

## ダイニン・微小管複合体の高分解能構造解析

## High Resolution Structural Analysis of the Dynein-Microtubule Complex

広瀬 恵子<sup>a</sup>, 上野 裕 則<sup>a, b</sup>

Keiko Hirose and Hironori Ueno

<sup>a</sup>産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門<sup>b</sup>東北大学国際高等研究教育機構

**要 旨** ダイニンは、微小管上を運動する分子モータータンパク質である。その運動を説明する最も一般的なモデルは、ダイニン分子がストークと呼ばれるドメインの先端で微小管に結合し、ストークを回転させることによって微小管を動かすというものだった。しかし、ストークは単一のコイルドコイル構造から成る細い構造であり、微小管に結合した状態での電子顕微鏡観察は、ネガティブ染色法でもクライオ電子顕微鏡法でも難しかった。我々は、酢酸ウラニル染色とクライオ電子顕微鏡を組み合わせた新方法「クライオポジティブ染色法」を用いることにより、微小管に結合したストークの観察に成功した。2つのヌクレオチド状態で構造を比較した結果、上記モデルに反して、ストークは微小管に対してほとんど角度を変化させないことがわかった。

キーワード：低温電子顕微鏡法、画像解析、分子モーター、微小管

## 1. はじめに

生体試料を電子顕微鏡で観察する際には、観察の目的に最も適合した試料作成法の選択が肝要である。たとえば、クライオ電子顕微鏡法は、タンパク質分子の構造を高分解能で研究するのに適した方法であるが、得られる電子顕微鏡像のコントラストが低く、単一の画像から分子の形状を観察するには適さないことが多い。我々は、単一のコイルドコイル構造であるダイニンのストークを、微小管に結合した状態で観察するために、酢酸ウラニルによる固定・染色とクライオ電子顕微鏡法を組み合わせた電顕法を開発した。本編では、この方法の詳細と得られた結果<sup>1)</sup>について紹介したい。

## 2. ダイニン分子の機能と構造

ダイニンは、ATPを加水分解して、微小管上をそのマイナス端方向に運動する蛋白質分子モーターである。ダイニンファミリーに属する分子は大別して、細胞内で物質の輸送に携わる細胞質ダイニンと、鞭毛や繊毛の波打ち運動を駆動する軸系ダイニンに分けられるが、基本的な運動のしくみは共通していると考えられている。鞭毛や繊毛内には、周辺微小管とよばれる9対のダブルレット微小管とそれらの間に規則的に配列した数種類のダイニン分子を含む、軸系という構造がある(図1a)。外側に配列したダイニンは外腕ダイニンと呼

ばれ、内側には内腕ダイニンと総称される数種類のダイニンが規則的に並んでいる。軸系内にはこのほか、中心対微小管やラジアルスポークなど、様々な蛋白質から成る構造が含まれる。

ダイニンは、分子量約520 kDの重鎖を1-3個含み、これに複数のサブユニット(軽鎖・中間鎖など)が付随した巨大な分子である(図1b: 図は重鎖を二個持つ例)。電子顕微鏡で観察した重鎖は、頭部、尾部、およびストークと呼ばれる部分に分けられる。頭部は6個のAAA<sup>+</sup>ドメインがつながった直径約13 nmのリング状構造をもち、ATPを結合・加水分解する。尾部は大部分の軽鎖・中間鎖を結合すると考えられており、鞭毛内では周辺微小管のA小管を足場として固定されている。一方ストークは、頭部から突き出した長さ約10-15 nmの構造であり、コイルドコイル構造の先端にヌク

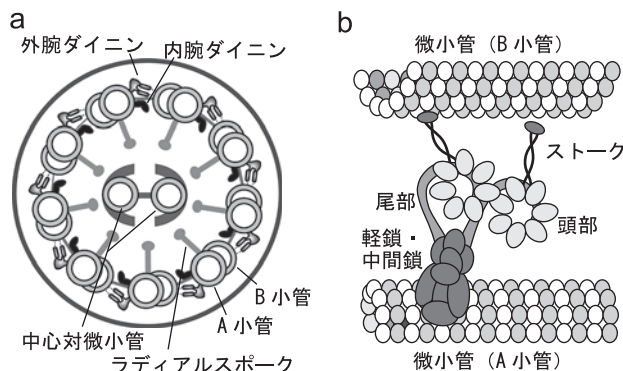


図1 鞭毛軸系の横断面 (a) および外腕ダイニン分子の模式図 (b)

