

平成 21 年 9 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005～2008

課題番号：17207009

研究課題名（和文）鞭毛・繊毛軸系における高次規則構造の形成機構

研究課題名（英文）Assembly mechanism of the highly regular axonemal structure in cilia and flagella

研究代表者

神谷 律 (KAMIYA RITSU)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10124314

研究成果の概要：鞭毛・繊毛の内部は9本の周辺微小管が円筒状に並んだ構造を持ち、縦方向には96 nmの繰り返し周期がある。このような構造の形成機構に迫るため、緑藻クラミドモナスを使って、軸系微小管の結合蛋白質を検索するとともに、構造形成異常変異株の原因遺伝子を決定した。その結果、新規軸系構成蛋白質10種を発見するとともに、軸系の9回の対称性の起源に関して重要な知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2006年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2007年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
総計	28,000,000	8,400,000	36,400,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：鞭毛、繊毛、軸系、ダイニン、微小管、基底小体、中心子、クラミドモナス

1. 研究開始当初の背景

真核生物鞭毛・繊毛の軸系は9本の周辺微小管が2本の微小管を囲んだ円筒状構造もち、内部構造は96nmの周期で繰り返す。そのような周期性は「ものさし」蛋白質などの規則的集合によってもたらされていると考えられているが、その形成機構は全くわかっていない。微小管と直接相互作用する軸系蛋白質が同定された例もきわめて少ない。またほぼすべての真核生物鞭毛・繊毛の鞭毛軸系が必ず9本の周辺微小管を持つ理由も謎である。

2. 研究の目的

本研究はそのような規則構造の形成機構を解明するために、軸系を形成する基本蛋白質

群を同定し、試験管内でその構造の一部を再現することを目的とする。具体的には、1) 周辺微小管上構造体の結合周期はどのように決定されているか、2) 周辺微小管同士はどのような分子で結合しているのか、3) 鞭毛基部体はなぜ9回の対称性を持つのか、という3つの問題にいとむ。周辺微小管上の周期性をもたらす「ものさし」蛋白質と、微小管間架橋蛋白質を同定することを第一の目標にする。

3. 研究の方法

生化学的に軸系蛋白質を同定する方法と、軸系構造に異常を持つ突然変異株を解析する方法の2つを用いる。前者では、軸系を様々

な条件で解体し、解体の程度を電子顕微鏡でモニターしながら、解体とともに失われる蛋白質群を同定する。各蛋白質を同定した後、大腸菌で発現させて、*in vitro* で微小管との相互作用を検定する。また、各蛋白質間の相互作用を明らかにするため、タグをつけた組み換え蛋白質を利用したブルダウン法、電気泳動蛋白質に対するオーバーレイ法、クロスリンク法による解析を行う。

後者では鞭毛基部体に異常を持つ変異株に重点を置く。基部体は軸糸9回対称性決定に本質的な役割を果たしていると考えられるからである。興味深い変異株が得られた場合、原因遺伝子を同定し、改変遺伝子の発現、抗体作製を行い、間接蛍光顕微鏡法と免疫電子顕微鏡法により、それらの基部体における局在を決定し、鞭毛基部体形成における役割を検討する。

4. 研究成果

(1) 周辺微小管構成蛋白質の同定

軸糸中の9本の周辺微小管にはチューブリン以外に複数の蛋白質が含まれる。それらはダブルレット微小管の形成と、縦方向の周期性決定に重要であると考えられる。そこで、軸糸微小管中から微小管結合性の蛋白質を検索し、合計約10種の新規蛋白質を同定した。

その一つは、すでに精子鞭毛軸糸で見つかったテクチンと呼ばれる蛋白質であった。この蛋白質は軸糸の96nm周期を決定する「ものさし」蛋白質の候補として注目されていたものである。クラミドモナスではそれまでテクチンは見つかっておらず、これが最初の報告である。しかし、意外なことに、ある種の内腕ダイニンを欠失した突然変異株では、テクチンの量が正常の1/10程度に減少していることが判明した。そして、それにもかかわらず、鞭毛の構造自体には大きな欠陥は見られなかった。これらの結果は、これまで想定されていたテクチンの機能には見直しが必要であることを示唆している。

