

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21378

研究課題名(和文)クラミドモナスのゲノム編集の活用による細胞質ダイニン2の繊毛内輸送の再構成

研究課題名(英文)In vitro reconstitution of intraflagellar transport by cytoplasmic dynein-2

研究代表者

丹羽 伸介(Niwa, Shinsuke)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授

研究者番号：30714985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：逆行性の繊毛内輸送(IFT)の異常は繊毛病と呼ばれる疾患の原因となる。この逆行性の繊毛内輸送(IFT)を担う分子モータータンパク質である細胞質ダイニン2の活性化メカニズムを解明するために、遺伝子組換えによって作製したクラミドモナスから赤色蛍光タンパク質mCherryでラベルした細胞質ダイニン2の複合体を精製した。精製した細胞質ダイニン2は自己阻害と呼ばれるメカニズムにより不活性状態のままであった。ダイニン2を活性化する因子の有力候補である繊毛内輸送(IFT)複合体と呼ばれる複合体の精製についても微量ではあるが成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

逆行性の繊毛内輸送(IFT)の分子モータータンパク質であるダイニン2複合体の活性化をin vitroで再構成することは世界中で誰も成功していない学術的に重要な問題である。この問題に取り組むために本研究ではクラミドモナスからダイニン2複合体の精製を行った。本研究で精製に成功した組換えダイニン2複合体は今後1分子計測の手法によってダイニン2複合体の活性化メカニズムを解析するための基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Defects in retrograde intraflagellar transport(IFT) induces a series of diseases called ciliopathy. To understand the mechanism of ciliopathies, it is important to reconstitute intraflagellar transport in vitro. We purified recombinant cytoplasmic dynein 2 from *Chlamydomonas*. Recombinant dynein 2 was inactive because of autoinhibitory mechanisms as anticipated. To unlock the autoinhibition in vitro, we purified IFT complex from *Chlamydomonas* as well.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ダイニン

1. 研究開始当初の背景

(1) 分子モータータンパク質がさまざまな生命機能を担う

分子モータータンパク質は細胞内輸送や細胞分裂を担っている。様々な種類の分子モータータンパク質が同定されている。細胞内の適切な場所で適切なタイミングで分子モータータンパク質が働くためにはその活性が厳密に調節されることが必要となる。

(2) 分子モータータンパク質の機能の理解のためには *in vitro* での再構成が必要となる

分子モータータンパク質がどのように活性化するかを理解するためには、細胞内での機能解析だけでなく *in vitro* でその活性化を再構成することが必須となる。逆行性の細胞内輸送（細胞の周辺部から細胞の中心に向かう細胞内輸送）や細胞分裂を担う重要なモータータンパク質であるダイニン 1 の場合は、ダイニン複合体にダイナクチン複合体が結合し、さらにそこに BICD2 のようなアダプタータンパク質が結合することが必要であることが知られている。これは精製したダイニン 1 複合体、精製したダイナクチン複合体、精製した BICD2 をすべてまぜて *in vitro* でダイニン 1 の運動を観察することで初めて明らかにされた。

(3) ダイニン 2 の活性化の *in vitro* 再構成は成功していない

大腸菌や昆虫細胞を用いることでこれまでにいくつかの分子モータータンパク質が精製され、その活性化が *in vitro* で再構成されてきた。

活性化の再構成が成功しているものはミトコンドリアなどの輸送を担うキネシン 1(KIF5-KLC 複合体)、逆行性の細胞内輸送を担う細胞質ダイニン 1、繊毛内輸送を担う OSM-3(KIF17) があげられる。一方で細胞内輸送を担う分子モータータンパク質のうちで活性化の再構成に成功していないものは、軸索輸送を担う分子モータータンパク質 KIF1A と繊毛内で逆行性の繊毛内輸送(IFT)を担う細胞質ダイニン 2 があげられる。

KIF1A の活性化の *in vitro* 再構成は別の課題で私たちが取り組んでいるところである。細胞質ダイニン 2 の場合は細胞質ダイニン 1 と同じく昆虫細胞を用いてリコンビナントタンパク質として精製することには国内外の研究者が成功している。精製したダイニン 2 複合体は微小管上を動く活性を持たないため、自己阻害状態となっている。*in vitro* 再構成が成功している他の分子モータータンパク質と同様にカーゴとなる分子を混ぜれば活性化するであろうと多くの研究者は考えている。しかし、カーゴとなる繊毛内輸送複合体(IFT 複合体) もまた巨大複合体であり、リコンビナントタンパク質として発現することが著しく困難であることが障害となり、未だに誰も成功していない。