<sup>a</sup> 〒350-8562 茨城県つくば市東 1-1-1

E-mail: k.hirose@aist.go.jp

2009年2月19日受付

レオチド依存性の微小管結合部位をもつ。軸系ダイニンは、このストーク先端の結合部位で周辺微小管の B 小管と相互作用し、これに沿って動くと考えられている。

### 3. ダイニン分子の構造変化とストーク回転モデル

ダイニン分子は、その巨大さ、複雑さから、結晶化が難しいため、ストークなど分子のごく一部を除いては結晶構造が知られておらず、その構造研究は主として電子顕微鏡を用いて行われてきた。2003年 Burgess ら<sup>2)</sup>は、クラミドモナス軸系から単離したダイニン c (内腕ダイニンの一種で、重鎖を1つもつ)の構造をネガティブ染色法で観察し、溶液にヌクレオチドがないとき (No nucleotide 状態と呼ぶ) と、ATP および vanadate を加えたとき (ほとんどのダイニンが ADP と vanadate を結合した ADP・Vi 状態になり、この構造は ATP 加水分解直後に生じる ADP・Pi 状態の構造と類似すると考えられている) の二状態で、ストークと尾部のなす角度が大きく変化することを示した。図 2a に模式的に示すように、No nucleotide 状態では、尾部とストークが頭部のリング上で近接した位置から出ているのに対し、ADP・Vi 状態では約 90 度離れた位置に観察されたのである。この結果から、ダイニンは、まずストークが微小管のマイナス端方向に傾いた状態で微小管に結合し、ストークをプラス端方向に回転させることによって微小管を動かすというモデル (図 2b) が提唱された。しかし、実際に微小管に結合したダイニンにおいてどのような構造変化が起こるかは不明であった。

### 4. ダイニン・微小管複合体の作成

微小管に結合したダイニン分子の構造は、主として精子軸系の電子顕微鏡観察によって研究されてきた。1980年代、Heuser らは凍結切断レプリカ法を用いて軸系中のダイニンの構造を観察し、No nucleotide 状態と ATP 添加時の構造を比較した<sup>3,4)</sup>。この結果、両状態でストーク先端が B 小管と相互作用していること、頭部や尾部の配置が二つの状態に変化することを示したが、ダイニンの個々の頭部がどのよう

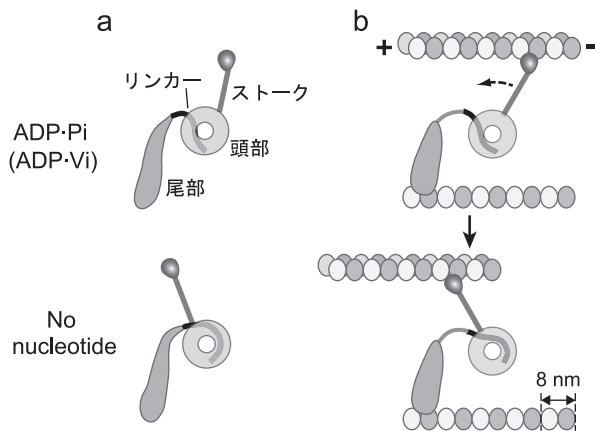


図 2 Burgess らにより観察されたダイニンの構造変化<sup>2)</sup>の模式図 (a) と、ストーク回転モデル (b)

に配置しているかなど詳細な構造はわからなかった。ストークの角度についても、同じ方法を用いた幾つかの報告で、一定した結果が得られていなかった<sup>3-6)</sup>。Heuser らは、筋肉繊維の構造研究においても、同方法で観察した筋フィラメントの間隔が生体内よりも広くなり、ミオシンクロスブリッジがフィラメントに垂直に引き延ばされる傾向があることを示しており<sup>7)</sup>、同じ理由でダイニンストークの角度が変わってしまった可能性が示唆される。

これらの研究から約二十年を経て、精子軸系の構造が電子線トモグラフィ法を用いて初めて立体構造として発表された<sup>8,9)</sup>。これらの研究により、分子を構成する 1-3 個の頭部の立体配置など重要な情報が得られたが、分解能の不足から、ストークは観察できなかった。

