

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15733

研究課題名（和文）生体内に近いダブルレット微小管の原子モデルの構築

研究課題名（英文）Generation of atomic model of more intact doublet microtubule structure

研究代表者

市川 宗厳 (Ichikawa, Muneyoshi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80844662

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）：繊毛は細胞の運動を駆動する細い毛のような構造である。繊毛内には9本のダブルレット微小管が存在しており、モータータンパク質である軸系ダイニンが周期的に結合している。軸系ダイニンのうち外腕ダイニンは繊毛の運動を引き起こす主要なモーターである。外腕ダイニンは多くのサブユニットから構成されている複合体であるが、ダブルレット微小管に結合した外腕ダイニンの構造の詳細はわかっていなかった。本研究では、クライオ電子顕微鏡法を用いてダブルレット微小管に結合した外腕ダイニン複合体のサブユニット構造を明らかにした。さらに繊毛に組み込まれる前の不活性化外腕ダイニンの構造と比較することで、その活性化機構も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛は、ヒトの体内のほぼ全ての細胞に存在しており、繊毛タンパク質の異常は、内蔵逆位や不妊などヒトにおける繊毛病の症状を引き起こすことも知られている。そのため、繊毛の運動機構の理解は重要な課題である。本研究において繊毛内の外腕ダイニンの立体構造及び活性化機構を解明できたことは、これらの繊毛病の病態の理解に重要な基盤となる。また、本研究において明らかになった外腕ダイニンの高分解能の構造は、今後、外腕ダイニンを改変し、新たなナノデバイスを開発することにも応用できるだろう。

研究成果の概要（英文）：Cilia are tiny hair-like structures that drive cell motility. There are nine doublet microtubules in cilia, and axonemal dynein, a motor protein, is periodically bound to these doublet microtubules. Among axonemal dynein, outer-arm dynein is the main motor that produces ciliary motion. Outer arm dynein is a complex composed of many subunits, but the details of the structure of outer arm dynein bound to doublet microtubules were to be elucidated. In this study, subunit structure of the outer-arm dynein complex bound to the doublet microtubule was obtained by cryo-electron microscopy. Furthermore, by comparing the structure of the outer arm dynein complex with that of the inactive outer arm dynein complex before its incorporation into the cilia, the activation mechanisms of outer arm dynein was revealed.

研究分野：生物物理

キーワード：ダイニン 繊毛 クライオ電子顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

繊毛・鞭毛は真核生物で広く保存された運動駆動装置である。繊毛・鞭毛はヒトの体内においても重要な機能を担っており、その構成タンパク質の異常はヒトにおいて、不妊から全身の臓器の異常に及ぶ病態の原因にもなる。繊毛・鞭毛の基本構造であるダブルレット微小管は、そのチューブリン格子の内側及び外側に多くのタンパク質が結合している。これまでのクライオ電子顕微鏡法を用いた研究によって、繊毛のダブルレット微小管のチューブリン格子構造が得られ、その内側に結合したタンパク質のうちいくつかは同定されてきた(Ichikawa et al., 2017, Nature Communications; Ichikawa et al., 2019, PNAS; Khalifa, Ichikawa et al., 2020, eLife)が、未だ同定されていない繊毛の微小管関連タンパク質が存在していた。また、ダブルレット微小管の外側には、軸系ダイニンなどのタンパク質複合体が結合している。軸系ダイニン、特に外腕ダイニンは、繊毛の運動を引き起こす主要なモータータンパク質であるが、ダブルレット微小管上の外腕ダイニンの立体構造は低分解能でしか得られていなかった。そのため、外腕ダイニンの活性化機構についても不明であった。

2. 研究の目的

以下のように研究を行うことで、外側のタンパク質複合体を保持した、より生体内の状態に近いダブルレット微小管を得て、新規繊毛微小管関連タンパク質を同定し、これらの微小管関連タンパク質の立体構造を高分解能で得る。さらに、ダブルレット微小管の外側に位置する外腕ダイニンの構造を高分解能で得て、その構築・活性化機構についての知見を得ることを目指した。

- (1) 繊毛からインタクトに近い状態のダブルレット微小管を単離する。
- (2) 新規繊毛微小管関連タンパク質を同定する。
- (3) 繊毛微小管関連タンパク質の高分解能の立体構造を得る。
- (4) ダブルレット微小管上の外腕ダイニンの立体構造の解析と、活性化機構の解明を行う。

3. 研究の方法

- (1) 繊毛からのダブルレット微小管の単離方法の改善を行う。
- (2) 質量分析によって、新規繊毛微小管関連タンパク質を同定する。
- (3) X線結晶構造解析によって繊毛の微小管関連タンパク質の構造解析を行う。
- (4) クライオ電子顕微鏡法によってダブルレット微小管上の外腕ダイニンの構造解析を行う。
さらに、分子動力学シミュレーションによる解析を行うことで、その活性化機構についての示唆を得る。