2. 研究の目的

(1) ゲノム編集を用いて蛍光ラベルを含むダイニン 2 複合体および IFT 複合体を精製する

多くの研究者が再構成のために昆虫細胞の発現系を用いてリコンビナントタンパク質として分子モータータンパク質を精製してきたのは、FLAG タグや His タグ、StrepII タグといったアフィニティー精製のためのタグや、分子モータータンパク質の運動を観察するための蛍光タグ (GFP タグや SNAP タグ) を導入するためである。この手法ではダイニン 2 複合体や IFT 複合体を精製することは困難である。ダイニン 2 複合体や IFT 複合体はもともとクラミドモナスと呼ばれる単細胞生物から単離された歴史的経緯がある。クラミドモナスでもゲノム編集が可能になったことを利用し、アフィニティータグと蛍光タグを導入したダイニン 2 複合体および IFT 複合体をクラミドモナスから単離、精製する。

(2) 精製した複合体を用いた *in vitro* 再構成を試みる

これまでの分子モーターの *in vitro* 再構成と同様に精製した蛍光ラベル付きのダイニン 2 複合体と IFT 複合体を混ぜることで *in vitro* で不活性型のダイニン 2 複合体が活性型に変換されるかどうかを解析する。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集を利用して蛍光ラベルを含むダイニン 2 複合体および IFT 複合体を精製する

ダイニン 2 複合体や IFT 複合体の構成因子の変異体はクラミドモナスで多数同定されている。しかし、そのほとんどが null 変異体ではなく点変異体であるため外来的に蛍光タンパク質::精製タグ::ダイニンサブユニットのようなタンパク質を発現してレスキューした場合、点変異体と外来タンパクの複合体になってしまう可能性がある。そこで CRISPR/cas9 で作製したダイニンサブユニット D1bLIC の完全 null 変異体に外来的に D1bLIC::mCherry::精製用タグを発現してレスキューした株を作製し、精製タグを利用することで蛍光タンパク質付きのダイニン 2 複合体を精製した。精製には Streptavidin-agarose ビーズを用いて、HRV3C とよばれる酵素でタグを切り離すことで溶出を行った。繊毛内輸送 (IFT) 複合体についてもダイニン 2 複合体と同

じ手法を用いて蛍光タンパク質付きの IFT 複合体をもつ変異株から精製した。IFT20 とよばれる繊毛内輸送 (IFT) サブユニットを GFP ラベルしたものを IFT20 の null 変異体に発現しレスキューした。この株を大量培養してアフィニータグを用いて IFT 複合体の精製を試みた。

(2) 精製した複合体を用いた *in vitro* 再構成

精製したダイニン 2 複合体を全反射蛍光顕微鏡法 (TIRF) を用いて観察した。Alexa647 と biotin によってラベルしたチューブリンをラベルしていないチューブリンと混ぜて重合させることで得られる微小管をレールとして用いた。PLL-PEG-biotin でコーティングすることで非特異的なタンパク質の吸着を抑えた観察チャンバーを準備し、avidin を間にサンドイッチする形で微小管を結合させた。ここに希釈したモータータンパク質や IFT を加えて 1mM の ATP 存在下で観察を行った。

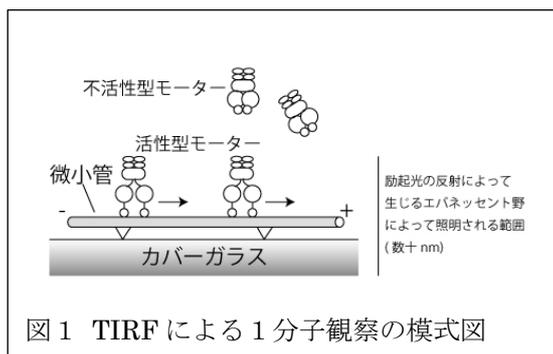


図1 TIRFによる1分子観察の模式図

4. 研究成果

(1) 蛍光ラベルしたダイニン 2 の精製

クラミドモナスから D1bLIC-mCherry サブユニットを蛍光ラベルしたダイニン 2 複合体を精製することに成功した。条件検討の結果、精製の際には 0.6M NaCl で wash するとよいことがわかった。SDS-PAGE 法によって解析を行った結果、図 1 のように D1bLIC のサイズのバンドに加えて、重鎖 (250kDa より上のバンド) などに相当するバンドも得られているため、複合体を精製することに成功したと考えられる。収量が多くはないが 1 分子レベルの実験 (数 pM ~ 数 nM の濃度) には十分である。ただし、収量が多い方が実験には使いやすいため、D1bLIC のラベルの位置を変えるなどの条件検討を引き続き実施している。

