

平成 23 年 2 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 20～21 年

課題番号： 20770152

研究課題名（和文） 鞭毛・繊毛のレドックス・シグナリングの分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of redox signaling in eukaryotic cilia/flagella

研究代表者 若林憲一（Wakabayashi Ken-ichi）

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：80420248

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、緑藻クラミドモナスを材料として、i) 鞭毛内で機能しているダイニン活性を調節するレドックス（酸化還元）シグナリング経路を分子レベルで明らかにすること ii) 鞭毛内の酸化還元状態がどのような条件で変化し、そのとき i) の経路がどのように働くかを明らかにすることであった。

第一の目的については、具体的にはダイニンサブユニットのうち LC3, LC5, DC3 という 3 つのレドックス感受性タンパク質の基質を明らかにすることであった。これらの基質タンパク質を少量精製する方法を開発することに成功したが、期間内に同定に足る量の精製には至らなかった。しかし、今後も研究を続けることで同定に至るものと確信している。

第二の目的については、レドックス感受性 GFP を導入したクラミドモナス株を作製することで、鞭毛内レドックス状態を直接モニターできる系を開発した。現在鞭毛内酸化還元電位をリアルタイムで計測する実験が進行している。今後、レドックス依存的な運動変化を行う鞭毛の、変化の閾値などの詳細が明らかにする。

研究期間中の副産物的な成果として、2 つの発見があった。1 つ目に、攪拌された培養液中の細胞の鞭毛打頻度がカルシウム依存的に上昇するという新奇の現象を見出した。その後の詳しい研究により、ずり応力によって機械刺激チャンネルと電位依存性カルシウムチャンネルが連動し、鞭毛内カルシウム濃度が上昇することで外腕ダイニン活性が上昇することがわかった。この成果を論文にまとめ、*Cell Motility and the Cytoskeleton* 誌に受理された。2 つ目に、膜透過性酸化・還元薬剤処理細胞の行動観察により、クラミドモナスの走光性の符号（正か負か）がレドックスで調節されていることを発見した。細胞が光に向かうか逃げるかを定める切り替え機構は長い間謎であったが、本研究により初めてそれが、光合成活性などで変化する細胞内レドックス状態で調節されていることが見出された。この知見については現在論文を投稿中である。

研究成果の概要（英文）：

In this project, I have set two goals: i) identification of substrate proteins of the redox-sensitive dynein components in *Chlamydomonas* flagella; ii) elucidation of functions of redox-signaling pathway(s) in *Chlamydomonas* flagella including proteins identified in i).

With regard to i), mutagenized and HA-tagged LC3/LC5/DC3 were successfully expressed in *Chlamydomonas* cells and incorporated to flagella as the dynein subunits. The mutations were designed to trap substrate proteins *in vivo* via intermolecular disulfide bonds. However, because of low expression of those mutagenized proteins, I have not purified sufficient amounts of substrate proteins for identification *via* mass spec. This experiment is still underway.

With regard to ii), because the experiments for i) are still underway, I have started a new experiment to quantify the redox state of flagellar cytoplasm. From our previous study, it

has been shown that the flagellar cytoplasmic redox state changes depending on the photosynthetic activity. The redox-signaling pathways must sense the flagellar redox state. Using a newly generated transformant expressing redox-sensitive GFP, currently I am trying to quantify the redox state of the *Chlamydomonas* flagellar redox state.

Two novel regulation mechanisms for flagellar motility have been discovered in this project other than the results above. First, the flagellar beat frequency elevates upon mechanical stimuli in a calcium-dependent manner. Second, the sign (or direction) of phototaxis in *Chlamydomonas* is redox-regulated. The first study is published as a paper in Cell Motility and the Cytoskeleton, and the second study has been submitted and is under review.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：鞭毛；ダイニン；レドックス；クラミドモナス；チオレドキシシ

1. 研究開始当初の背景

2006年の我々の研究によってはじめて鞭毛運動がレドックス（酸化還元反応）で調節されていることが明らかになった。即ち、還元時には外腕ダイニン活性が上昇して鞭毛打頻度が上昇し、また波形変換の持続時間が短くなる。逆に、酸化時には鞭毛打頻度が低下し、波形変換持続時間が長くなる。この調節機構は、通常「やや還元的」な状態に保たれる細胞質の酸化還元電位が、光合成活性の変化によって上昇・下降することによって起きると考えられる。