また、周辺微小管の基本的構成因子と考えられる蛋白質も2種同定された。軸糸の2連微小管中には不溶性のリボン構造が存在することが以前から知られていたが、その主要構成タンパク質としてRib72が同定され、さらにRib72と結合するタンパク質としてPacrgが見つかったのである。いずれも鞭毛・繊毛を持つ生物に広く保存されている。我々はマウスからもRib72相同蛋白質を同定したが、その後、他研究室から若年性てんかんの原因の一つとして報告されたEHFC1と呼ばれる蛋白質(神経に局在する蛋白質とされていた)が実はRib72そのものであることを発見した。最近、これらのことをあわせて、若年性てんかんが繊毛の異常によって起こるといふ仮説が提案されている。Rib72は繊

毛形成の重要タンパク質である可能性が大きい。

Pacrgはパーキンソン病に関連する蛋白質Parkinと発現が共調節されていることが知られ、医学的にも興味を持たれているものである。今回、我々はさらに突然変異株の検索から、Pacrgを欠損する変異株の単離に成功した。この株の鞭毛は長さは正常であるが、特定の周辺微小管内の小突起を形成できないことが判明した。また運動の波形や平面性にも異常があった。したがって、この蛋白質は、特定の微小管に局在して、その性質を軸糸の効率のよい運動に適したものに変化させる機能があるものと推測される。

(2) ネキシンリンク構成蛋白質の探索

軸糸の構築と運動機構の両方にとって、微小管間を結合する繊維構造——ネキシンリンク——はきわめて重要である。しかし、現在のところ、まだそれを構成する蛋白質は同定されていない。我々は軸糸の生化学的解析と、短鞭毛突然変異株のスクリーニングによってこの蛋白質の手がかりを得たいと考えている。まず、軸糸の生化学的抽出条件を複数決定し、残渣に含まれる蛋白質を比較することにより、蛋白質候補を複数同定した。そのうちの一つは免疫電子顕微鏡観察で過去に報告されていたネキシン様の架橋構造に局在することがわかった。また、約1 μ mのごく短い鞭毛しか形成できない3種の突然変異株を解析したところ、電子顕微鏡観察により、周辺微小管間の結合が異常になっていることが判明した。決定されたこれらの株の変異遺伝子のうち、2つはいずれも鞭毛・繊毛を持つ生物種で高度に保存されたcoiled-coil蛋白質をコードしているもので、ネキシンリンク構成蛋白質としての条件を備えていた。これらの蛋白質とネキシンリンクの関係について、現在さらに詳しく調べているところである。

(3) 軸糸微小管上のダイニンの配列機構

鞭毛繊毛運動の原動力を発生するモーター蛋白質ダイニンは、軸糸周辺微小管上のダイニン外腕・内腕と呼ばれる突起中に存在する。クラミドモナスの場合、外腕は3種の力発生蛋白質を含む一つの複合体で、微小管上に24nmの周期、すなわち、チューブリン二量体3個分の間隔で結合している。一方、内腕には7種以上の異なる種類の複合体が存在し、それぞれが微小管上に96nmの周期で結合している。繰り返す単位の中では、それぞれの位置は一定である。そのような規則正しい結合がどのようにして実現されているかは、明らかではない。我々は以前ダイニン外腕と微小管の結合を媒介する蛋白質複合体ODA-DC(ダイニン外腕ドッキング複合体)を発見し、