4. 研究成果

(1) 繊毛から生体内に近いよりインタクトな構造を保持したダブルレット微小管の精製を目指した(図1)。繊毛虫テトラヒメナの繊毛を単離し、界面活性剤(NP-40)で処理し、脱膜処理して軸系9+2構造を得た。さらに、ここにATPを加えることで外腕ダイニンを活性化し、一本一本のダブルレット微小管を単離した。以前の研究では、ダブルレット微小管のチューブリン格子及び、その内側に結合している微小管内タンパク質の構造に着目していたため、野生株の繊毛虫テトラヒメナの繊毛から単離したダブルレット微小管を、高塩濃度処理・低塩濃度バッファーに対する透析処理を行うことで、軸系ダイニンや、ラジアルスポークなどダブルレット微小管の外側に結合しているタンパク質複合体を取り除いていた(Ichikawa et al., 2017, Nature Communications; Ichikawa et al., 2019, PNAS; Khalifa, Ichikawa et al., 2020, eLife)が、これらの処理を行わず、外側のタンパク質構造を保持したダブルレット微小管を単離した(図1)。

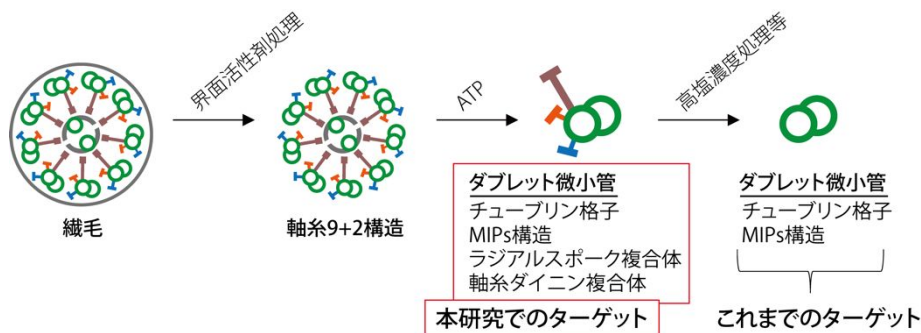


図1. ダブルレット微小管の単離方法の最適化

このようにして得られたダブルレット微小管を、氷包埋し、クライオ電子顕微鏡で観察したところ、

ダブルレット微小管から外腕ダイニンが脱落している様子が観察された。そこで、更にインタクトなダブルレット微小管の精製方法を探索した。その結果、チューブリンの40番目のリシンがアルギニンに変異している変異体テトラヒメナ株から単離した繊毛では、同様に処理した場合でも、ダブルレット微小管同士の滑り出しの効率が野生株ほど高くなく、完全にsplitしていないダブルレット微小管が得られた。これは、ダブルレット微小管の翻訳後修飾のレベルの違いによると考えられる。得られた完全にsplitしていないダブルレット微小管をクライオ電子顕微鏡法によって観察したところ、外腕ダイニンが保持されている様子が観察されたため、このように精製したダブルレット微小管を構造解析に用いることとした。また、質量分析に向けて、緑藻クラミドモナスの鞭毛からの微小管画分の精製方法の最適化についても行った。繊毛・鞭毛からのダブルレット微小管の精製方法については、共同責任著者として、プロトコル論文として期間中に報告した(引用)。

(2) クラミドモナス鞭毛から精製した微小管画分を質量分析した。鞭毛から単離した微小管画分には、ダブルレット微小管関連タンパク質及び中心対複合体関連タンパク質の両方が含まれるため、野生株の質量分析結果と、中心対複合体を持たないクラミドモナス変異株の質量分析の結果と比較することで、ダブルレット微小管由来のタンパク質と中心対複合体由来のタンパク質の切り分けを行った。これによって、ダブルレット微小管由来のタンパク質を同定することができた。質量分析による繊毛の新規タンパク質の同定の結果について、共同責任著者として、原著論文として期間中に報告した(引用)。

(3) 質量分析を用いて同定した繊毛関連タンパク質のうちいくつかのタンパク質について、精製し、結晶化についても試みた。このうち、PACRG について、その結合タンパク質 MEIG1 との共結晶が得られ、2.1 Å の分解能でその立体構造を決定することができた。全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)による蛍光観察による結果と合わせて、ダブルレット微小管関連タンパク質であるPACRG が、チューブリンをリクルートする機構について明らかにし、これらの内容を投稿論文として期間中に報告した(引用)。