このような問題を解決して微小管に結合したストークの角度を明らかにするために、我々は、ダイニンを微小管に *in vitro* で結合させた複合体を用いることにした。ウニの精子から抽出した外腕ダイニン分子を、No nucleotide 溶液中で、微小管 (*in vitro* で重合し、taxol で安定化したもの) と混合した。微小管は、プロトフィラメントと呼ばれるチューブリンのフィラメントが 13 本前後集まって筒状になったもので、全てのプロトフィラメントがダイニンを結合する可能性があるが、観察された複合体の多くで、ダイニンは 2 本の微小管の間に一列に並んでいた (図 3)。従って、他の分子との重なり合い無しに、微小管に結合したダイニン分子の構造を観察することができた。

### 5. クライオポジティブ染色法

ネガティブ染色法で観察したダイニン・微小管複合体では、丸い頭部と湾曲した尾部から成る「オタマジャクシ」型のダイニン分子が規則的に並んでいる像が観察されたが、ストーク構造ははっきりしなかった (図 4a)。これは、2 本の微小管 (直径約 25 nm) の間に酢酸ウラニルのプールができ、単一のコイルドコイル構造 (太さ約 2 nm) をもつストークは埋もれてしまうためと考えられる。同じ複合体をクライオ電顕法で観察したところ、ストークと思われる構造がダイニン頭部から微小管に斜めに伸びて結合しているのが判別できたが、全体としてのコントラストは低く、ストークの観察できない分子が多かった (図 4b)。

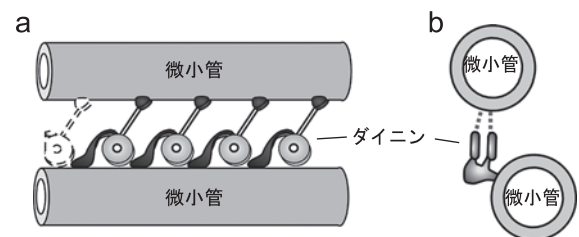


図 3 我々の用いたダイニン・微小管複合体。通常、(a) に示したような像が観察される。(b) は超薄切片法で確認した横断面の模式図。

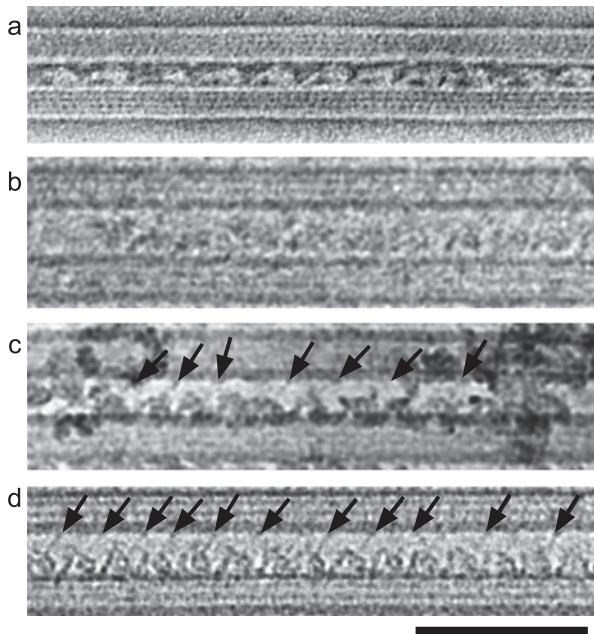


図4 ダイニン・微小管複合体の電子顕微鏡像。ネガティブ染色像 (a), クライオ電顕像 (b), および 0.25% (c) または 0.03% (d) の酢酸ウラニルを用いたクライオポジティブ電顕像。バー: 100 nm

そこで次に、「クライオネガティブ染色法」<sup>10)</sup> を試した。この方法は、サンプルに高濃度の染色剤を加えたのち凍結し、クライオ電顕法で観察するもので、染色剤としては通常モリブデン酸アンモニウムが用いられる。しかし、モリブデン酸アンモニウムを加えると微小管の構造が不安定になるという報告があり、我々の観察でも微小管の構造はモリブデン酸アンモニウムで破壊されてしまった。