この構造が 24nm の周期で結合する性質をもつことを明らかにしたが、より複雑な配列を示す内腕の微小管結合については、ほとんど何もわかっていないのが現状である。そこで我々は内腕と軸系微小管の結合機構の解明をめざして、二つの方向の研究を行った。一つは、ある種の内腕を欠失した変異株軸系に内腕ダイニンを再結合させる実験である。脱膜した変異株細胞体に内腕ダイニンを含む軸系抽出液を加えて、ATP 添加によって運動を再活性化したところ、ダイニン分子種 f または c を欠失した変異株の場合には、運動が野生株レベル近くまで回復した。また、電気泳動によって、当該のダイニンが結合することを確認した。したがって、軸系微小管上にはダイニン内腕 f と c の特異的な結合を可能にするサイトが存在すると結論された。しかし、他の種類の内腕ダイニンに関しては、軸系への結合は確認できなかった。ダイニン f、c の特異的結合サイトがどのように決められているか、他のダイニンの場合はどうかなどは今後の課題である。

もう一つの方向の実験は、内腕ダイニンのサブユニットを同定する試みである。これまでの研究により、内腕ダイニンに結合しているサブユニットは、アクチン、28kD 蛋白質 (p28)、セントリン、の 3 種が知られ、それぞれがダイニンの尾部に結合していることが明らかにされていた。これらは内腕ダイニンの微小管結合に関与している可能性がある。そこで、この 3 種以外の内腕サブユニットの検索を行い、ダイニン分子種 d の電気泳動パターン中に新規サブユニット 2 種が存在するのを見いだした。アミノ酸配列の決定、クローニングなどを経て、それらは分子量 38k と 44k の新規蛋白質であることが明らかになった。重要なことに、これら 2 種の蛋白質は、p28 などと同様、運動性鞭毛・繊毛を持つ生物に広く保存されているものであった。このことは、ダイニン内腕の構成そのものが、生物種を超えて保存されていることを強く示唆している。これらのサブユニットが軸系微小管上のどのような蛋白質と相互作用するのか、今後の興味深い課題である。

(4) 鞭毛基部体 9 回対称性確立に重要な 2 種の蛋白質の同定

鞭毛基部体 (basal body) は 9 本の 3 連微小管が回転対称に配置した筒状の構造をもつ。中心子 (centriole) と同様、細胞周期ごとに自己複製するという興味深い性質を持っている。我々は、複雑な基部体の構築機構を解析するには遺伝学的なアプローチが有効であると考え、基部体に異常をもつクラミドモナス突然変異株を単離して解析する研究を行っている。これまでにいくつかの興味深い変異株を単離し、基部体の 9 回対称性構造

の構築機構に関して、重要な知見を得た。

我々は以前、鞭毛基部体を完全に欠失しているが致死にならない突然変異株 *bld10* を単離し、哺乳動物の中心体蛋白質 Cep135 に相同なコイルドコイル蛋白質に異常があることを示した。この蛋白質は基部体内腔のカートホイールという、中央のハブとそこから放射状に配置した 9 本のスポークからなる構造に局在する。その機能を探る目的で、アミノ酸配列を大きく欠損した Bld10p を発現させる実験を行ったところ、C 末端を大きく欠損した Bld10p を発現する細胞の基部体は、カートホイールのスポークが短くなって、先端が細くなることがわかった。しかも驚くべきことに、3 連微小管が 8 本になった基部体が高頻度で形成された。これらの結果と局在の解析から、Bld10p はスポーク先端の構成タンパク質としてカートホイールと 3 連微小管の連結に関与すると結論された。8 回対称性の基部体が形成されたのは、カートホイールの小さくなった円周上に、3 連微小管が 8 本しか収まらなくなったためと推定される。

