

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 20～21 年

課題番号：20770119

研究課題名（和文）

軸糸周辺微小管間架橋構造蛋白質の機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of structural proteins of the axonemal inter-doublet links

研究代表者

柳澤 春明 (Haruaki Yanagisawa)

東京大学大学院 理学系研究科

研究者番号：70466803

研究成果の概要（和文）：

真核生物の繊毛・鞭毛軸糸の周辺微小管は、ネキシリンクと呼ばれる伸縮性を持つ構造によって架橋されている。この構造は、軸糸構造の保持と周辺微小管間に生じる滑り運動を屈曲へと変換する上で重要であり、初期の電子顕微鏡観察で見いだされていたが、蛋白質としての実体は殆どわかっていなかった。本研究では、架橋構造が残る条件で抽出した軸糸残渣から候補蛋白質を複数クローニングし、局在および変異体の解析により架橋構造への関与を確認した。

研究成果の概要（英文）：

The outer doublet microtubules in ciliary and flagellar axonemes are connected with each other by elastic links called the interdoublet (nexin) links. These structures are important for maintenance of axonemal structure and converting sliding between doublets into bending. The link has been found in early electron microscopic studies, but little is known about its molecular composition. In this study I cloned putative nexin components from partially extracted axonemes, in which outer doublets remained connected together. Localization and mutational analyses confirmed the involvement of these components in the nexin links.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	500,000	150,000	650,000
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：細胞運動, 鞭毛・繊毛

1. 研究開始当初の背景

真核生物鞭毛・繊毛の軸糸は、他の細胞運動器官には見られない特徴的な屈曲運動を発生する。軸糸の基本骨格は、9本の周辺微小管と2本の中心対微小管からなる9+2構造であり、軸糸運動の原動力であるモーター蛋白質ダイニンは隣接する周辺微小管の間に直線的な滑り運動を発生する。この直線的な運動を屈曲運動へと変換する過程には、周辺微小管間に存在する架橋構造が必要である。この構造は約30年前に発見されていたにもかかわらず、蛋白質としての実体はこれまで不明であった。

近年、この架橋構造を構成する蛋白質の同定を目指す研究が2つのアプローチで行われた。1つは緑藻クラミドモナスの軸糸を材料とし、架橋構造がプロテアーゼ感受性である性質を指標にした方法で、候補蛋白質 Rib72 が同定された (Ikeda et al. 2003)。もう1つは複数生物の鞭毛プロテオームの比較で保存されている蛋白質について鞭毛虫トリパノゾーマで網羅的に RNAi を行い、軸糸構造の異常を指標として候補を選択する方法で、PACRG, TbCMF9, TbCMF76b が同定された (Dawe et al. 2005, Baron et al. 2007)。

しかし、いずれの候補蛋白質も架橋構造自体には局在せず、架橋そのものの構成蛋白質ではないと考えられた。

私は本研究開始直前に、架橋構造が保持されるような複数の条件でクラミドモナス軸糸を生化学的に抽出し、残渣に共通して含まれる蛋白質を候補とするという新しい方法で、候補蛋白質 p120 を同定していた。予備的な局在解析の結果、p120 は周辺微小管間をつなぐ伸縮性の構造に局在した。また軸糸全長ではなく先端側 2/3 のみに存在することがわかった。この結果から p120 以外で構成される架橋構造の存在も示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、周辺微小管間架橋構造を構成する蛋白質群を網羅的に同定し、それらの相互作用、構造および性質を解析することを最終的な目的とした。補助金交付期間内には、複数種存在する架橋構造それぞれの構成蛋白質レベルの差異の解明、架橋構造の中核をなす蛋白質について構造や力学的性質の解明を目指した。具体的には、p120 を含まない軸糸基部架橋構造はどのような蛋白質群によって形成されているのか、架橋構造を再構

成するには p120 以外にどの蛋白質が必要か、p120 はどのような構造で架橋を形成しているのか、またどのような力学的性質を示すのか、架橋構成蛋白質の構造および力学的性質が鞭毛運動にどのように寄与しているのか、を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

緑藻クラミドモナスを材料として用いた。この生物は遺伝学的解析が可能であり、現在までに多数の軸糸構造変異株が単離されている。また生化学的解析に十分な量・純度の鞭毛試料を容易に精製できる。

