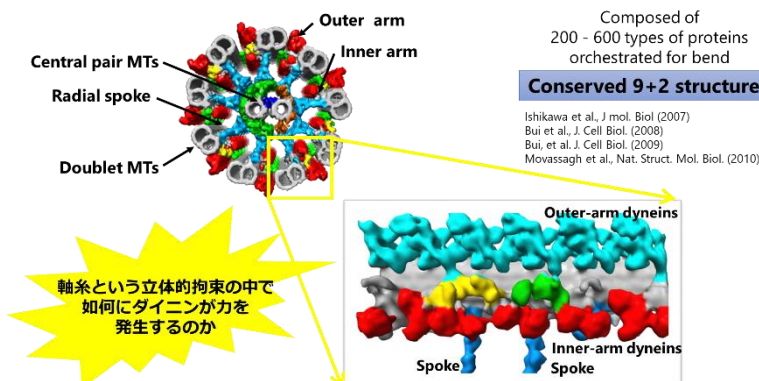


図1. ダイニンの ATP 加水分解に伴う構造変化と力発生の仕組み。

クライオ電子線トモグラフィーが明らかにした軸系の構造



軸系という立体的拘束の中で如何にダイニンが力を発生するのか

図2. クライオ電子線トモグラフィーが明らかにした軸系の3次元構造と軸系要素の3次元配置。外腕ダイニンの3つの重鎖が重なり合って外腕を形成し、これが24nm周期で周辺微小管上に配列していることがわかる。

度に秩序化された周期構造を有する真核生物の鞭毛軸糸は、X線回折が有効になる試料である。そこで、我々は繊毛・鞭毛の構造解析のための有用なモデルシステム、*Chlamydomonas* を用いて、X線繊維回折法による生理学的条件下での軸糸構成要素の空間的配置を調べることにした。

## 2 研究方法・研究内容

植物性鞭毛虫類 *Chlamydomonas* は典型的な軸糸構造 (9+2 構造) を持つ鞭毛を持ち (図 2)、その構成タンパク質はヒト鞭毛と高い相同性を示す。*Chlamydomonas* は多くの鞭毛構造変異株を有することから、鞭毛運動のメカニズムの解明において有用な実験生物となっている。その鞭毛は、通常、非対称な鞭打ち運動 (繊毛波) を示すが、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって正弦波様の対称的な鞭毛型に波形を切り替える。内部構造が同じであるにも関わらず、高  $\text{Ca}^{2+}$  存在下において繊毛型波形形成が消失して鞭毛型の対称的な波形形成が 10msec の速さで起こるのである。このメカニズムは未解決の課題として残っている。このメカニズムの解明は、鞭毛波形形成メカニズムの理解のための重要な手掛かりとなると考えられる。

**【実験材料】** *Chlamydomonas* の鞭毛を用いる。確立した実験生物である *Chlamydomonas* が持つ鞭毛構造変異体の優位点を活用して、解析を効率的、かつ生産的に進めた。野生株 (*wt*)、軸糸構造変異株のうち 外腕欠損株 (*oda1*)、スポーク欠損株 (*pf14*)、中心小管欠損株 (*pf18*)、鞭毛波でしか打たない変異株 (*mbo1*) からそれぞれ軸糸を単離、脱膜して観測に用いた。

**【実験方法】** *Chlamydomonas* から採取した鞭毛は、0.2%界面活性剤 NP40 で除膜したのち、2枚の回転板で挟んだ間隙に表面張力によって液滴として保持する。この回転板を高速回転させることで液滴中の軸糸を流動配向させる。連続せん断流によって配向させた軸糸に、シンクロトロン放射施設 SPring-8 BL45XU および BL40XU において生成された X線マイクロビームを照射する (図 3)。子午線反射のピークは、ラジアルスポークと内腕ダイニンの構造周期である 96nm の高次反射として現れる。そこで、特定の軸糸成分を欠損した上述の突然変異体を用いることで、各々の子午線反射の由来を軸糸構造に割り当てた。

次に、あらかじめ光解裂型  $\text{Ca}^{2+}$  キレータを加えておくことで、紫外光照射によって瞬時に  $\text{Ca}^{2+}$  を放出、これに伴う軸糸回折像の変化を高速カメラで 1 msec の時間分解能で時分割計測した。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化に対する繊維回折像の変化を各変異株で比較することによって、子午線反射の変化が反映している軸糸構造の長軸方向の変化を明らかにすることを目的としたものである。