上記の鞭毛内の酸化・還元状態の変化に応じて、鞭毛の運動性が変化すると同時に、外腕ダイニンのレドックス感受性のある3つのサブユニット LC3, LC5（ともにチオレドキシシファミリータンパク質）、外腕ダイニン基部に存在するドッキング複合体のサブユニット DC3（レドックス感受性カルシウム結合タンパク質）が相互作用する相手のタンパク質が変化していた。このことはこれらのタンパク質がダイニンの調節機構に関わっていることを示唆していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は2つある。

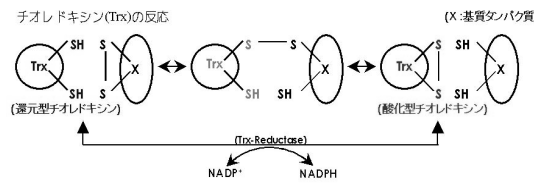
- (1) ダイニンサブユニット LC3, LC5, ダイニンドッキング複合体サブユニット DC3が相互作用する基質タンパク質を同定する。
- (2) 鞭毛内の酸化・還元状態に応じて、(1)の酸化還元関連タンパク質群が生体内でどのように機能しているかを明らかにする。

上記のことを明らかにするために、真核生物鞭毛研究において分野をリードする実験材料である緑藻クラミドモナスを用いて研究を行う。

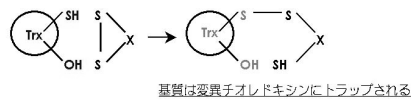
3. 研究の方法

- (1) ダイニンサブユニットの基質の探索
今回扱う3つのレドックス感受性ダイニンサブユニットは、すべて C_{xx}C というモチーフをもつ。(LC3, LC5はチオレドキシシファミリーであり、その良く保存された機能モチーフ CGPC をもつ。DC3はカルモジュリン様のレドックス感受性カルシウム結合タンパク質であり、機能的なEFハンド内にCDGCのモチーフをもち、還元的状態のときのみカルシウムを結合する。) このうち2つ目のCysをSerに置換すると、基質タンパク質

との間に分子間ジスルフィド結合を形成してトラップする。(下図)



GFP → O3FS の変異チオレドキシンの反応



この方法を用いて、クラミドモナスに変異型 LC3, LC5, DC3 を発現させ、生体内で基質をトラップさせたのち、LC3/LC5/DC3-基質複合体を精製・同定する。

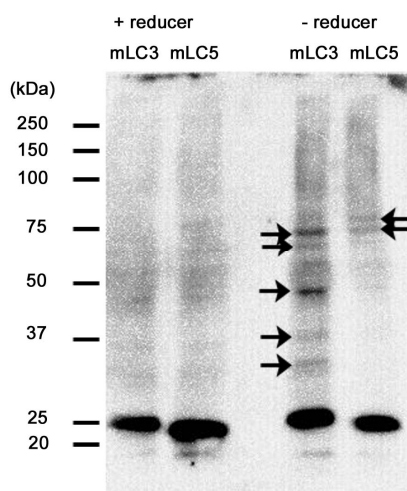
(2) 鞭毛内レドックス・シグナリング経路の生体内での機能解析

(1) で同定したタンパク質群が、細胞内が酸化・還元状態に偏ったときにどのようにタンパク質間相互作用を変化させるか、それぞれに特異的な抗体を作製して、酸化還元状態などを調べる。

4. 研究成果

(1) ダイニンサブユニットの基質のトラップ

まず、LC3, LC5 の cDNA に変異を導入して HA タグを付加し、野生株細胞に発現させた。この細胞から鞭毛を単離し、還元剤の有・無でサンプルを調製してウエスタンブロッティングを行ったところ、確かに生体内で基質をトラップしていることがわかった (下図)。