(4) 項目(1)のようにテトラヒメナ繊毛から単離したダブルレット微小管を氷包埋し、クライオ電子顕微鏡法で構造解析してその立体構造を得た。外腕ダイニン複合体に注目して解析を行うことで、外腕ダイニンの立体構造を5.5-7 Å の分解能で得た。クライオ電子顕微鏡構造をもとに、外腕ダイニンのモデルを構築した(図 2)。これにより、ダブルレット微小管上での外腕ダイニンのサブユニット構造が明らかとなった。また、外腕ダイニンの尾部と、ダブルレット微小管上の docking complex との相互作用の詳細が明らかになった。得られたダブルレット微小管上の外腕ダイニンの立体構造を、近年報告された繊毛に組み込まれる前の制御タンパク質 Shulin と結合した不活性化状態の外腕ダイニンの立体構造(Mali, G. R. et al., 2021, Science)と比較することで、外腕ダイニンの活性化に伴う構造変化についても調べた。外腕ダイニンの尾部ドメイン・頭部ドメインのどちらも、構造変化が起きていることが明らかになった。外腕ダイニンの尾部ドメインで、構造変化が起きている領域は、docking complex と相互作用している領域と一致していた。そこで、外腕ダイニンの活性化機構の詳細を調べるため、分子動力学シミュレーションによる解析を行った。制御タンパク質 Shulin と結合した不活性化状態の外腕ダイニンに、ダブルレット微小管との結合を模倣して力をかけた場合、Shulin が解離していく様子が観察された。これらの結果から、不活性化状態の外腕ダイニンが、ダブルレット微小管上の docking complex と結合し、尾部ドメインの構造変化が誘起されることで、制御タンパク質 Shulin が解離し、さらに頭部ドメインへと構造変化が伝播していくという活性化機構のモデルを提唱することができた。これらの内容について共同責任著者として、原著論文として期間中に報告した(引用)。また、外腕ダイニンに関する和文総説論文についても期間中に執筆し、発表した(引用)。

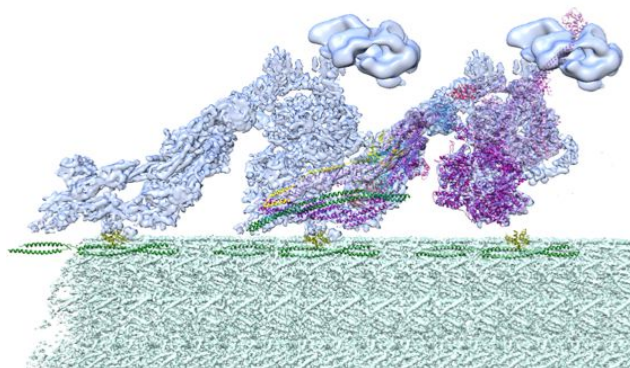


図 2. ダブルレット微小管上の外腕ダイニンのクライオ電子顕微鏡構造及びモデル構造

< 引用文献 >

Black, C., Dai, D., Peri, K., Ichikawa, M., Bui, K. H., Preparation of Doublet Microtubule Fraction for Single Particle Cryo-electron Microscopy, *Bio-protocol*, 11, 2021, e4041

Dai, D., Ichikawa, M., Peri, K., Rebinsky, R., Bui, K. H., Identification and mapping of central pair proteins by proteomic analysis, *Biophysics and Physicobiology*, 17, 2020, 71-85

Khan, N., Pelletier, D., McAlear, T. S., Croteau, N., Veyron, S., Bayne, A. N., Black, C., Ichikawa, M., Khalifa, A. A. Z., Chaaban, S., Kurinov, I., Brouhard, G., Bechstedt, S., Bui, K. H., Trempe, J. F., Crystal structure of human PACRG in complex with MEIG1 reveals roles in axoneme formation and tubulin binding, *Structure*, 29, 2021, 572-586

Kubo, S., Yang, S. K., Black, C. S., Dai, D., Valente-Paterno, M., Gaetrig, J., Ichikawa, M., Bui, K. H., Remodeling and activation mechanisms of outer arm dyneins revealed by cryo EM, *EMBO reports*, 22, 2021, e52911