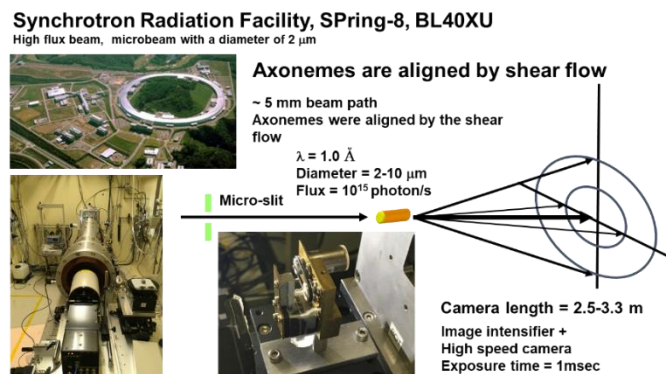


図 3. High-flux microbeam, BL40XU のビームラインと鞭毛軸糸配向のためのせん断流発生装置。

### 3 研究成果

#### 【実験結果】

上述のように、流動配向した軸糸から得られる子午線反射のピークは、ラジアルスポークと内腕ダイニンの構造周期である 96nm の高次反射として現れる。特定の軸糸成分を欠損した突然変異体の軸糸を用いると、その欠損した構造に対応する子午線反射が系統的に欠落した。このことから、各々の子午線反射の由来を軸糸構造に割り当てた (図 4)。

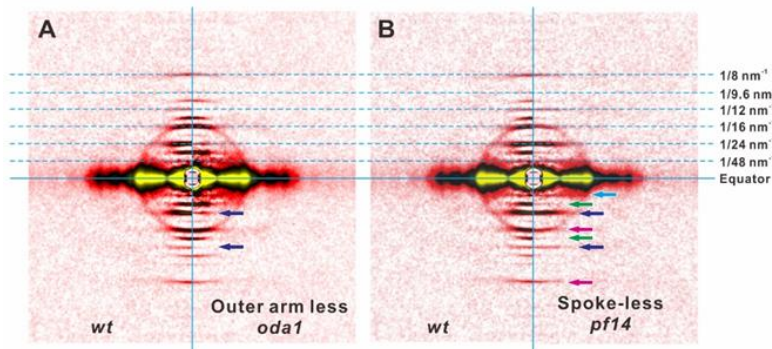


図 4. 鞭毛軸糸の X 線繊維回折像。A.野生株 wt と外腕欠損株 *oda1* との回折像の比較。ダイニン外腕の 24nm 構造周期に対応する子午線の反射が *oda1* で欠落している。B.野生株とスポーク欠損株 (*pf14*) との比較。96nm 周期構造に対応する反射が欠落している (矢印)。

次に、ATP 加水分解に伴う軸糸構成要素の構造変化を調べるために、紫外線照射による caged-ATP の開裂実験を行った。脱膜した野生株鞭毛軸糸を caged-ATP と vanadate を含む溶液中に分散して流動配向させた。200msec 間、この状態での回折像を高速カメラで記録し、続いて UV レーザーを照射して caged-ATP を開裂させた。その後も高速カメラによって回折像を記録して、同一試料における ATP 非存在下と ATP 存在下での繊維回折像を記録した。ダイニン外腕 24nm 周期に由来する反射 ( $1/24\text{nm}^{-1}$  および  $1/12\text{nm}^{-1}$ ) の反射強度とプロファイルを見ると、明らかに ATP 放出後の回折像で強度が増し、層線の存在が明瞭になっている (図 5)。このような変化は、ATP 添加によってダイニン外腕のらせん対称性が上がっていること、ダイニン外腕の構造変化が起こっていることを示していると考えられる。しかし、ATP 非存在下ではダイニン腕は隣接する微小管と rigor 結合を形成することから軸糸全体の曲げ剛性が上がってしまう。このために、流動配向での配向度が ATP の有無で変化している可能性が排除できない。この点について、今後の実験系の改良が必要である。

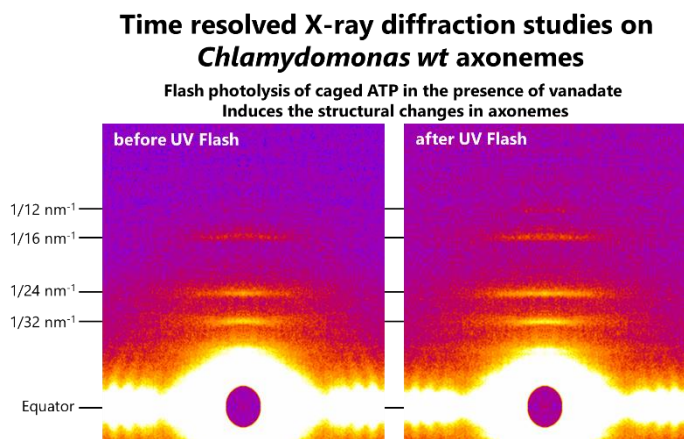


図 5. Caged-ATP による ATP 添加に伴う軸糸 X 線繊維回折の変化。野生株 *wt* の鞭毛軸糸を流動配向させて、紫外線少佐前の回折像と紫外線照射後の回折像を並べて示した。外腕ダイニンの 24nm の構造周期に対応する層線反射が紫外線照射後に強度を上げていることがわかる。