(変異型(m)LC3/LC5 発現株鞭毛の HA 抗体によるウエスタンブロット。→が mLC3/LC5-基

質複合体を示すバンド。)

この産物を HA-tag 抗体を用いた免疫沈降法による精製を試みた。LC5 については、産物の 1 つに β チューブリンが含まれていることが質量分析から明らかになったが、LC5 と微小管との距離から考えると不自然であり、免疫沈降時の非特異的結合であった可能性が否定できない。現在、このことの信ぴょう性を追求している。DC3 も含め、その他の産物の質量分析に足る大量精製には至らなかった。現在、これらの産物の精製を継続している。

(2) 鞭毛内レドックス・シグナリングの生体内での機能解析

(1) での基質タンパク質同定が未完に終わったため、シグナリング経路の機能解析は期間中にできないことが 2 年目終了時に予測された。そのため、繰り越し期間を用いてタンパク質が同定ができた際に必要になる、鞭毛内のレドックス状態のリアルタイム観察の系を立ち上げた。

2004 年に Hanson らによって、緑色蛍光タンパク質 GFP に 3 か所の点変異を導入すると「レドックス感受性 GFP」になることが見出された。この redox-sensitive GFP(roGFP)は、通常 488 nm しか吸光ピークをもたない GFP が、酸化的になると 405 nm 近辺のピークももつというものである。現在、DC3 と roGFP をタンデムにつないだコンストラクトを DC3 欠失株 *oda14* に導入して形質転換株を得た。除膜細胞を酸化・還元バッファに懸濁して蛍光顕微鏡で観察したところ、確かに酸化時にのみ ~370 nm の紫外線によっても蛍光が観察されることがわかった。

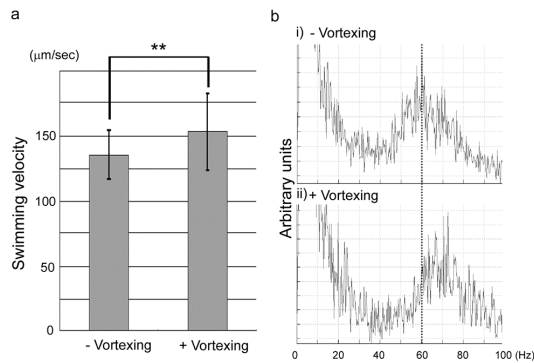
今後は、(1) でのタンパク質同定を急ぎ、(2) の情報を利用して、どのようなレドックス状態のときにどのようなタンパク質が機能しているかを探ることを目標にする。

(3) 副産物的な研究成果

(i) 機械刺激による鞭毛運動活性化

(1) の実験を行う際に酸化還元薬剤でクラミドモナス細胞を処理する必要があった。この過程で、コントロールの薬剤無処理細胞であっても、強く攪拌することによって運動性が一定時間向上することを見出した。

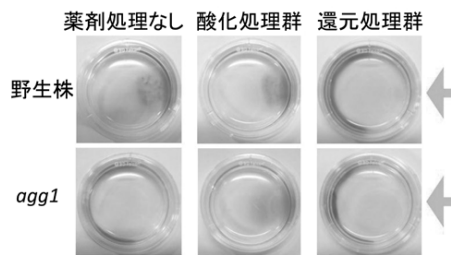
(図 a: ボルテックスミキサーによる攪拌で、クラミドモナスの遊泳速度が 10% 上昇する。図 b: 同じく、鞭毛打頻度 (外腕ダイニン活性にほぼ等しい) が 10% 上昇する。)



ミュータントや薬剤を用いた実験により、これが機械刺激により伸展性機械刺激応答チャネルが活性化し、次いで電位依存性カルシウムチャネルが開くことによってカルシウム依存的に外腕ダイニン活性が上昇することによって起きる現象であることがわかった。この成果を論文にまとめ、*Cell Motility and the Cytoskeleton* 誌に受理された。

(ii) 走光性符号のレドックス調節

(i)と同様に、クラミドモナス細胞を酸化還元薬剤処理して細胞行動を観察したところ、走光性の符号(正(光に向かう)か負(光から逃げる)か)がレドックス調節されていることを見出した。



