3P197

in vitro 運動アッセイ系を用いたクラミドモナス鞭毛ダイニン亜種fの力学特性の評価

○小谷 則遠¹、坂井 由佳子²、小嶋 寛明²、大岩 和弘^{1,2}、榊原 斉² (¹兵庫県立大学院 院理 生命、²関西先端研 生体物性)

クラミドモナス鞭毛のダイニン内腕にはagの7種類のダイニン亜種が存在する。これらの亜種が協調して、鞭毛の周辺微小管を動かすことにより、鞭毛波形が形成されると考えられている。これらの亜種の鞭毛波形形成における役割を明らかにする為に、運動活性に特徴のある亜種fに着目した。in vitro 運動アッセイを用いて、ダイニンfによる微小管の滑り速度を測定したところ、500 μ M ATP 存在下で $1.4 \pm 0.6 \mu$ m/s (23℃) であった。これは他の亜種の滑り速度 (4 10 μ m/s) に比べて格段に遅い。次に、ガラス表面に吸着させるダイニンfの密度を徐々に減少させて、単位時間にガラス表面に吸着して運動を開始する微小管の数を測定した。この結果は、微小管の吸着と運動に必要なダイニンfの数が1つでよいとするモデルで説明でき、これはダイニンfがプロセシブモーターであることを示している。また、微小管の滑り速度がダイニンfの密度に依存することから duty ratio は0.7と推定された。さらに、ダイニンfが発生する最大力を光ピンセットを用いて計測した。ダイニン1分子が微小管と相互作用する条件は未だ見出せていないが、直径1 μ mのポリスチレンのビーズに、活性のある1数分子のダイニンfが吸着する条件で力測定したところ、15 pNの力発生が確認された。これはダイニンcの2 pNに比べてかなり大きい。運動活性の分かっているダイニンcとこのダイニンfとを様々な比率で混合してその混合されたダイニンによる微小管の運動を調べた。ダイニンcによる微小管滑り速度は約30%のダイニンfの混入によって約1/3に低下した。しかし、ダイニンfによる滑り速度は約30%のダイニンcの混入ではその向上は約10%であった。このことは複数種のダイニン亜種が存在する場合、ダイニンfの微小管との相互作用が全体の滑り速度を規定することを示唆するものであり、今後更に詳細な検討をすすめる。

N.Kotani, Y.Sakai, H.Kojima, K.Oiwa and H.Sakakibara : Evaluation of mechanical properties of *Chlamydomonas* inner-arm dynein subspecies f by using in vitro motility assay

3P199

原子間力顕微鏡によるウニ精子鞭毛の長さ方向に沿った弾性分布の測定

○国岡 由紀¹、浜崎 淳¹、上村 慎治²、山田 武範¹ (¹東京理科大学・理・物理、²東大・総合文化・生命環境)

【はじめに】鞭毛中では、ダイニンモーターにより微小管どうしが滑りを起こして屈曲が生じ、運動する。そのため、鞭毛の屈曲状態に応じて微小管とダイニンの相互作用が異なり、それにより鞭毛の弾性も局所的に異なる可能性がある。そこで、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、鞭毛波形に沿って直径方向の弾性分布を測定した。【実験方法】脱膜ウニ精子鞭毛を、ATP 溶液中で運動させた後、急激に ATP 濃度を下げて波形を保ったまま rigor 状態にした。この rigor 波形の試料をカバーガラス表面に固着させた。AFM を用いて、鞭毛に沿って一定間隔でフォース・ディスタンスカーブの測定を行った。探針の先端に、直径約 10 μ m のガラス球を接着して、鞭毛表面を均一に押し込んで測定した。探針を押し込み始めた最初に見られる線形応答から、弾性の指標として「見かけの弾性係数」(押し込み力/試料の凹み距離) を求め、鞭毛波形の位相との関係を調べた。【結果】フォース・ディスタンスカーブの形から、rigor 状態では 1 ~ 2 段階よりなる内部構造の破壊が見られた。ATP・Vi 存在下では破壊による応答は見られず、均一な試料と同様であった。鞭毛全体の平均的硬さは、rigor 条件では、ATP・Vi 存在下よりも 2 倍程度硬かった。Rigor 条件の鞭毛を一般的な円柱と見做した場合のヤング率はおよそ 200kpa であった。この値は軟骨よりは柔らかく、心筋細胞よりも硬い。rigor 条件では、見かけの弾性係数には、鞭毛の屈曲に対してははっきりとした位相依存性はなかったが、ATP・Vi 存在下では位相依存性が見られた。ATP・Vi 存在下での見かけの弾性係数の位相による差は数十倍程度であり、最も硬いところは rigor 状態と同じ程度であった。