我々はさらに基部体の微小管数が 9 本に一定せず、7-11 本の間を変動するという興味深い表現型をもつ変異株 *bld12* を単離することに成功した。電子顕微鏡観察により、この変異株はカートホイールの中央部分を欠失していることが判明した。変異遺伝子は、線虫の中心子複製に必須なタンパク質として同定されていた SAS-6 のホモログをコードしていた。このタンパク質の局在を免疫電子顕微鏡法で調べると、まさに *bld12* で欠失していたカートホイールの中央部分にあった。つまり、SAS-6 はこの部分を構成するタンパク質であると考えられる。*bld12* で基部体構造の 9 回対称性が揺らぐのは、カートホイールの 9 本のスポークが正しく放射状に配置できないため、微小管形成の場の数が 9 に限定されなくなるためだと考えられる。これらの結果はいずれも、カートホイールが基部体形成の足場として働き、9 回対称性の確立に重要な役割を担うことを示したものである。このような明快な結果が得られたのは、全生物を通して初めてのことである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Wirschell, M., Yang, C., Yang, P, Fox, L., Yanigasawa, H., Kamiya, R., Witman, G. B., Porter, M. and Sale, W. S. (2009). IC97 is a novel intermediate chain of I1 dynein that interacts with tubulin and regulates interdoublesliding. *Mol. Biol. Cell* 20, 3044-3054.

2. Yagi, T., Uematsu, K., Liu, Z. and Kamiya, R. (2009). Identification of novel dyneins that localize exclusively to the proximal portion of *Chlamydomonas* flagella. J. Cell Sci. 122, 1306-1314.

3. Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R. and Hirono, M. (2007). SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. Curr. Biol. 17, 2169-2174.

4. Hiraki, M., Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M. (2007). Bld10p constitutes the distal fiber of the cartwheel, a crucial structure that stabilizes the 9-fold microtubule arrangement in the centriole. Curr. Biol. 17, 1778-1783.

5. Ikeda, K., Ikeda, T., Morikawa, K. and Kamiya, R. (2007). Axonemal localization of *Chlamydomonas* PACRG, a homologue of the human Parkin-coregulated gene product. Cell Motil. Cytoskeleton 64, 814-821.

6. Yamamoto, R., Yagi, T. and Kamiya, R. (2006). Functional binding of inner-arm dyneins with demembrated flagella of *Chlamydomonas* mutants. Cell Motil. Cytoskeleton 63, 258-265.

7. Yagi, T., Minoura, I., Fujiwara, A., Saito, R., Yasunaga, T., Hirono, M. and Kamiya, R. (2005). An axonemal dynein particularly important for flagellar movement at high viscosity: implications from a new *Chlamydomonas* mutant deficient in the dynein heavy chain gene Dhc9. J. Biol. Chem. 280, 41412-41420.

8. Ikeda, T., Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M. K., Hirono, M. and Kamiya, R. (2005). The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella, FEBS Lett. 579, 819-822.

[学会発表] (計 58 件)

1. 神谷 律 クラミドモナス変異体で探る繊毛の形成と運動機構 第 113 回日本解剖学会総会、大分 (2008 年 3 月 28 日)

2. Yagi, T. and Kamiya, R. Identification of the Genes of All Known *Chlamydomonas* Inner-Arm Dynein Heavy Chains. 46th

Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, USA (December 9-13, 2006).

3. Nakazawa, Y., Kamiya, R. and Hirono, M. A novel *Chlamydomonas* mutant that assembles flagellar axonemes with variable numbers of outer doublet microtubules 12th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Portland, Oregon, USA (May 9-14, 2006).

4. Yanagisawa, H. and Kamiya, R. Novel longitudinal compartmentalization in the axoneme revealed by localization of putative interdoublet link components. 12th International conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Portland, Oregon, USA (May 9-14, 2006).

[図書] (計 1 件)

King, S. M. and Kamiya, R. (2009). Axonemal dyneins: assembly, structure and force generation. In G. B. Witman (ed.), *Chlamydomonas* source book, vol. III, pp. 129- 206. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seiri/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 律 (KAMIYA RITSU)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10124314

(2) 研究分担者

広野 雅文 (HIRONO MASAFUMI)

東京大学・大学院・理学系研究科・准教授

研究者番号：10212177

八木 俊樹 (YAGI TOSHIKI) (2007 年まで)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40292833

(3) 連携研究者

該当なし。