

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16123

研究課題名（和文）カルシウムイオン依存的な鞭毛構築機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of calcium ion dependent flagellar assembly

研究代表者

久保 智広（Kubo, Tomohiro）

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：70778745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カルシウムは筋収縮、神経伝達、遺伝子発現制御、鞭毛繊毛の波形変換など多様な生命機能の調節や維持に関わる。例えば真核生物鞭毛（繊毛と同義）の構築にはカルシウムイオンが必須であることが分かっているが、果たしてカルシウムが鞭毛関連遺伝子の発現制御を行うのか、あるいはどの鞭毛蛋白質に影響を与えて鞭毛の伸長を調節するのか、など詳しい仕組みはほとんど分かっていない。そこで、本研究では鞭毛のモデル生物、単細胞緑藻類クラミドモナスを用い、カルシウムによる鞭毛構築機構を解明しようとした。その結果、カルシウムイオンが脱重合キネシン依存的な鞭毛形成に影響を与えている可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の鞭毛は、細胞の遊泳、水流形成、物質輸送、シグナル伝達に関わるため、生体内において重要な役割を持つ。例えば、初期胚のノードでは水流を形成することにより蛋白質の濃度勾配、および遺伝子発現パターンの非対称性を生み出し、それが体の左右軸形成の起因となっている。また、生体内の繊毛が異常になると、内臓逆位、不妊、水頭症、認知障害、網膜色素変性症、嚢胞腎など、繊毛病と総称される疾患を引き起こす。本研究は、カルシウムイオン依存的な鞭毛繊毛の構築機構を追究するものである。多くの生体機能や疾患に関わる鞭毛の構築機構の本質を理解することは、基礎生物学的および医学的に重要である。

研究成果の概要（英文）：Calcium ion is involved in various biological functions such as muscle contraction, neurotransmission, gene expression, and waveform conversion of cilia/flagella. Calcium ion is known to be important for the assembly of cilia/flagella, but precise molecular mechanism is unclear. In this study, I used a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, to investigate calcium ion dependent flagellar assembly. I found that depolymerization kinesin may be controlled by calcium ion during flagellar regeneration of *Chlamydomonas*.

研究分野：細胞生物学

キーワード：鞭毛 クラミドモナス カルシウムイオン 脱重合キネシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の鞭毛は、細胞の遊泳、水流形成、物質輸送、シグナル伝達に関わるため、生体内において重要な役割を持つ。例えば、初期胚のノードでは水流を形成することにより蛋白質の濃度勾配、および遺伝子発現パターンの非対称性を生み出し、それが体の左右軸形成の起因となっている。また、生体内の繊毛が異常になると、内臓逆位、不妊、水頭症、認知障害、網膜色素変性症、嚢胞腎など、繊毛病と総称される疾患を引き起こす。このように多くの生体機能や疾患に関わる鞭毛の構築機構の本質を理解することは、基礎生物学および医学的に重要である。

カルシウムイオンは多様な生命活動に関わっている。特に鞭毛の構築にも関与することが示唆されており、例えば、鞭毛構築を担う鞭毛内輸送系(Intraflagellar transport, IFT)との関係が報告されている。しかし、これらの論文で記載されている因子に加えてさらに多くの遺伝子や蛋白質がカルシウムの制御下にあると考えられ、より包括的な理解が必要である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、鞭毛を研究する上で便利なクラミドモナスを用い、カルシウムが鞭毛構築に与える影響を調べることを目的とした。クラミドモナスは2本の鞭毛を持つ単細胞緑藻類で、鞭毛の再生を観察することが容易である。不思議なことに、培地中のカルシウムイオンを枯渇させると、生存に影響はないものの、クラミドモナスは鞭毛の構築に異常を示す。私はこの点に着目して、カルシウムが鞭毛構築に果たす役割を明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

そのため、研究開始当初は次の3つの研究方法を設定した。すなわち、(1) 脱鞭毛後の細胞を用いたトランスクリプトーム解析、(2) カルシウム感受性に異常を持つ変異株の単離・同定、(3) 鞭毛の構築速度が遅い変異株におけるカルシウムの影響の解析、である。しかし、いくつか予備実験を行ったところ、(3)に関連したテーマを重点的に推進した方が良いと判断したため、以下の3つの方法を行うことに修正した。すなわち、

- (A) 鞭毛の構築速度が遅い変異株におけるカルシウムイオンの影響の解析
 - (B) クラミドモナスにおける新規合成蛋白質標識法の確立
 - (C) カルシウムイオンに対する脱重合キネシンの影響
- である。

