2PD021

クラミドモナスの新たな内腕ダイニン欠失変異株
○藤原明子*, 八木俊樹, 広野雅文, 神谷律
(東大・院理, *院医)

真核生物鞭毛は内腕・外腕ダイニンと微小管の間の滑り力によって運動する。規則正しい波動が生じるしくみはまだわかっていないが、この機構にもダイニンが重要な役割を果たしている可能性が大きい。ダイニンは複数の蛋白質の複合体で、そのうち重鎖と呼ばれるサブユニットにATPを分解して力を発生する活性がある。外腕には3種 (α, β, γ) , 内腕には8種 (a, b, c, d, e, f1, f2, g) の重鎖が存在することが示されている。我々はこれらの重鎖それぞれの機能を理解する目的で、内・外腕の全部または一部を欠失した多種の変異株を単離・解析する作業を行ってきた。これまでに、外腕を欠失した変異株(*oda1-10*)、内腕f(*idal-3, ida7*), a, c, d (*ida4*), a, c, d, e (*ida5*), e (*ida6*) を欠失した株が単離され、それらの鞭毛打解析から、外腕は高鞭毛打頻度の運動に重要であるが波形の決定には本質的でないこと、一方、内腕は鞭毛打頻度よりは波形の形成に重要であること、が明らかになってきた。また、多くの場合、これらの変異株同士を掛け合わせると運動性を全く喪失するので、鞭毛運動には性質の異なる複数のダイニンの協調が必要であることが示唆された。

本研究では、様々なダイニン内腕の固有の機能をより詳細に検討するために、外來遺伝子をゲノムDNAに挿入する方法を用いて新しい突然変異株を得る試みを行った。その結果、初めて内腕ダイニンcのみを欠失している変異株 (*ida8*) が単離された。*ida8* の遊泳速度、鞭毛打頻度はともに野生株の75%程度に低下していたが、鞭毛波形は野生株の波形と顕著な差は見られなかった。また、外腕欠失株との2重変異株でも運動性が喪失しないことが判明した。したがって、*ida8* はこれまでの内腕変異株にはない独特の性質を持っていると言える。in vitro 実験ではダイニンcは微小管を著しく速く滑走させることが知られている。ダイニンcは、鞭毛打の発生過程で、大きな負荷がかかっている過程を加速することによって、鞭毛打頻度を高めているのではないかと想像される。

A. Fujiwara, T. Yagi, M. Hirono, R. Kamiya: Isolation of a novel *Chlamydomonas* mutant lacking a single species of inner arm dynein.

2PD023

ダイニンcによる2(3')-O-Cy3-EDA-ATPの加水分解：
溶液系測定と単一分子計測
○菊本真人、榊原齊、坂井由佳子、大岩和弘
(通信総合研究所・関西先端研究センター)

クラミドモナス鞭毛軸系の内腕ダイニン亜種c(ダイニンc)は球状の頭部を一個持つモーター分子である。ダイニンcは in vitro motility assay や光ピンセットによる力学測定から、単一分子であっても微小管の連続的な運動を生じることが示されている (Sakakibara et al. Nature in press)。一方、蛍光性ATPアナログ、Cy3-EDA-ATPはその良質な蛍光特性から単一分子計測に用いられており、ミオシンATPaseに対して良好なATPアナログとして機能することがわかっている (Eccleston et al. Biophys.J.,70,A159,1996)。この両者を組み合わせ、ダイニンc単一分子による微小管の滑り運動とATP加水分解の相関関係を調べるための基礎実験として、ダイニンcによるCy3-EDA-ATPの加水分解について検討を行った。

定常状態におけるダイニンcのATP加水分解速度は 0.68 s⁻¹であった (50mM Tris-HCl, pH7.5, 0.5mM EDTA, 5mM MgSO₄, 20°C)。これに対して Cy3-EDA-ATP の 2'-O-isomer、3'-O-isomer の加水分解速度はそれぞれ 0.036 s⁻¹、0.016 s⁻¹であった。ダイニンcは遅いながらもCy3-EDA-ATPを基質として加水分解し、2'-O-isomerをより早く分解することが確認された。次にin vitro motility assay によってCy3-EDA-ATPが微小管の運動の基質となるか調べた。その結果、ガラス表面に吸着したダイニンcの密度が高い場合 (約20分子/微小管) は微小管の滑り運動は見られなかったが、低密度 (1-2分子/微小管) においては滑り運動が観察された。ダイニンcへの2'-O-Cy3-EDA-ATPの結合はエバネセント光励起による蛍光顕微鏡下でCy3の蛍光スポットとして観察できた。Cy3-EDA-ATPはダイニンcにより加水分解され、微小管滑り運動の基質となることから、微小管の滑り運動とATP加水分解の関係を解析するツールとして有望であることがわかった。

M.Kikumoto, H.Sakakibara, Y.Sakai, and K.Oiwa.: Characterization of 2'-O-and 3'-O-isomers of Cy3-EDA-ATP in dynein subspecies c ATPase and the single-molecule measurements with the TIRF microscope.