八木 俊樹, 戸田 暁之, 市川 宗蔵, 栗栖 源嗣, 絨毛ダイニン軽鎖と重鎖微小管結合部位の複合体構造 見えてきた軽鎖 LC1 の役割 , *生物物理*, 61, 2020, 020-022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Daniel Dai, Muneyoshi Ichikawa, Katya Peri, Reid Rebinsky, Khanh Huy Bui | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Identification and mapping of central pair proteins by proteomic analysis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology | 6. 最初と最後の頁 71 ~ 85 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bsj-2019048 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Nimra Khan, Dylan Pelletier, Thomas S. McAlear, Nathalie Croteau, Simon Veyron, Andrew N. Bayne, Corbin Black, Muneyoshi Ichikawa, Ahmad Abdelzاهر Zaki Khalifa, Sami Chaaban, Igor Kurinov, Gary Brouhard, Susanne Bechstedt, Khanh Huy Bui, Jean-Francois Trempe | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Crystal structure of human PACRG in complex with MEIG1 reveals roles in axoneme formation and tubulin binding | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Structure | 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) 10.1016/j.str.2021.01.001 | 査読の有無 有 |
| 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 該当する |
| 1. 著者名 八木 俊樹、戸田 暁之、市川 宗庵、栗栖 源嗣 | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 繊毛ダイニン軽鎖と重鎖微小管結合部位の 複合体構造 見えてきた軽鎖LC1の役割 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 生物物理 | 6. 最初と最後の頁 020 ~ 022 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Black Corbin, Dai Daniel, Bui Khanh, Ichikawa Muneyoshi, Peri Katya | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Preparation of Doublet Microtubule Fraction for Single Particle Cryo-electron Microscopy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL | 6. 最初と最後の頁 e4041 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/bioprotoc.4041 | 査読の有無 有 |
| 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 Kubo Shintaroh, Yang Shun Kai, Black Corbin S, Dai Daniel, Valente-Paterno Melissa, Gaertig Jacek, Ichikawa Muneyoshi, Bui Khanh Huy | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Remodeling and activation mechanisms of outer arm dyneins revealed by cryo EM | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 EMBO reports | 6. 最初と最後の頁 e52911 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202152911 | 査読の有無 有 |
| 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9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kubo Shintaroh, Yang Shun Kai, Black Corbin S, Dai Daniel, Valente-Paterno Melissa, Gaertig Jacek, Ichikawa Muneyoshi, Bui Khanh Huy |
| 2. 発表標題 クライオ電顕で明らかになった外腕ダイニンの構造変化と活性化機構 |
| 3. 学会等名 第59会生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kubo Shintaroh, Yang Shun Kai, Black Corbin S, Dai Daniel, Valente-Paterno Melissa, Gaertig Jacek, Ichikawa Muneyoshi, Bui Khanh Huy |
| 2. 発表標題 Remodeling and activation mechanisms of the outer arm dynein complex. |
| 3. 学会等名 Dynein 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shintaroh Kubo, Ahmad Khalifa, Muneyoshi Ichikawa, Daniel Dai, Corbin Black, Katya Peri, Shun Kai Yang, Jaiver Vargas, Khanh-Huy Bui |
| 2. 発表標題 How Rib43a and Acetylation of K40 control the rigidity of Microtubules |
| 3. 学会等名 65th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Muneyoshi Ichikawa |
| 2. 発表標題 Remodeling and activation mechanisms of outer arm dynein revealed by cryo-EM |
| 3. 学会等名 18th BSCB GenSoc UK Cilia Network e-symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shintaroh Kubo, Ahmad Khalifa, Muneyoshi Ichikawa, Daniel Dai, Corbin Black, Katya Peri, Shun Kai Yang, Jaiver Vargas, Khanh-Huy Bui |
| 2. 発表標題 How Rib43a and Acetylation of K40 control the rigidity of Microtubules |
| 3. 学会等名 EMBO WORKSHOP (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 市川宗蔵 |
| 2. 発表標題 ダブルレット微小管上での外腕ダイニンの高分解能構造 |
| 3. 学会等名 第10回分子モーター討論会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Muneyoshi Ichikawa, Ahmad Khalifa, Daniel Dai, Shintaroh Kubo, Corbin Black, Katya Peri, Thomas McAlear, Simon Veyron, Shun Kai Yang, Javier Vargas, Susanne Bechstedt, Jean-Francois Trempe, Khanh Huy Bui |
| 2. 発表標題 Cryo-EM revealed unique and diverse binding schemes of the microtubule inner proteins at the inner junction region of cilia |
| 3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshitoki Shibao, Corbin Black, Muneyoshi Ichikawa, Junya Kirima, Kazuhiro Oiwa, Khanh Huy Bui, Tomoya Tsukazaki |
| 2. 発表標題 Characterization of properties of microtubule inner protein FAP85. |
| 3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Muneyoshi Ichikawa, Ahmad Khalifa, Daniel Dai, Shintaroh Kubo, Corbin Black, Katya Peri, Thomas McAlear, Simon Veyron, Shun Kai Yang, Javier Vargas, Susanne Bechstedt, Jean-Francois Trempe, Khanh Huy Bui |
| 2. 発表標題 クライオ電顕によるダブルレット微小管の近原子分解能構造 |
| 3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会 日本 - カナダ 二国間交流シンポジウム (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020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 | | |
|---------|----------|--|--|
| カナダ | McGill大学 | | |