3P189

細胞質ダイニン1分子の8nm stepとADPによる協同的なstepの発生

○鳥羽 栞^{1,2}、渡邊 朋信³、山口 りさ¹、豊島 陽子¹、樋口 秀男³ (¹ 東大院・総合文化・生命環境、² 現・情報通信研究機構・関西、³ 東北大・先進医工)

細胞質ダイニンの1分子運動特性を2000年(生物物理学会、山口りさ他)に報告したが、データを安定して得ることができなかった。昨年、Mallikらは、ダイニンの1分子が細胞内に比べ格段に遅い速度、小さな力、長いステップサイズ(>16nm)をとることを報告した。我々は、これら不安定さや遅い速度が、ダイニンが不活性になっているためと考え、新たに、運動活性の高いダイニンを得るために、ブタ脳細胞質ダイニンを、さらに微小管を用いて精製し、あわせてピーズのコーティング法を改良した。このダイニン1分子の運動特性を、高時間・空間分解能の計測システムにより測定・解析した。

その結果、細胞質ダイニン1分子は、ATP濃度によらず processive に微小管上を運動した。最高速度は800nm/sであり、細胞内での速度と一致した。また最大発生力は、7-8pNに達し、キネシンとほぼ同程度であった。さらに、ステップサイズは、負荷によらず常に8nmで一定であった。しかし、ATPに加えてADP存在下では、16nm以上のlarge stepが観察された。時間分解能を上げて解析すると、このようなlarge stepは連続的に起こった8nm stepによるものであることがわかった。

本研究により、細胞質ダイニンは、キネシンと大きく異なる構造であるにもかかわらず、同様の力と速度、ステップサイズを持つことがわかった。モータードメイン全体の長さが約30nmもあるダイニンが、規則正しく8nmのステップを刻むことから、キネシンのようなhand-over-handモデルも視野に入れて、メカニズムを考える必要がある。またADP存在下で、協同的なstepを発生したことから、ADPが結合する事により、キネシンとは、異なる機能や制御機構を発生する可能性も示唆される。

S.Toba, T.Watanabe, L.Yamaguchi, Y.Y.Toyoshima and H.Higuchi : Regular 8-nm steps, 7pN force and cooperative steps generated by single molecules of cytoplasmic dynein

3P191

軸系ダイニンの微小管滑り運動に対するヌクレオチド安定結合の役割

○井上 裕一、真行寺 千佳子 (東大院・理学系)

軸系ダイニン重鎖の4つのATP結合部位のうち、加水分解を行わないと考えられている3箇所は、運動の制御に寄与する可能性が高い。我々は軸系ダイニンに結合する蛍光ATPの1分子観察によって、ATPとADPが数分に及ぶ安定結合を行うこと、ADP安定結合がダイニンによる微小管滑り運動の活性化に関わることを昨年示した。今回、滑り運動の誘導にATPとADPの安定結合が重要であるのかを検討したので報告する。

ウニ精子鞭毛軸系をエラストーゼで処理し、ATPを加えてダブルレット微小管の滑り運動を観察した。蛍光ATP(1mM BODIPY-FL ATP)は、軸系内のダイニンによって加水分解され、その速度はATP加水分解速度の48%であった。ところが、蛍光ATPはエラストーゼ処理軸系の滑り運動を誘導できなかった(滑り運動の頻度は1%未満)。そこでADP安定結合の効果を検討するため、エラストーゼ処理軸系をADPでブレインキュベート(0.1mM, 10分)後、蛍光ATPによる滑り運動の誘導を試みた。しかし、この場合も滑り運動の頻度は増加しなかった(1%未満)。次にATP安定結合の効果を検討するため、加水分解されないATPアナログであるAMPPNPを用いてブレインキュベートを行うと(1mM, 10分)、ブレインキュベート中に滑り運動は誘導されなかったのに対して、ブレインキュベート後に蛍光ATPを与えたところ、滑り運動の頻度が24%に増加した。

これらの結果は、軸系ダイニンによる滑り運動には、ATP加水分解とADP安定結合が必要であるだけでなく、加水分解を伴わないATP結合も重要であることを示唆する。

Y.Inoue and C.Shingyoji : Stable nucleotide binding to axonemal dynein in the regulation of microtubule sliding of flagella