モリブデン酸アンモニウムに代わる染色剤として、タンニン酸、シュウ酸ウラニル、クエン酸鉛等を試したが、低濃度の酢酸ウラニルを用いたときに、最もよい結果が得られた。グリッド（カーボン蒸着したマイクログリッドを用いた）上にサンプルを載せ、過剰な液を除去した後、酢酸ウラニル水溶液を約 10  $\mu$ l 加えた。通常クライオ電顕試料作成時と同様、ろ紙で過剰な液を除去して液体エタンで急速凍結し、クライオ電顕観察した。図 4c, d に、異なる濃度の酢酸ウラニルを加えて凍結したダイニン・微小管複合体の電子顕微鏡像を示す。像のコントラストは格段に向上し、ストークの構造を各所に観察することができた（図 4c, d, 矢印）。通常のクライオネガティブ染色法とは逆に、タンパク質がポジティブに染まって観察されたので、この方法を「クライオポジティブ染色法」と名付けた。前述のタンニン酸（1%）等でもポジティブな染色が観察されたことから、「クライオポジティブ染色」は、低濃度の染色剤を加えて凍結したときかなり一般的に起こる現象と考えられる。

ここで用いた酢酸ウラニル濃度（0.03–0.25%）のうち、0.25%では特にコントラストが高かったが、おそらくタンパク質の表面に染色剤が厚く吸着するため、微細な構造がは

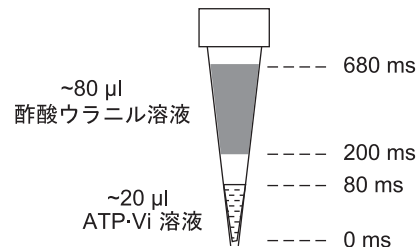


図5 ADP・Vi 状態のダイニン・微小管複合体を観察するための方法。放出時に各液面がチップの先端に達したタイミング（EMCCD で計測）を図の右に示す。

きりしなかった。一方、0.03–0.05%程度の酢酸ウラニルでは、ダイニン頭部のリング構造や、微小管を構成するプロトフィラメントなど、微細な構造を高コントラストで観察することができたので、この濃度を用いて構造解析を行うことにした。ちなみに 0.03% の酢酸ウラニルの pH は約 4.8 であり、このような低濃度でも、試料の構造は酢酸ウラニル添加時に固定されると考えられる。

## 6. ADP・Vi 状態におけるダイニン・微小管複合体の電子顕微鏡試料作成

3 で述べたダイニンのストーク回転モデルは、No nucleotide 状態と ADP・Vi 状態で、尾部に対するストークの角度が変化するという観察結果に基づいていた。そこで、微小管に結合したダイニンの構造を、この 2 状態で比較することにした。まず、No nucleotide 状態でダイニン・微小管複合体を作成し、ここに ATP と vanadate を加えることにより、ADP・Vi 状態の複合体を作った。ところが、ストークの微小管への結合は、ADP・Vi（あるいは ADP・Pi）状態では弱く、ATP と vanadate を加えるとダイニンが微小管から次第に解離してしまうという問題があった。

この問題は、図 5 のような方法で、ATP・Vi 添加から酢酸ウラニルによる固定までにかかる時間を短縮することで解決した。この方法は以前、Craig ら<sup>11)</sup> により、ATP 存在下でのミオシンの構造を観察するために使われたものである。ピペットのチップにまず酢酸ウラニル、続いて空気（溶液の混合を防ぐため）、さらに ATP・Vi 溶液を吸入する。これをグリッド上のサンプルに放出すると、サンプルは短時間（我々の用いた液量では 120 ミリ秒程度）ATP・Vi 溶液にさらされた後、酢酸ウラニルで固定される。これにより、ATP・Vi 状態のダイニンの構造を、微小管から解離する前に観察することができた。

## 7. ダイニン・微小管複合体の構造解析

ダイニンの構造と微小管の極性を関連づけて解析するため、まず、得られた画像において微小管の極性を調べた。微小管の透過電子顕微鏡像では、手前と奥のプロトフィラメントの重なり合いによって Moiré パターンと呼ばれる模様が観察され、これによって多くの微小管については極性を判断す

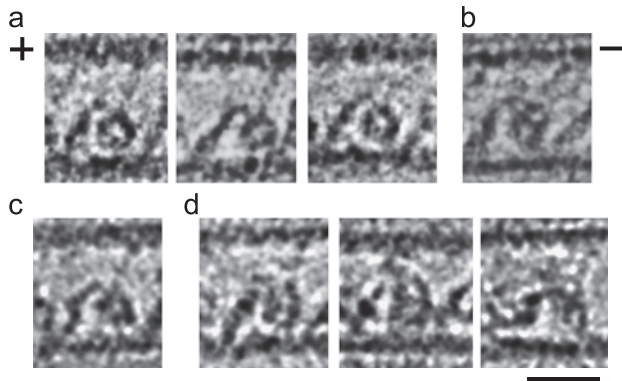


図6 微小管に結合したダイニン分子のクライオポジティブ電頭像の例。No nucleotide 状態 (a, b) および ADP・Vi 状態 (c, d)。2 個の頭部が重なってリングが一つ見える場合 (a, c) と、2 個がずれて見える場合 (b, d) がある。バー：20 nm。