さらに、caged-EGTA を用いることで、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を变化させた時の軸糸構成要素の空間的配置とその動態を調べた。低  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 (pCa8) では、ラジアルスポーク由来の 48nm および 24nm の反射は層線として現れた。軸糸を高  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度溶液に晒すと、これらの層線の強度は下がり、子午線上の反射強度が高まった (図 6)。この回折パターンの変化は、*Chlamydomonas* で観察される鞭毛の波形変化と同様の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性を示した。これらの結果は、軸糸全体、つまり 9+2 構造がらせん構造を持ち、低  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度においてはらせん対称性は高く、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇によってらせん対称性が低下することを示すものであり、X 線回折によって初めて明らかにされた構造変化である。

軸糸において、力発生を行うダイニンの配列周期は 24nm である。ダイニンの結合相手である微小管は、結合部位を 8nm の構造周期で配列している。この結合部位とダイニンの構造周期は整数比である。このことは、微小管上の結合部位周りのダイニンの存在確率を考えると、ダイニンは結合部位周りに局所的に分布していると考えられる。これは骨格筋ミオシンとアクチンフィラメントが持つ周期の比が整数比でないことと大きな違いであり、わずかなずれによってダイニンの力発生が急激に低下することを示唆する。軸糸全体がらせん対称性を持つことは、微小管上の結合部位周りのダイニンの分布を偏らせることを意味しており、このずれが波形の変換にかかわっている可能性が考えられる。今後、この X 線繊維回折から得られた構造に関する知見を数理モデルとして構築することで、鞭毛波形形成と波形切替のメカニズムの理解に迫ることができると考えている。

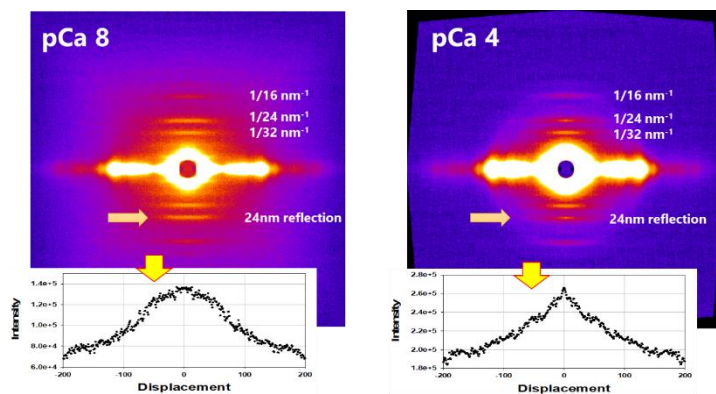


図 6. pCa 8 と pCa 4 における *Chlamydomonas* 鞭毛軸糸からの繊維回折像。強度が高い 24nm 周期構造に対応する反射は pCa8 において層線を持っているが、pCa4 では層線の強度が下がっていることがわかる。鞭毛軸糸においてらせん対称性が  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度によって変化していることを示している。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は基礎生物学分野の研究であり、これまで存在が知られていなかった  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存した鞭毛軸糸らせん対称性の変化という新たな現象を明らかにしたものである。鞭毛・繊毛運動は、ヒトの気管上皮や生殖器官において異物排出や生殖物質の輸送を担っているほか、細胞周囲の環境変化、例えばイオン環境、ホルモン情報、細胞情報分子などを検出する役割を担っており、繊毛・鞭毛の欠損や機能異常は様々な疾病につながる。このような鞭毛・繊毛の重要な役割が近年認識されてきている。本研究成果は、この鞭毛・繊毛運動が如何に制御され、作り出されているのかという動作原理に関わる新たな知見であり、らせん対称性のわずかな変化がシステム全体の挙動を大きく変化させ得ることを示したものであるとして、繊毛運動創出のダイニンの協同性原理や安定化の理解に大いに貢献するものであり、ひいては医学的応用につながる基礎研究と言えよう。