

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22570157

研究課題名（和文） 繊毛の根元に局在する新規ダイニンの構造と機能の解析

研究課題名（英文） Structural and functional analysis of novel dyneins localized to the ciliary proximal region

研究代表者 八木 俊樹 (YAGI TOSHIKI)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40292833

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、繊毛内での存在量が少ないマイナーダイニンの構造と機能を解析した。まず、これまで見つかった3種類のマイナーダイニンのうちの1つが他のダイニンに比べて微小管に強く結合することを見出した。また、クライオトモグラフィ法を用いて軸糸内の各種ダイニンの構造を比較し、繊毛根元にこれら3種類のマイナーダイニンに相当すると考えられる構造を新たに見出した。一方、クラミドモナスのゲノムに存在するダイニンのうち唯一未同定として残されていた最後のダイニンを見出し、全ての生物を通じて初めて、ゲノムに存在する全ダイニンを同定することに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

We analyzed the structure and function of minor-type dyneins whose axonemal contents are lower than other major-type dyneins. Here we found that one of three minor dyneins more strongly bind to microtubules than most of Chlamydomonas dyneins in the absence of ATP. In addition, using cryoelectron tomography and subtomogram averaging, we found that each minor dynein locates to the ciliary proximal region in place of a specific major dynein. Furthermore, we found that a novel gigantic dynein, which has been the last dynein heavy chain remained to be identified in Chlamydomonas, localizes to the proximal region of one of nine doublet microtubules. This is the first report that all the gene products of dynein heavy chain have been identified in the single organism.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： 鞭毛・繊毛、 ダイニン、 微小管、 ATP

## 1. 研究開始当初の背景

鞭毛・繊毛運動の基礎は、モーター蛋白質ダイニンによる微小管の滑り運動である。そのことは確定しているが、滑りが規則正しい波動運動に変換される機構はよくわかっていない。鞭毛・繊毛には性質が異なる多種類のダイニンが存在することが分かっていたが、私たちは、ごく最近、存在量が少ないマイナーなダイニン重鎖を3種類、新たに繊毛内に見出した。興味深いことに、このダイニンのうち少なくとも1つは全長 12  $\mu\text{m}$  の繊毛の根元 2  $\mu\text{m}$  に局在していた。一方、既知のメジャーダイニンの中には、このダイニンとは排他的な局在を示すものも見つかった。鞭毛・繊毛の根元には、屈曲を伝播するダイニンとは性質が異なる特殊なダイニンが存在するという説が提出されていたが、新たに見つかったマイナーダイニンはそのような重要なダイニンである可能性が高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、マイナーダイニンとメジャーダイニンの構造と機能を比較し、繊毛運動におけるそれぞれの機能の違いを明らかにする実験を計画した。具体的な内容は次の通りである。

### 1) マイナーダイニンのもつ性質を *in vitro* の実験で明らかにする。

繊毛根元にあるダイニンは長い繊毛を曲げる必要があるため、根元以外にあるダイニンに比べてより大きな力を出す必要があると考えられる。そのような性質がマイナーダイニンにあるかを調べる。

### 2) マイナーダイニンとメジャーダイニンの構造の違いを電子顕微鏡で調べる。

マイナーダイニンの特定のドメイン間には特徴的な挿入配列がある。この挿入配列がそれぞれのダイニンに固有の（たとえば、微小管との結合性を高めるなどの）性質を付加している可能性が考えられる。そこで、それぞれのダイニンの構造を電子顕微鏡により比較し、その挿入配列のもつ役割を調べる。

### 3) マイナーダイニン欠失変異株の運動性から、繊毛運動におけるそのダイニンの役割を明らかにする。

繊毛運動におけるマイナーダイニンの役割を明らかにするために、緑藻クラミドモナスにおいて、RNAi の手法で特定のマイナーダイニンの発現量を減らした変異株を作成する。得られた変異株の運動性から、それぞれのダイニンの *in vivo* の機能を推定する。

## 3. 研究の方法

### ダイニンの精製

メジャーダイニンは、軸糸（鞭毛・繊毛から膜をはずしたもの）から高塩濃度で抽出した粗ダイニンを陰イオン交換カラムにかけて精製した。一方、マイナーダイニンは、ピーク分画がメジャーダイニンと重なり、カラムだけでは精製できなかった。そこで、1) 特異的抗体により、各ダイニンをガラスに精製と同時に固定する方法、2) ビオチン化ダイニンをアビジン・ビオチンの特異的な結合を利用して精製・固定する方法、の2つの精製法を試みた。1) ではガラスに固定した特異的抗体により、軸糸粗抽出物から特定のダイニンを精製・固定した。2) では、多くの鞭毛ダイニンが共通して持つサブユニット、p28、が細胞内でビオチン化されるように改変し、ビオチン化 p28 をもつダイニン粗抽出物をイオン交換カラムにより精製し、さらにその後、ストレプトアビジンを介して特定のダイニンをスライドガラスに精製・固定した。ATP の存在下にそれぞれのダイニンと相互作用する微小管の運動を観察した。