ることができる<sup>12)</sup>。観察できた全ての複合体において、ストーク側の微小管に対して、頭部は常に尾部に対してマイナス端側にあることがわかった (図6 参照)。

さて、我々の用いたウニの軸糸外腕ダイニンは二量体で、図1bに示したようにリング状の頭部を二個もつ。しかし、No nucleotide 状態のダイニン・微小管複合体では、一分子について一つのリングしか観察されない場合が多かった (図6a)。これは、二つの頭部が重なり合って観察されたためと考えられる。一方、ADP・Vi 状態では片方の頭部が移動して、二つの頭部が8の字型に見える場合が多くなった (図6d)。いずれの場合にも、ストークは微小管のマイナス端方向に傾いていた。微小管に対する角度の平均値は、No nucleotide 状態で  $54.0 \pm 8.7^\circ$  ( $n = 451$ )、ADP・Vi 状態で  $58.6 \pm 14.6^\circ$  ( $n = 490$ )、と有意な差がなかった<sup>1)</sup>。3で述べたストーク回転モデルでは、ストークがADP・Vi 状態では微小管のマイナス端方向に傾いた向きで結合し、No nucleotide 状態に移行する際、プラス端方向に回転する。したがって、我々の結果はストーク回転モデルに反するものであった。

個々の画像で観察された構造変化を、より客観的に解析するため、安永らによって開発された画像解析ソフト Eos<sup>13)</sup> を

用いて、単粒子解析によるグループ分けを行った。元の画像から、ダイニン分子、および、これによって架橋された二本の微小管の一部を含むボックス (No nucleotide 状態については1,062 個、ADP・Vi 状態については988 個) を切り出した (図7a)。ボックスされた画像は、隣のダイニン分子の一部を含むほか、微小管の間隔、ストーク、頭部、尾部など様々なバリエーションをもつため、画像全体から意味のあるグループ分けをするのは難しい。そこでまず、ダイニン頭部の形状に重点をおいて分類した。図7bに示すようなマスクによってダイニン頭部を強調した後、グループ分けを行った。その結果、No nucleotide 状態では90%以上の画像が、2つの頭部が重なって観察されるグループに分類された (図7c) のに対し、ADP・Vi 状態の主要なグループでは一方の頭部が図の上、右上、左上に移動していた (図7d)。続いて、それぞれのグループに属する個々の画像を、図7eのようなマスクを用いて、ストークの形状で分類した。ADP・Vi 状態では構造が多様で、はっきりした平均像を得るのが難しかったが、いずれのヌクレオチド状態の平均像においても、ストークは微小管のマイナス端方向に傾いていた (図7f, g)。

## 8. ダイニンの運動モデル

我々の結果は、「ストーク回転モデル」に反して、ダイニンのストークの微小管に対する角度が変化しないことを示した。それでは、ダイニンはどのようにして動くのだろうか。

3で述べたように、ストークと尾部は、No nucleotide 状態では頭部のリング上で近接した位置から出ているのに対し、ADP・Vi 状態では離れている<sup>2,14)</sup>。これは、頭部と尾部をつなぐリンカーと呼ばれる部位 (図2a 参照) と、頭部の相互作用の状態が変化するためと考えられている。我々は、この構造変化がダイニン分子の「長さ」(尾部のA小管結合部位から、ストーク先端のB小管結合部位までの距離)を変化させると考えた (図8)。ATPを結合/加水分解すると、ストークの微小管結合は弱くなり、ストークは微小管上を移動して次の結合部位をサーチする。このときに分子の長さが長くなっているため、ストークは遠くまで移動して結合できる。結合するとダイニンはヌクレオチドを放出し、もとの構造に