(2) 蛍光ラベルした IFT 複合体の精製

IFT 複合体の場合は、IFT20 サブユニットの null 変異体から GFP::IFT20 を精製してウエスタンブロットによって検出を行った。ウエスタンブロットでは GFP::IFT20 のバンドが検出されると共に、複合体の別のサブユニットである IFT57 もまた共精製されていた (図 3 左の二つのパネル)。SDS-PAGE によって分離した複合体を銀染色によって可視化すると、収量が非常に少なく、複合体が十分量精製できていないことがわかった (図 3 の一番右。非特異的なバンドと精製に用いたプロテアーゼのバンドのみが検出されている)。IFT 複合体を十分量精製するためにはラベルを入れるサブユニットを変える、ラベルの位置を変えるなどの工夫が必要であると考えられた。

(3) *in vitro* 再構成

TIRF によって精製したダイニン 2 複合体の運動を観察した。数 nM 程度に希釈したクラミドモナスダイニン 2 複合体を全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) によって観察したところ、微小管の上にダイニン 2 複合体が結合する様子が観察された。タイムラプス法によって観察すると、微小管上のダイニン 2 は 1 次元のブラウン運動をするものの、1 方向への連続した歩行 (processive な運動と呼ばれる) は観察されなかった。これは、IFT 複合体のようなカーゴが存在していないため、ダイニンが自己阻害状態になっているためであると考えられた。

(1) IFT 複合体の精製条件をさらに検討する

(2) sf9 細胞を用いて IFT 複合体を再構成することによって十分量得るといふ二つの方向の研究を試みる予定である。

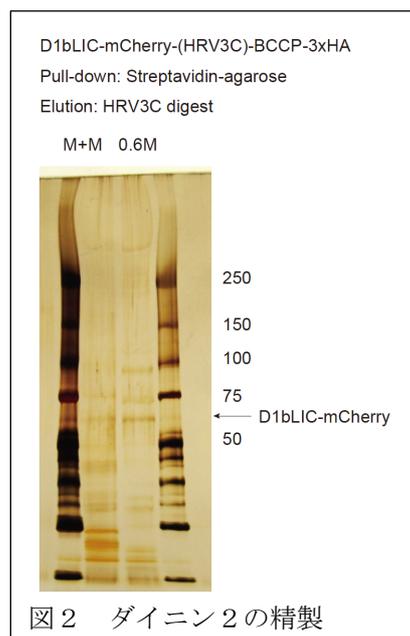


図2 ダイニン 2 の精製

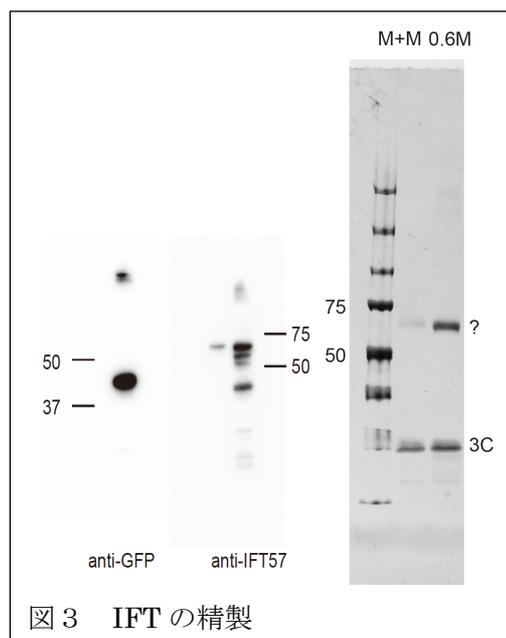


図3 IFT の精製

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小田 賢幸 (Oda Toshiyuki) (20569090)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

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