### ダイニンの構造解析

各種ダイニンの構造解析は、クライオ電子顕微鏡トモグラフィ法を用いて行った。9本ある軸糸微小管をそれぞれ別々に平均化し、異なる軸糸微小管間でその上に存在するダイニンの構造の違いがあるかを比較した。また、軸糸先端と根元でダイニンの構造の違いがあるかも検討した。繊毛は、既存の軸糸構造の先にタンパク質が付加されることで伸長する。従って、短い鞭毛を観察すれば、繊毛根元の短い領域にあるダイニンを高い確率で観察することが可能である。長い繊毛と伸長中の短い繊毛それぞれにおいてダイニンの構造解析を行い、比較した。

### ダイニン重鎖欠損株の作出

特定のダイニンの発現量を抑制するために、クラミドモナス細胞の RNAi 実験を行った。それぞれのダイニン重鎖をコードする遺伝子のごく短い領域（27 bp）とそれに相補的な配列を短いループでつなぐような配列をクラミドモナス細胞で発現させた。それぞれの遺伝子配列を薬剤耐性遺伝子とともに、鞭毛ダイニン軽鎖タンパク質 LC8 のプロモーターの下流に挿入した。このプラスミドを電気穿孔法によりクラミドモナス細胞に導入し、薬剤耐性を獲得した細胞の運動性を調べて目的のダイニンの発現が抑制された株の取得を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) マイナーダイニンの精製方法の確立と  
マイナーダイニンのもつ性質の解析

##### ①抗体およびアビジン・ビオチンによるマイ ナーダイニンの精製

どちらの方法でも機能的なマイナーダイ  
ニンの精製には成功しなかった。

抗体によるマイナーダイニンの精製では、  
それぞれの抗体を Protein A を介してガラ  
スに固定することで、抗体を介してダイニ  
ンをガラスに精製・固定した。微小管の in  
vitro motility assay 実験を行ったところ、  
ダイニンは微小管と弱くしか結合せず、この  
方法ではダイニンの微小管結合性が阻害さ  
れることが示唆された。

ビオチン化 p28 を用いる方法では、上記  
の方法によりビオチン化 p28 を発現するクラ  
ミドモナスを作出し、その鞭毛からダイニン  
を抽出・精製し、ストレプトアビジン固定化  
スライドガラス上にそのダイニンを特異的  
に固定した。微小管の in vitro motility  
assay 実験を行ったところ、微小管がほとん  
どガラスに結合しないことがわかった。ビオ  
チン化 p28 の発現量がきわめて少なく、スラ  
イドガラスに固定できたマイナーダイ  
ニン量が少なすぎることを判明した。

##### ②微小管結合によるマイナーダイニンの精 製

以上のように①の方法では、マイナーダイ  
ニンのモーター活性調査はうまくいかなか  
ったが、一方、この研究の途中で、各マイ  
ナーダイニンと微小管との結合性を調べた  
ところ、3種類のマイナーダイニンのうち1種  
類が、ATP 非存在下に他のダイニンに比べて  
微小管と強く結合することがわかった。現在、  
微小管への結合を利用したこのダイニンの  
精製法の確立を試みている。

##### (2) 電子顕微鏡によるマイナーダイニンの 構造解析

精製したマイナーダイニンとメジャーダ  
イニンの構造の違いを電子顕微鏡を用いて  
調べる実験を計画していたが、上述のように  
マイナーダイニンの精製ができず、この実験  
そのものはできなかった。

そこで、クライオ電子顕微鏡トモグラフィ  
ー法を用いて、軸系微小管の上に並ぶダイ  
ニンを同定・分類する研究を行った。光学顕  
微鏡による蛍光抗体法の実験結果と照らし合  
わせた結果、鞭毛根元にはこれまで分かっ  
ていたメジャーダイニンとは異なる3種類  
のダイニン様の構造があり、生化学的に同  
定したマイナーダイニンの数と一致するこ  
とがわかった。一方、9本の軸系微小管を個別に

平均化して、それぞれの微小管に存在する  
ダイニンを観察したところ、特定の1本の軸  
系微小管の根元にだけ他のダイニンよりも  
さらに大きなダイニン様構造が存在するこ  
とがわかった。

##### (3) 新規マイナーダイニンの発見

これまでに、クラミドモナスのゲノムに存  
在する16種類のダイニン重鎖遺伝子のう  
ち、15種類の重鎖が同定されていた。未同  
定として残された最後の重鎖を同定するた  
めに、このダイニンの予測配列から特異的  
な抗体を作成し、抗体を用いたウェスタン  
解析、局在解析を行った。その結果、この  
未知ダイニンが鞭毛の特定の微小管にのみ  
存在する新規のマイナーダイニンであるこ  
とが明らかとなった。

##### (4) RNAi による、マイナーダイニン量 を抑制したクラミドモナス細胞の作出と、 その運動性解析による各ダイニン in vivo の機能の推定

RNAi により各ダイニンの発現抑制株の作  
成を試みたが、ターゲットとしたダイニン  
の発現量が減る株は得られなかった。しか  
し、この実験の途中で得られたゲノム DNA  
破壊株の中から、(3) で同定した新規マイ  
ナーダイニンの欠損株が得られ、高粘度溶  
液中で野生株に比べて遊泳速度が遅くなる  
性質を持つことがわかった。この結果は、  
このダイニンが高粘度下の運動で重要な  
役割を果たしていることを示唆している。