(2) 架橋構造構成蛋白質群の探索

軸糸を特性の異なる界面活性剤、塩を用い架橋構造が残る条件で抽出を行い、残渣に共通して含まれるバンドを選択した。質量分析による同定、抗体作成を行った。電子顕微鏡による局在観察、既知の軸糸構造変異株での有無を検討することで、架橋構造蛋白質であることを検証した。

(3) p120 結合蛋白質の探索

軸糸の化学架橋、プロットオーバーレイにより p120 に結合する蛋白質を探索した。軸糸の構造保持に働いているとされる蛋白質群 Rib72, PACRG, FAP58 (TbCMF9, TbCMF76b のクラミドモナスホモログ) についても確認を行った。

(4) p120 蛋白質の特性解析

昆虫細胞発現系で作成した組換え p120 蛋白質を用いて、溶液中での存在状態をゲル濾過、分析用超遠心を用いて分析した。

(5) 架橋構造変異株の単離と解析

架橋構造蛋白質の変異により、鞭毛形成異常、運動波形異常が引き起こされると予想し、化学変異誘発剤を用いて作成した約 1000 株の短鞭毛、波形異常変異株について、候補蛋白質の抗体でスクリーニングを行った。その一部について原因遺伝子の決定を行った。また過去に単離された遺伝子未同定の短鞭毛変異株、波形異常変異株についても同様の解析を行った。変異株の軸糸について、電子顕微鏡による構造異常観察、高速度カメラによる波形観察を行った。

4. 研究成果

(1) p120 は免疫電子顕微鏡観察で周辺微小管間を架橋する構造に局在しており (図 2), プロテアーゼ感受性を持ち, アミノ酸配列から弾性を持った構造が予測されるなど, これまでに観察されていた架橋構造の性質を満たした. 周辺微小管間を架橋する蛋白質が見つかったのはこれが初めてである.

興味深いことに間接蛍光抗体法による観察で p120 は軸糸基部~2.5 μm には存在しないことがわかった (図 2). 軸糸基部は基底小体から脱落した後も周辺微小管間の滑りに抵抗性で, この部分の架橋構造は形態的にも他の部分とは異なる (図 1). また, 鞭毛伸長過程の観察から, 形成直後の軸糸には p120 がわずかしこ存在しないことがわかった. 以上の結果から, p120 による架橋構造以外にも性質の異なる複数種の架橋構造が存在することも示唆された.

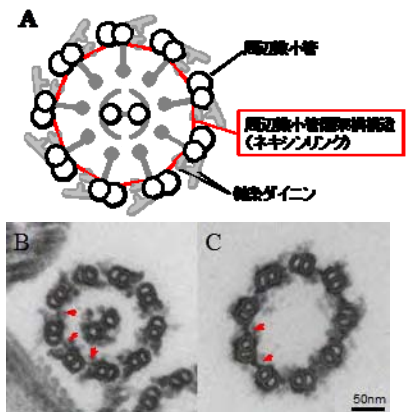


図 1. A: 鞭毛軸糸の横断面模式図. B: クラミドモナス *pf14* 株軸糸横断面の電子顕微鏡像. 赤矢印で架橋構造を示した. C: 軸糸基部付近の横断面, B と形態の異なる架橋構造が観察できる.

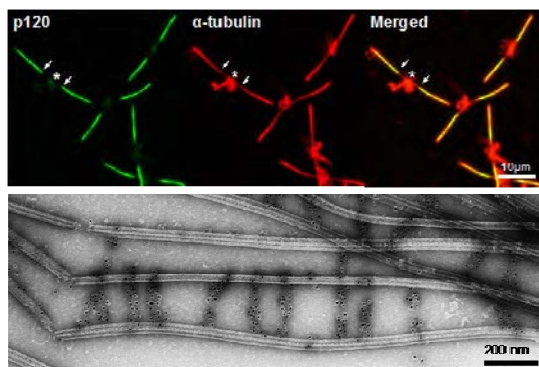


図 2. 周辺微小管間架橋蛋白質 p120 の局在. 上: 間接蛍光抗体法による観察. クラミドモナスは 2 本の鞭毛を持つ. 鞭毛基部の位置を*で示した. p120 は鞭毛基部~2.5 μm (白矢印) を除く全長に局在する. 下: 免疫電子顕微鏡法による観察, 金コロイドラベル. p120 は周辺微小管間を架橋する伸縮性の繊維構造に局在.

(2) 組み替え蛋白質として発現させた p120 は 2~4 量体を形成していた. p120 のみでは微小管と結合しなかったため, 架橋構造を形成するためには他の因子が必要と考え, p120 の相互作用蛋白質を探索した. 結果, 軸糸蛋白質 PACRG と直接相互作用することが明らかになった. PACRG が微小管結合性を持つことは以前の研究で報告されている (Ikeda 2008).