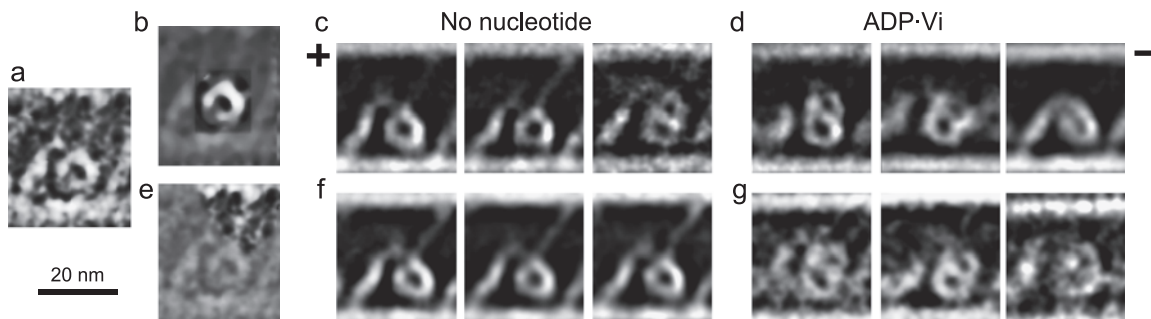


図7 単粒子解析法によるクラス分け。ダイニン分子と微小管の一部を含む画像 (a) から、頭部 (b) あるいはストーク部分 (e) のコントラストを上げることで、これらの部分に重点をおいたクラス分けを行った。頭部 (c, d) およびストーク (f, g) によって分類した No nucleotide 状態 (c, f) および ADP・Vi 状態 (d, g) のクラス平均像の例を示す。

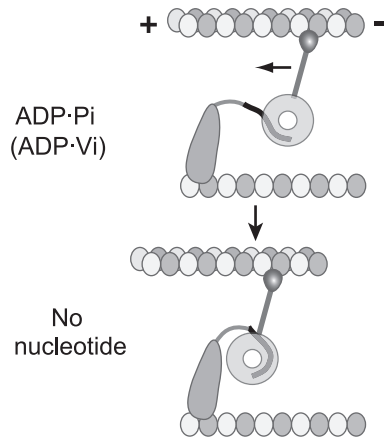


図8 我々の提案するダイニンの運動モデル

戻る。分子の「長さ」は元に戻るの、ストークに結合した微小管は引き寄せられる。このようにしてダイニンは、ストークの角度を変えずに、微小管を動かすことができると考えている。

### 9. おわりに

「クライオポジティブ染色法」により、微小管に結合したダイニンのストークを観察することができた。本方法はタンパク質の微細な構造を、クライオ電子顕微鏡法の利点を生かしながら、より高コントラストで観察するものであり、結晶構造をとりにくい多様な構造を単一の画像から観察するのに

特に有用である。今後、様々な試料への適用が期待される。

本編で紹介したダイニン・微小管複合体の構造解析は、九州工業大学の安永卓生博士および東京大学の真行寺千佳子博士との共同研究で行ったものである。EMCCDによる計測は、産業技術総合研究所の加藤薫博士の協力による。

### 文 献

- 1) Ueno, H., Yasunaga, T., Shingyoji, C. and Hirose, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19702–19707 (2008)
- 2) Burgess, S.A. *et al.*: *Nature*, **421**, 715–718 (2003)
- 3) Goodenough, U.W. and Heuser, J.E.: *J. Cell Biol.*, **96**, 798–815 (1982)
- 4) Sale, W.S., Goodenough, U.W. and Heuser, J.E.: *J. Cell Biol.*, **101**, 1400–1412 (1985)
- 5) Burgess, S.A., Dover, S.D. and Woolley, D.M.: *J. Cell Sci.*, **98**, 17–26 (1991)
- 6) Burgess, S.A.: *J. Mol. Biol.*, **250**, 52–63 (1995)
- 7) Heuser, J.E. and Cooke, R.: *J. Mol. Biol.*, **169**, 97–122 (1983)
- 8) Nicastro, D. *et al.*: *Science*, **313**, 944–948 (2006)
- 9) Bui, K.H. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **183**, 923–932 (2008)
- 10) Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S.D. and Harris, J.R.: *Micron*, **29**, 145–160 (1998)
- 11) Frado, L.L. and Craig, R.: *J. Mol. Biol.*, **223**, 391–397 (1992)
- 12) Chrétien, D., Kenney, J.M., Fuller, S.D. and Wade, R.H.: *Structure*, **4**, 1031–1040 (1996)
- 13) Yasunaga, T. and Wakabayashi, T.: *J. Struct. Biol.*, **116**, 155–160 (1996)
- 14) Roberts, A.J. *et al.*: *Cell*, **136**, 485–495 (2009)