4. 研究成果

(A) 各種鞭毛構造蛋白質欠損株の鞭毛再生: カルシウムイオンの影響

研究開始の当初、外腕ダイニン欠損株はカルシウムイオン非存在下において、鞭毛構築が行えないことが分かっていた。そこで、外腕ダイニン欠損株以外の鞭毛再生速度およびカルシウムイオンの影響を検討することにした(図1)。外腕ダイニン欠損株(*oda1*, *oda2*)、内腕ダイニン欠損株(*ida1*, *ida4*, *ida5*, *ida6*)、ダイニン制御複合体欠損株(*sup-pf-5*, *pf2*)、ラジアルスポーク欠損株(*pf14*)、中心対微小管欠損株(*pf18*)の鞭毛再生速度を検証したところ、いずれも野生株と比較して優位に遅い鞭毛再生速度を示すことが分かった。中心対微小管、ラジアルスポークなどの欠損が特に重篤な影響を及ぼすことも分かった。これらの株の鞭毛再生に対してカルシウムイオンの影響を検証したところ、いずれの株に対しても、カルシウムイオンは鞭毛の再生率や再生速度を上昇させる傾向があることが明らかになった。

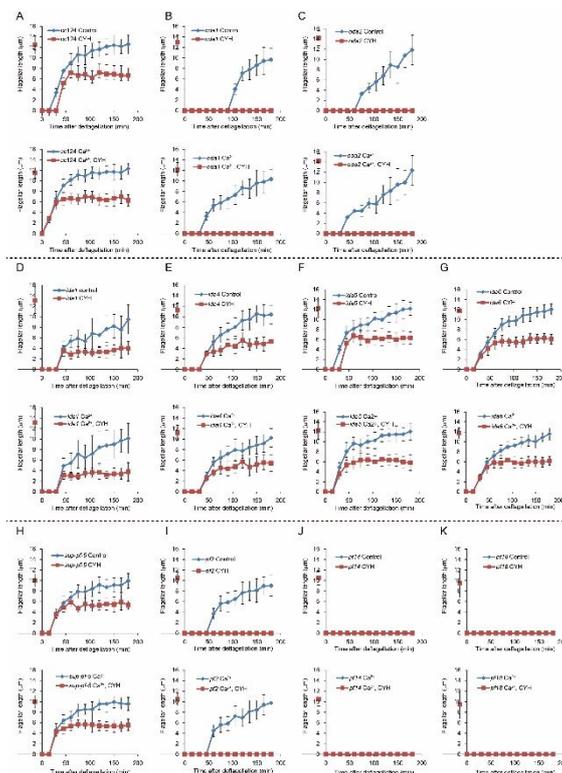


図 1

(B) クラミドモナスにおける新規合成蛋白質標識法の確立

クラミドモナスは pH ショックなどの刺激によって鞭毛を脱離するが、その後約 2 時間かけて元の長さに鞭毛を再生する。カルシウム依存的な鞭毛構築の仕組みを探るための基盤とするため、Surface sensing of translation (SUnSET)法が鞭毛再生中のクラミドモナスに適用できるかを検証した。SUnSET 法は、新規合成ポリペプチド鎖に取り込まれた抗生物質ピューロマイシンを特異的な抗体によって生化学的に検出する方法である。鞭毛再生中のクラミドモナスに対してピューロマイシンを処理したところ、クラミドモナスにおいても SUnSET 法によって、生化学的に新規合成蛋白質を検出することが可能であることが分かった(図 1)。

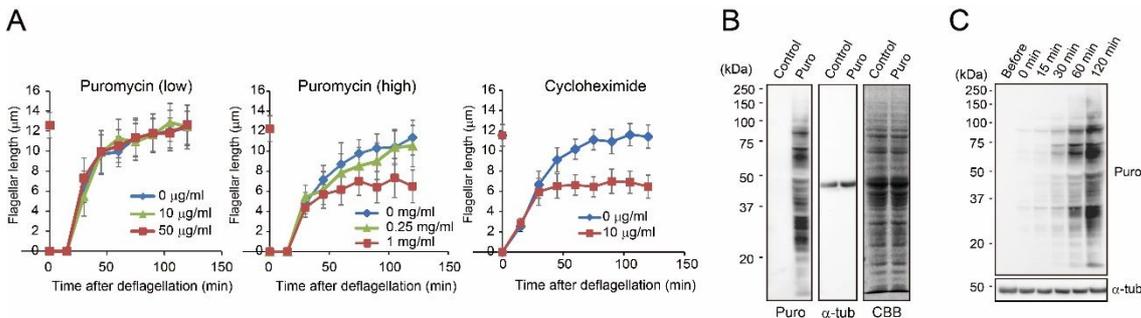


図 2

また、ピューロマイシン標識蛋白質が鞭毛へ取り込まれるかどうかを検証したところ、ピューロマイシン処理を行わなかった細胞はシグナルを示さなかったが、ピューロマイシン処理を行った細胞は鞭毛軸系、鞭毛基部体において強いシグナルを示した(図 2)。鞭毛蛋白質は細胞体において合成され、その後鞭毛内輸送系によって鞭毛内へ運び込まれる。この結果は、ピューロマイシン標識が付加されていても鞭毛蛋白質は正常に鞭毛内へ輸送されることを示す。