2PD022

単頭モーター；クラミドモナスダイニン亜種Cの
一分子レベルでの運動特性
榊原齊¹、○小嶋寛明¹、坂井由佳子¹、菊本真人¹、片山栄作²、大岩和弘¹
(1.通信総合研究所・生体物性、2.東大・医科研)

軸系ダイニンは真核生物の纖毛あるいは鞭毛打運動における力発生をになうモータータンパク質である。これらの運動の源となる振動発生のメカニズムは、未だ明らかにされていない。最近の研究により、ダイニン分子はそれ自身が振動を引き起こす能力を持っていることが示され、ダイニン分子の最小機能単位レベルでの運動特性を詳しく調べるのが重要となっている。本研究ではクラミドモナスの鞭毛運動において重要な役割を果たしている内腕ダイニン分子の一種であり、単一の頭部しか持たない亜種C(以下ダイニンC)の運動特性を in vitro 運動再構成系およびレーザートラップナノメトリーの手法を用いることによって一分子レベルで測定した。まず、単頭のダイニンCが無負荷条件で微小管とどのように相互作用を行うかを in vitro 運動再構成系での実験によって検証した。実験ではガラス表面に固定するダイニンC分子の密度を様々な値に変化させ、0.5mM ATP条件下での微小管の滑り運動の変化を見た。固定されたダイニンの密度は全反射照明によって一分子を可視化することにより決定した。その結果、ダイニン密度が0.1分子/ μm^2 を下回るあたりから一分子のキネシンが微小管を動かす際に見られるようなヒポティング現象が観察された。この条件の下で、微小管は速度0.7 $\mu\text{m/s}$ で平均3.6 μm にもわたり、ダイニンから解離することなく相互作用し続けることが明らかとなった。一方、ダイニンの密度を上げ、30分子/ μm^2 を越える条件で測定を行うと、微小管は速度5.1 $\mu\text{m/s}$ でヒポットすることなく滑走した。これらの結果は、ダイニンCは無負荷条件ではprocessiveでありながら全相互作用時間中14%の時間しかパワーストロークを行っていないことを強く示唆している。さらに、負荷のかかった時のダイニンCの振る舞いを高分解能で測定するためにレーザートラップナノメトリーの手法を用いて測定を行った。0.017pN/nmの弾性定数を持つトラップの下で測定したところ、ダイニンCが微小管に沿って8 nmステップを刻みながら進み、負荷が2pN程度にまで達すると微小管から解離するのが観察された。ダイニンCが微小管上を進む際、単に進み続けるだけではなく、数ステップずつの後戻りも起こし、その発生頻度は、ダイニンCにかかる負荷が大きくなるにつれて高くなった。以上の結果よりダイニンCはキネシンやミオシンといった他のモータータンパク質とはかなり異なった運動特性を持つことが明らかとなった。これらの性質は、多数のモーター分子が協調して鞭毛や纖毛のマクロな振動を引き起こすために重要な役割を果たしているに違いない。

H. Sakakibara, H. Kojima, Y. Sakai, M. Kikumoto, E. Katayama, and K. Oiwa: Single molecule mechanics of a single-headed motor; inner-arm dynein subspecies-c of *Chlamydomonas* flagella.

2PD024

クラミドモナス内腕ダイニンf単一分子による微小管滑り運動。
○榊原 齊、菊本真人、小嶋寛明、坂井由佳子、大岩和弘
(通信総合研究所関西先端研究センター)

真核生物鞭毛には、多種のダイニンアイソマーが存在する。クラミドモナスの鞭毛の場合、3個の重鎖を持つ外腕ダイニン1種類と、内腕ダイニン7種類が存在し、それぞれがモータ活性を持つ。鞭毛の波動運動発生機構を解明するためにはダイニンアイソマーそれぞれの力学特性を詳細に調べることが重要である。我々は内腕ダイニンのうち最も速い速度で微小管滑り運動を発生する内腕ダイニンcと最も遅い内腕ダイニンfに着目して実験を進めている。ダイニンcはモータ活性の中心である球状頭部を1つしか持たないが、単一分子でも微小管の連続的な滑り運動を発生できる(榊原等, Nature in press)。一方、ダイニンfは球状頭部を2つもっており、単一分子による微小管の連続的な滑りを生じることが、明らかになった。

ダイニンf単一分子での微小管の滑り運動を確認する為、ガラス表面のダイニンf分子の密度を下げてin vitro運動アッセイを行った。各ダイニンf密度に対してダイニンを吸着したガラス面に結合し滑り運動を示した微小管数を表した両対数プロットは、ダイニンfが1分子単位で微小管滑り運動を発生できると仮定したモデルと良く一致した。ダイニンfは、低密度でガラス面に吸着させた場合(1分子/ μm^2 以下)でも、微小管滑り運動を生じた。この時、微小管はガラス面のある一点で支持され、熱揺らぎによるヒポット運動をしながら滑り運動を行った。以上の結果は、ダイニンfも単一分子で連続的に微小管滑り運動を発生できることを示唆している。ダイニンf1分子の発生する微小管滑り速度は約0.6 $\mu\text{m/s}$ で、ダイニンc1分子によるものと(約0.7 $\mu\text{m/s}$)大きな違いはなかった。微小管滑り速度のダイニンf密度依存性からATPaseサイクル中のパワーストロークの時間割合(duty ratio)は約60%と見積もられ、ダイニンcのduty ratio(14%)と比較して、約4倍高かった。

Sakakibara, H., Kikumoto, M., Kojima, H., Sakai, Y. and Oiwa, K.: Translocation of microtubules by single molecules of *Chlamydomonas* inner-arm dynein subspecies f.