以上のように、当初計画した解析が予定  
通りできなかったが、これらの実験の過程  
で、1) マイナーダイニンの1つが、ATP 非  
存在下に他のダイニンに比べて相対的に  
微小管と強く結合する性質を持つこと、  
2) クライオ電子顕微鏡トモグラフィー  
により、9本の軸系微小管を区別しながら  
繊毛根元の構造を観察することに成功し  
(スイス連邦工科大学・石川尚博士と共  
同研究)、鞭毛根元にマイナーダイニン  
と考えられる構造を初めて確認したこと、  
3) クラミドモナスのゲノムに存在する  
ことが分かっていたが未発見であった  
ダイニン重鎖を見出すこと、4) DNA  
破壊株ライブラリーの中から、この新  
規ダイニン重鎖の欠損株を見出すこと、  
に成功した。今後、この株を使った新  
規ダイニンの機能解析が進み、また、  
同様の方法により他のマイナーダイ  
ニンの欠損株の単離できることを  
期待している。

#### 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 6 件)

1. Oda T, Yagi T., H. Yanagisawa, Kikkawa M. Identification of the outer-inner dynein linker as a hub controller for axonemal dynein activities. *Curr. Biol.* 23, 1-9, 2013. doi: 10.1016/j.cub.2013.03.028. (査読有)
2. Yamamoto R, Song K, Yanagisawa H, Fox L, Yagi T., Wirschell M, Hirono M, Kamiya R, Nicastro D., Sale WS. The MIA complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility. *J Cell Biol.* 201, 263-278, 2013. doi: 10.1083/jcb.201211048. (査読有)
3. Kubo T, Yagi T., Kamiya R. Tubulin polyglutamylation regulates flagellar motility by controlling a specific inner-arm dynein that interacts with the dynein regulatory complex. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 69, 1059-68, 2012. doi: 10.1002/cm.21075. (査読有)
4. Bui KH, Yagi T., Yamamoto R, Kamiya R, Ishikawa T. Molecular architecture of the whole *Chlamydomonas* axoneme reveals high degrees of polarity and asymmetry in the arrangements of dynein and related structures. *J Cell Biol.* 198, 913-25, 2012. doi/10.1083/jcb.201201120. (査読有)
5. Mitchison HM, Schmidts M, et al. (著者 15名中11番目) Cilia dysmotility and left-right axis defects due to mutations in axonemal dynein assembly factor PF22 (DNAAF3) in primary ciliary dyskinesia. *Nature Genetics* 44, 381-9 2012. doi: 10.1038/ng.1106. (査読有)
6. Hom EFY, Witman GB, Harris EH, Dutcher SK, Kamiya R., Mitchell DR, Pazour GJ, Porter ME, Sale WS, Wirschell M., Yagi T., King SM. A unified taxonomy for ciliary dyneins. *Cytoskeleton* 68, 555-65, 2011. doi: 10.1002/cm.20533. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 八木俊樹、西山雅祥 高圧負荷

によって誘導されるクラミドモナス非運動性変異株鞭毛の屈曲運動. 2013 年生体運動合同班会議. 2013 年 1 月 12 日~1 月 14 日 広島大学、広島県

2. Toshiki Yagi, Masayoshi Nishiyama. Resurrection of flagellar bending movements in *chlamydomonas* paralyzed mutants at high pressure. 日本生物物理学会第 50 回大会. 2012 年 9 月 22 日~2012 年 9 月 24 日 名古屋大学、愛知県

3. Toshiki Yagi, Toshie Takahashi, Hiroshi Kubota, Masahide Kikkawa. Protein complex required for the formation of microtubule square lattice in green tree frog sperm. 日本細胞生物学会第 64 回大会 2012 年 5 月 28 日~2012 年 5 月 30 日. 神戸国際会館、兵庫県.

4. Toshiki Yagi, Hiroshi Kubota, Masahide Kikkawa. A novel protein complex required for the formation of microtubule square lattice in green tree frog sperm. 日本解剖学会第 117 回大会. 2012 年 3 月 26 日~2012 年 3 月 29 日 山梨大学、山梨県.

5. Toshiki Yagi, Hiroshi Kubota, Masahide Kikkawa. A novel protein complex required for the formation of microtubule square lattice in green tree frog sperm. 日本生物物理学会第 49 回大会. 2011 年 9 月 16 日~2011 年 9 月 18 日 兵庫県立大学、兵庫県.

[図書] (計 1 件)

1. Yagi T. and Kamiya R. Genetic approaches to axonemal dynein function in *Chlamydomonas* and other organisms. "Dyneins" (King SM, editor) Chapter 9. Elsevier, Amsterdam. pp.273-295. 2012. (分担執筆)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
八木 俊樹 (YAGI TOSHIKI)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 40292833