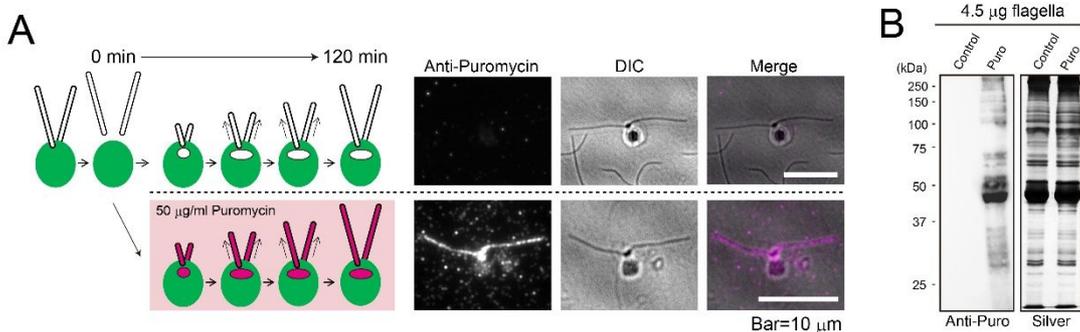


図 3

これらの結果はすでに雑誌へ投稿し、査読の最中である(2022/6/13 現在)。この方法を用いて、カルシウム依存的に鞭毛の蛋白質が合成されるかどうかを検証したところ、当初の予想に反して、カルシウムイオンは鞭毛蛋白質の合成を促進しないことが分かった。また、鞭毛の再生が野生株と比較して優位に遅い外腕ダイニン欠損株は、鞭毛に新規合成蛋白質を多く取り込む性質があることが分かった。

(C) 脱重合キネシンによるカルシウム依存的な鞭毛構築機構

リン酸化した脱重合キネシン kinesin-13 が鞭毛構築に関与すると報告されている [Piao et al (2009); Wang et al (2013)]。私は、kinesin-13 がカルシウムイオン依存的な鞭毛再生に関与している可能性を考えて、鞭毛再生時における kinesin-13 のリン酸化を検証することにした。鞭毛再生が遅い変異株はいずれも脱重合キネシンのリン酸化が抑制されていることが分かった(図 3)。

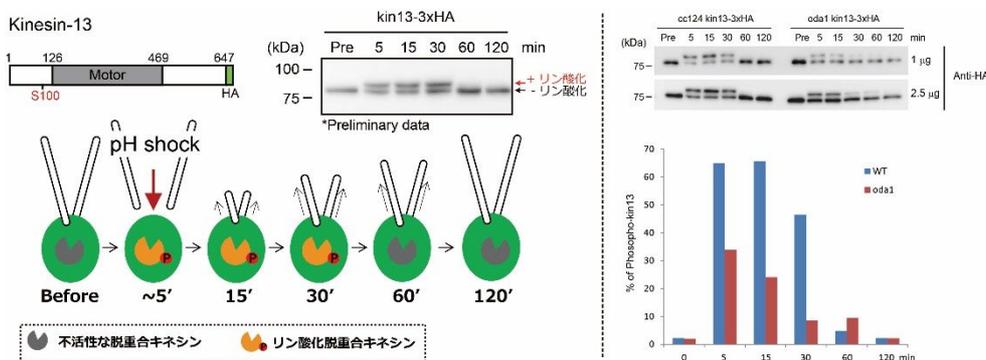


図 4

現在は、kinesin-13 のリン酸化とカルシウムイオンの関係性を追究している最中である。研究期間中に脱重合キネシンとカルシウムイオンの関係性の詳細を明らかにするには至らなかったものの、(A)-(C)の研究結果は、カルシウムイオン依存的な鞭毛再生機構を理解する上で大きな基盤になるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕計 4 件: (1)は査読中

(1) Kubo T*, Kanou N, and Oda T. (2022). Puromycin is incorporated into regenerating flagella of *Chlamydomonas reinhardtii* as an indicator of nascent flagellar proteins. bioRxiv.