3P190

138K中間鎖のリン酸化によるクラミドモナス内腕ダイニンfの構造変化II

○榊原 齊¹、坂井 由佳子¹、Burgess Stanley²、大岩 和弘¹ (¹ 情報通信研究機構・関西、² University of Leeds)

クラミドモナスの内腕ダイニンfは、7種類の内腕ダイニン亜種中唯一2個の頭部を持つダイニンである。その138K中間鎖(IC138)は、生体内でカゼインキナーゼ1(CK1)によりリン酸化される。IC138がリン酸化されると鞭毛軸系内でダイニンfの滑り運動が抑制されることが示されている。我々は、この抑制がIC138リン酸化によりダイニンfが構造変化し、鞭毛軸系内で頭部の位置が変化すること起因するのではないかと考えている。2003年の年会では、負染色電子顕微鏡法で、ダイニンf分子内の頭部間距離がリン酸化により近づくことを報告した(榊原等、生物物理43巻S148, 2003年)。今回、ショ糖密度勾配遠心法で、ダイニンfがリン酸化により水溶液中で実際に構造変化していることを確認した。鞭毛から単離精製したダイニンfをCK1- δ (Sigma)で処理し、IC138をリン酸化した。この処理を行ったダイニンfと行わなかったダイニンfを混合し、同一チューブ内でショ糖密度勾配遠心して、分画した。各分画をSDS-urea電気泳動し、リン酸化及び非リン酸化IC138それぞれのバンドの濃度を測り、IC138リン酸化ダイニンfと非リン酸化ダイニンfのピーク分画を求め、沈降定数を算出した。その結果、リン酸化されていないIC138を持つダイニンfは約22.5Sの沈降定数だったのに対してIC138がリン酸化されたダイニンfのそれは約23Sであり、リン酸化により沈降定数が約2%増加することが明らかになった。このことは、IC138のリン酸化によりダイニンfの形態が変化し、Stokes半径が小さくなったことによると考えられる。現在、ダイニンfの電子顕微鏡像を単粒子解析法により解析している。ダイニンf2個の頭部の分布範囲がリン酸化により変化するという予備的結果が現在まで得られている。

H.Sakakibara, Y.Sakai, S.A.Burgess and K.Oiwa : Conformational change of Chlamydomonas inner-arm dynein f (I1) by phosphorylation of IC138

3P192

クライオ電子顕微鏡法による細胞質ダイニンの3次元構造解析

○安永 卓生¹、齊藤 良¹、昆 隆英²、西浦 昌也²、須藤 和夫² (¹ 九大・情報工・生命情報工、² 東大・院・総合文化)

細胞質ダイニンは、微小管に沿う細胞内ベジクル輸送に関わる分子モーターである。ATPの加水分解により生じる化学エネルギーにより、微小管の上を移動する。これまで、Burgessらの負染色電子顕微鏡法により、ATP加水分解に伴うダイニン構造全体の構造変化が報告された。安藤らも高速AFMにより、同様の構造変化を報告した。Koonceらは、負染色像からの3次元像を再構成しているものの、分解能が低い。また、Gobbonsらによりホモロジーモデリングによる原子モデルが提唱されたが、ダイニン分子全体の原子モデルは未解決である。このため、3次元構造の観点から、その滑り活性を生み出すメカニズムを詳細に議論することは困難である。

そこで、我々は、細胞性粘菌により発現した細胞質ダイニン重鎖のモータードメイン部(380 kDa)をクライオ電子顕微鏡法により撮影し、その画像から3次元像を再構成した。このとき、向きの決定のために、Gibbonsらの報告している原子モデルを使用した。その結果、ATP存在下でのダイニンの、約2.5 nmの分解能の3次元構造を再構成することに成功した。この構造では、AAAリング構造が明確に観察でき、Koonceらと同様の7つの高い密度領域を観察できた。また、リング構造はその一部に低い密度領域をもっており、リング内での滑りによる構造変化の可能性を示唆している。ストーク領域は平均操作の結果密度が低下し、観察できない。これは、ストークが揺らぎをもつという安藤らの報告とも一致する。今後、平均分子数を増やし、さらに分解能の向上をはかりつつ、2次元像にもどり、ストークの配置を決める。

本会では、現在進行中のapo状態のダイニン構造についても報告し、ダイニン分子の構造変化のメカニズムについて議論したい。

T. Yasunaga, R. Saitoh, T. Kon, M. Nishiura, and K. Sutou : Three-dimensional Structure of cytoplasmic dynein by electron cryo-microscopy