さらに, PACRG を欠失するクラミドモナス変異株を初めて単離することに成功した. この変異株は野生型と同程度の長さの鞭毛を形成するが, 対称に近い異常な鞭毛波形のために遊泳できない. この変異株では, p120 の存在量が約 1/3 に減少しており, p120 が局在する構造が一端のみで周辺微小管に結合していた.

PACRG の周辺微小管上の位置はこれまで不明であったが, 今回 GFP タグを付加して免疫電子顕微鏡法で観察した結果, 架橋構造の基部付近に存在することがわかった.

PACRG の機能はこれまでほとんどわかっていなかった. 本研究によって p120 を含む架橋構造を周辺微小管にアンカーしていることがはじめて明らかになった.

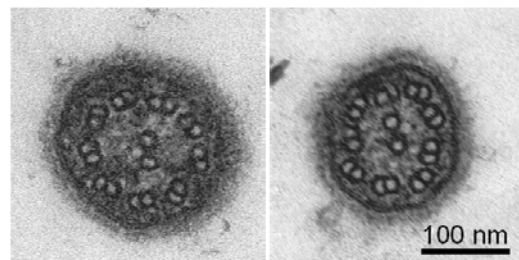


図 3. p102 欠失変異株軸糸の横断面. 一部の周辺微小管が軸糸内側に落ち込んでいる.

(3) p120 以外で構成される架橋構造の蛋白質を同定する目的で, 架橋構造を保持した軸糸の抽出残渣に含まれる蛋白質 3 種を新たにクローニングした. このうち, 102 kDa の高度に保存された機能未知コイルドコイル蛋白質 (p102) について, 欠失変異株を単離することに成功した. p102 変異株は野生型の約 1/10 程度の短い鞭毛しか形成できない. さらに周辺微小管間の結合に異常を示し, 一部の周辺微小管が, 軸糸内部に落ち込んだ像が高頻度で観察された (図 3).

類似した表現型が報告されていた遺伝子未同定の短鞭毛変異株 6 種 (McVittie 1972, Forest 1983) について解析をおこなったところ, うち 1 種が p102 の変異体であることがわかった. うち 3 種は 105 kDa の高度に保存された機能未知コイルドコイル蛋白質

(p105) に変異を持つことがわかった。さらに p102 と p105 が軸糸中で直接結合しており、軸糸全長にわたって存在することも明らかになった。PACRG 変異株で存在量が変動しないことから p102 と p105 は、p120 とは独立した架橋構造を形成していると考えられる。

鞭毛・繊毛運動において重要な役割を果たしているにもかかわらず、これまで周辺微小管間架橋構造の研究は電子顕微鏡による軸糸の形態観察、軸糸全体の力学的測定などに限られていた。本研究によってはじめて構成蛋白質の一部が同定され、異なった複数種の架橋構造が存在することも明らかになった。今後、本研究の結果を足がかりとして、相互作用を指標に解析を進めれば、架橋構造を構成する蛋白質群の全容が明らかになると期待できる。

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 3 件)

Wirschell M, Yang C, Yang P, Fox L, Yanagisawa HA, Kamiya R, Witman GB, Porter ME, Sale WS.

IC97 is a novel intermediate chain of I1 dynein that interacts with tubulin and regulates interdoubtlet sliding.

Molecular Biology of the Cell. 査読有,
20 巻, 2009 年, 3044-3054.

Furuta A, Yagi T, Yanagisawa HA, Higuchi H, Kamiya R.

Systematic comparison of in vitro motile properties between Chlamydomonas wild-type and mutant outer arm dyneins each lacking one of the three heavy chains.

Journal of Biological Chemistry. 査読有,
284 巻, 2009 年, 5927-5935.

Kubo T, Yanagisawa HA, Yagi T, Hirono M, Kamiya R.

Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins.

Current Biology. 査読有,
20 巻, 2010 年, 441-445.

[学会発表] (計 1 件)

Haruaki Yanagisawa and Ritsu Kamiya
Mutants that lack PACRG, a highly conserved axonemal protein, produce flagella defective in intra-doubtlet structures
13th International *Chlamydomonas* Conference
2008/5/27~6/1
Hyerres-les-Palmiers, France

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳澤 春明 (Haruaki Yanagisawa)

研究者番号 : 70466803