Y.Kunioka, A.Hamazaki, S.Kamimura, T.Yamada : Transverse stiffness distributions along sea urchin sperm flagella studied by AFM

3P198

クラミドモナス鞭毛内腕ダイニンcの微小管の負電荷領域から受ける影響および微小管に沿った一次元ブラウン運動

○菊本 真人、中森 鈴奈、榊原 斉、大岩 和弘 (情報通信研究機構・関西・生体物性)

クラミドモナス鞭毛内腕ダイニンcは、単頭のダイニンであり、高いプロセシビティを示す微小管モーター分子である (Sakakibara et al.; Nature, 1999, 586-590) が、その分子運動メカニズムは未だわかっていない。

まず、ダイニンcのプロセシビティに対する微小管の負電荷領域の影響を調べるため、負電荷領域除去微小管を用いた AttachmentRateAssay を行った。ダイニン密度に対し減少する領域の傾きを直線近似したところ、intact 微小管は 1.5-2、負電荷領域除去微小管は 2-3 と、どちらも高いプロセシビティを示した。同時に DetachmentAssay を行ったところ、どちらの微小管とも 1 分子あれば十分であることを示す曲線に良くフィットした。これより、ダイニンcのプロセシビティに対して微小管の負電荷領域は影響を与えるがその寄与は大きくないことがわかった。

またそのメカニズムを一分子レベルで解析するため、Wマイクロスコプを組み込んだ単一蛍光分子観察系においてダイニンc分子の微小管上運動系の構築を試みた。微小管をカバーガラス上に固定し、Cy3 でラベルした抗ダイニンc軽鎖 (p28) 抗体とダイニンcの複合体をフローチャンバーに同封した。すると Cy3 の蛍光スポットが、ATP 非存在下では微小管上に並ぶのが、10 μ M ATP 存在下では微小管に沿って運動するのが観察された。この運動を解析したところ、パイアスのない一次元ブラウン運動を示した。ATP 濃度を 1-100 μ M で変化させると、拡散係数は 130-290 nm²/ms と ATP 濃度の log に比例し変化した。これよりこの運動はダイニンcの ATP 加水分解に伴う微小管との相互作用と深く関係があることが示唆された。現在、さらなる分子メカニズムの解明を目指し、実験を進めている。

M.Kikumoto, R.Nakamori, H.Sakakibara and K.Oiwa : The effect from minus-charged region of the microtubule and 1D-Brownian motion along a microtubule of the *Chlamydomonas* inner-arm dynein c

3P200

X線回折によるウニ精子ベン毛軸系構造の解析

○上村 慎治¹、若山 純一^{2,3}、田村 巧^{2,3}、藤澤 哲郎²、岩本裕之³ (¹東大・総合文化・生命環境、²理研播磨・構造生物化学、³SPRing-8・JASRI)

真核生物のベン毛軸・繊毛の軸系では、周辺微小管上に沿って周期的に存在するダイニン外腕・内腕と、隣接する微小管との間で発生する滑り運動の活性が、時間的・空間的に整然と制御を受け、周期的な屈曲波形が形成されると考えられている。Sakakibara et al. (2004) は、AFM 観察により、長軸方向への微小管滑り運動と共に、直径のダイナミックな変化が起こっていることが示した。これは、活性化条件下で軸系全体の三次元的構造が変化していることを示唆している。その可能性を X 線回折の解析により探ることにした。バフウニの精子を脱膜・頭部除去後、遠心操作で回収し、ガラスキャピラリー内に引き入れて観察試料とした。実験は、SPRing-8 BL45XU で行った。解析は ATP なしの rigor 条件、活性化条件、および vanadate 阻害条件下で行い結果を比較した。本研究の方法で、ウニ精子ベン毛軸系が良好に配向することが確認できた。精製微小管を用いてすでに報告のあるチューブリン周期構造や微小管径を反映した赤道方向の回折 (Bras et al., 1998) が本研究でも観察された。また、ダイニン外腕・内腕の周期構造を反映した子午線方向回折の強度が rigor 条件下で増加する傾向があることがわかった。ダイニン・微小管間の架橋状態の変化を示していると考えられる。さらに、周辺微小管間の間隔を示すと推測される赤道方向の回折では、ATP の有無による変化が見られた。この研究により生理的な条件下での軸系構造の変化が追跡できる手法が確立され、今後、運動制御機構の理解に役立つものと期待している。

S.Kamimura, J.Wakamatsu, T.Tamura, T.Fujisawa, H.Iwamoto : X-ray diffraction analysis of the dynamic structural change of sea-urchin sperm flagellar axonemes.