(クラミドモナス培養液をディッシュにいれ、右から光を当てた。野生株は正の走光性を示す光条件にしている。*agg1*は常に負の走光性を示すと報告されてきた突然変異株。2つの株ともに酸化処理で正、還元処理で負の走光性を示す。)

走光性の符号の調節は最適な光条件下で生息するために緑藻類にとって不可欠であるが、これまでそのしくみは全くわかっていなかった。今回はじめて、意外なことにそれが細胞内のレドックス状態で調節されていることがわかった。このことが、(1)、(2)で明らかにしようとしていたレドックス・シグナリング経路に関わる可能性がある。この成果は論文にまとめ、投稿中である。

以上をまとめると、本研究期間中の成果として、レドックス感受性ダイニンサブユニットの基質同定はまだ進行中であるが、それらが機能するシグナリング経路を生体内で検定する系を立ち上げることができた。また、新奇の鞭毛運動調節機構を2つ(カルシウム制御とレドックス制御)見出すことができた。

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4件)

1. Wakabayashi, K. (2009)
Analysis of redox-sensitive dynein components
Methods in Cell Biology 92:153-161

2. Kawai, T., Abe, H., Wakabayashi, K., and Oka, Y. (2009)
Calcium oscillations in the olfactory non-sensory cells of the goldfish, *Carassius auratus*
Biochim Biophys Acta-General Subjects 1790:1681-8.

3. Wakabayashi, K.*, Ide, T., and Kamiya, R. (2009) (*: corresponding)
Calcium-dependent flagellar motility activation in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to mechanical agitation
Cell Motility and the Cytoskeleton 66:736-42

4. Tanner, C.A., Rompolas, P., Patel-King, R.S., Gorbatyuk, O., Wakabayashi, K., Pazour, G.J., and King, S.M. (2008)
Three Members of the LC8/Dynll1 Family Are Required for Outer Arm Dynein Motor Function
Molecular Biology of the Cell 19:3724-34

[学会発表] (計8件)

1. *井手隆広、神谷律、若林憲一
クラミドモナス鞭毛外腕ダイニン中間鎖の機能

第5回鞭毛・ダイニン機能研究会、東京、2010年3月

2. *井手隆広、神谷律、若林憲一

クラミドモナス鞭毛外腕ダイニン中間鎖の機能解析

日本動物学会関東支部第 62 回大会、つくば、2010 年 3 月

3. *若林憲一、大和幹人、臼倉治郎、神谷律

鞭毛ダイニン外腕ドッキング複合体の構造と機能

日本動物学会第 80 回大会、静岡、2009 年 9 月

4. *若林憲一、大和幹人、臼倉治郎、神谷律

鞭毛ダイニン外腕ドッキング複合体の構造と機能

「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回ワークショップ、葉山、2009 年 7 月

5. *若林憲一、井手隆広、神谷律

クラミドモナス鞭毛運動の機械刺激による活性化

生体運動研究合同班会議、東京、2009 年 1 月

6. *Mikito Owa, Stephen M. King, Ritsu Kamiya, and Ken-ichi Wakabayashi

Detection of proteins interacting with the outer dynein arm docking complex (ODA-DC) in *Chlamydomonas* flagella by chemical crosslinking

International workshop Dynein2009, Kobe, Japan, Nov. 2009

7. *Ken-ichi Wakabayashi, Mikito Owa, Jiro Usukura, and Ritsu Kamiya

Structural and biochemical properties of the

outer-dynein-arm docking complex (ODA-DC)

International workshop Dynein2009, Kobe, Japan, Nov. 2009

8. *Ken-ichi Wakabayashi, Akane Furuta, Jiro Usukura, Masahide Kikkawa, Fumio Arisaka, George B. Witman, and Ritsu Kamiya

Structural and biochemical properties of the outer-dynein-arm docking complex (ODA-DC) studied using recombinant proteins

The 13th International Chlamydomonas Conference, Hyères-les-Palmiers, France, May 2008

[図書] (計 0 件)
[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seiri/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林憲一 (Wakabayashi Ken-ichi)

東京大学 大学院理学系研究科

研究者番号：80420248

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：