(2) Hou Y, Zhao L, Kubo T, Cheng X, McNeill N, Oda T, and Witman GB. (2021). *Chlamydomonas* FAP70 is a component of the previously uncharacterized ciliary central apparatus projection C2a. *J Cell Sci.* 134: jcs258540.

(3) Craft Van De Weghe J, Harris JA, Kubo T, Witman GB, and Lechtreck KF. (2020). Diffusion rather than intraflagellar transport likely provides most of the tubulin required for axonemal assembly in *Chlamydomonas*. *J Cell Sci.* 133: jcs249805.

(4) Picariello T, Hou Y, Kubo T, McNeill NA, Yanagisawa HA, Oda T, and Witman GB. (2020). TIM, a targeted insertional mutagenesis method utilizing CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One.* 15: e0232594.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 久保智広、加納夏美、小田賢幸 (2021/11/22). SUNSET 法による鞭毛構築中の新規合成蛋白質のモニタリング . 第 11 回繊毛研究会 (オンライン開催) .

(2) 久保智広、青田海人、高橋光規、加納夏実、小田賢幸 (2021/7/2). 単細胞緑藻類クラミドモナスを用いた鞭毛内輸送系蛋白質 IFT38 の機能解析 . 第 73 回日本細胞生物学会 (オンライン開催) .

(3) 久保智広 (2021/3/5) .チューブリンポリグルタミン酸化修飾による鞭毛繊毛の運動制御: α チューブリン改変株を用いた解析 . 第 14 回クラミドモナス研究会(オンライン開催)

(4) 久保智広、加納夏実、小田賢幸 . (2019/11/25) . カルシウムイオン依存的な鞭毛構築機構の解明 . 第 10 回繊毛研究会 (東京農工大学)

(5) Kanou N, Kubo T and Oda T. (2019/9/5-9/6). Ca²⁺ signaling surpasses the suppression of flagellar assembly in the axonemal dynein-lacking mutant. 第 13 回クラミドモナス研究会 (東京工業大学)

(6) Kubo T and Oda T. (2019/9/5-9/6). Identification of polyglutamylated sites in *Chlamydomonas* α -tubulin. 第 13 回クラミドモナス研究会 (東京工業大学)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Craft Van De Weghe Julie, Harris J. Aaron, Kubo Tomohiro, Witman George B., Lechtreck Karl F.	4. 巻 133
2. 論文標題 Diffusion rather than intraflagellar transport likely provides most of the tubulin required for axonemal assembly in <i>Chlamydomonas</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.249805	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Picariello Tyler, Hou Yuqing, Kubo Tomohiro, McNeill Nathan A., Yanagisawa Haru-aki, Oda Toshiyuki, Witman George B.	4. 巻 15
2. 論文標題 TIM, a targeted insertional mutagenesis method utilizing CRISPR/Cas9 in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232594	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Picariello Tyler, Hou Yuqing, Kubo Tomohiro, McNeill Nathan A., Yanagisawa Haru-aki, Oda Toshiyuki, Witman George B.	4. 巻 15
2. 論文標題 TIM, a targeted insertional mutagenesis method utilizing CRISPR/Cas9 in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0232594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0232594	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hou Yuqing, Zhao Lei, Kubo Tomohiro, Cheng Xi, McNeill Nathan, Oda Toshiyuki, Witman George B.	4. 巻 134
2. 論文標題 <i>Chlamydomonas</i> FAP70 is a component of the previously uncharacterized ciliary central apparatus projection C2a	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258540	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomohiro Kubo and Toshiyuki Oda
2. 発表標題 Identification of polyglutamylation sites in Chlamydomonas a-tubulin
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsumi Kanou, Tomohiro Kubo and Toshiyuki Oda
2. 発表標題 Ca ²⁺ signaling surpasses the suppression of flagellar assembly in the axonemal dynein-lacking mutant
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保智広、加納夏美、小田賢幸
2. 発表標題 カルシウムイオン依存的な鞭毛構築機構の解明
3. 学会等名 第10回繊毛研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保智広
2. 発表標題 チューブリンポリグルタミン酸化修飾による鞭毛纖毛の運動制御： チューブリン改変株を用いた解析
3. 学会等名 第14回クラミドモナス研究会(オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保智広, 青田海人, 高橋光規, 加納夏実, 小田賢幸
2. 発表標題 単細胞緑藻類クラミドモナスを用いた鞭毛内輸送系蛋白質IFT38の機能解析
3. 学会等名 第73 回日本細胞生物学会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保智広, 加納夏美, 小田賢幸
2. 発表標題 SUnSET法による鞭毛構築中の新規合成蛋白質のモニタリング
3. 学会等名 第11回繊毛研究会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関