

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31日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770189

研究課題名（和文） 細胞運動を調節するレドックス・センシングとシグナリングの分子機構

研究課題名（英文） Molecular basis of redox signaling that regulates cell motility

研究代表者

若林 憲一（WAKABAYASHI KENICHI）

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：80420248

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、鞭毛運動や光合成のモデル生物である単細胞緑藻クラミドモナスを用いて、細胞内のレドックス状態の変化がどのような機序でセンスされ、細胞行動に反映されるのかを探ることである。以前我々は、クラミドモナスが示す走光性の正と負（光源に向かうか、逃げるか）が、細胞内レドックス状態の変化によって入れ替わることを示した。しかし、その調節メカニズムの分子機構は謎に包まれていた。我々は、(1)細胞内の何がレドックス状態を変えるのか (2)細胞はどのようにしてその変化を感受し、鞭毛へとシグナルを送るのか (3)鞭毛に送られたシグナルはダイニンにどのような働きかけをするのか という3つの質問に答える形で、その分子機構を明らかにすることを試みた。その結果、(1)ステート遷移に付随した光合成電子伝達様式の変化が、走光性の符号と相関を示した。(2)レドックス感受性異常による走光性異常株3種の原因遺伝子解析を行い、うち1種は色素の生合成経路の酵素の点変異であることがわかった。別の1種については、候補遺伝子を4つまで絞ることができた。(3)基質タンパク質を補足する変異を導入したダイニンサブユニット型チオレドキシンをクラミドモナスに発現させ、実際に生体内で複数のタンパク質が生体内で補足されていることを確認した。研究期間中にクラミドモナスが光感受をしてから遊泳方向転換するまでのステップをすべてつなげることはできなかったが、その過程で重要なステップにかかわる分子機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we have studied how phototaxis of *Chlamydomonas* is redox-regulated. To clarify the molecular basis of this regulatory pathway, we took three strategies as follows: 1) estimation of relationship between state transitions and phototactic signs; 2) identification of responsible genes of three mutants that have defects in redox sensitivity and phototaxis; and 3) identification of proteins that react with thioredoxins that function as dynein subunits. Results are 1) positively phototactic cells are in state 1, whereas negatively phototactic cells are in state 2; 2) one of the mutants has defects in a biosynthesis pathway of a kind of pigment; and 3) proteins were captured by mutagenized thioredoxins in vivo, although identification of those proteins have not been finished. By further analyses of these results, the molecular mechanism of the regulatory pathway from photoreception to phototaxis will be clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000

年度			0
年度			0
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動

1. 研究開始当初の背景

真核生物の鞭毛・繊毛は細胞から生えた毛状の器官であり、進化的によく保存された“9+2”と呼ばれる内部構造を持つ。微小管上に規則的に並んだモータータンパク質ダイニンが隣接する微小管との間に力を発生し、これが鞭毛・繊毛の波打ち運動の原動力となる。最近では、鞭毛・繊毛が単なる運動装置ではなく、機械/化学刺激受容など、さまざまな生体反応において重要な働きをしていることが明らかになっている。

鞭毛・繊毛研究で分野をリードするモデル生物であるクラミドモナスを用いた研究から、我々は、光環境の変化に応じて鞭毛打頻度や波形変換様式が変化すること、またその現象が酸化・還元薬剤で模倣できることなどを明らかにした。(Wakabayashi and King (2006) J Cell Biol 173:743-54)。さらに研究を進めた結果、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という予備的な結果を得た。すなわち、細胞内が酸化的環境になると正、還元的環境になると負の走光性を示すのである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鞭毛運動や走光性がどのようにしてレドックスによって調節されているのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにすることである。我々は、この問題に答えるために、本研究で明らかにすべき質問を3つ設定した。

第一に、細胞内で生理的に起こり得る何が、細胞内レドックス状態を大きく変えるのか、という問題である。以前の研究から、光合成活性が変化すると走光性符号が入れ替わることが指摘されていた。そこで、光合成活性がどのようにになると細胞内レドックス状態が変化するのかに着目した。

第二に、何らかの生体反応の結果変化したレドックス状態が、どのようにして感受され、どのようにしてその情報が鞭毛に送られるのかという問題である。

最後に、そのようにして鞭毛にレドックス状態変化の情報が送られたとき、鞭毛はどのようにしてそれに応答するのか、という問題である。

これら3つの設問に答える形で、「細胞内レドックス状態が変化し、鞭毛運動が変化するまでの道筋」を分子レベルで明らかにする

ことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

<第一の設問に対して>

まず、細胞内レドックス状態が走光性符号を決めるという予備的な結果を詳細に定量的に検討した。

その後、光合成活性変化がどのようにしてレドックス状態を変えるのか、という問題に対して、我々はステート遷移に着目した。

光合成ステート遷移は、感受する光の強度変化に応じて光化学系 I, II の集光アンテナのみの移動によって光合成を最適化するという、光合成の光環境適応機能の一種である。このとき、ステート1では「リニア電子伝達」、ステート2では「サイクリック電子伝達」がおきやすくなる。相対的にステート1では活性酸素量が増えることが予測されている。そこで、正・負の走光性を示す細胞の光合成ステートを調べることで、光合成活性変化(ステート遷移)と走光性符号の連関を調べることとした

<第二の設問に対して>

我々は、3種の「レドックス感受性もしくはレドックス・シグナリングによる走光性異常株」を見出した。これらの株の表現型の詳細な解析および原因遺伝子の解析により、レドックス・センシングおよびシグナリングの分子機構を探る。

- *aggl*

どのような光条件でも負の走光性しか示さない(光から逃げて凝集 **aggregate** する)。しかし *aggl* 細胞を酸化処理すると正の走光性を示すことから、*aggl* 細胞では走光性の正負を決定するレドックス状態の閾値が酸化側に偏っていると考えられる。

- *lsp1*

走光性が弱い(**low sensitivity in phototaxis**) 走光性変異株として単離された。常に正と負の走光性を示す株が同程度存在する。我々の実験から、酸化処理をしても抗酸化処理をしてもその傾向が変わらない、つまりレドックス・センシングメカニズムが壊れている可能性が示唆された。

- *ips1*

新たに単離した変異株。酸化処理をすると

負の走光性、抗酸化処理をすると正の走光性を示す。(図2)つまり、走光性の符号が野生株の逆(inverse phototactic sign)であることがわかった。レドックス感受性は野生株と同等だが、その情報が鞭毛に正しく伝わらない、シグナリング異常の株である可能性が示唆された。

<第三の設定に対して>

鞭毛を動かすモータータンパク質ダイニンの外腕のサブユニットには、生物種を問わず酸化還元タンパク質チオレドキシンの活性部位の配列が含まれている。我々の以前の研究から、光環境もしくはレドックス薬剤処理によって、クラミドモナス鞭毛内でチオレドキシンの相互作用するタンパク質が変化していることが明らかになった。この変化が運動調節に関わる可能性がある。これらのタンパク質を同定することによって、鞭毛のレドックス応答メカニズムの一端を明らかにする。

4. 研究成果

1. 光合成活性変化と走光性符号

まず予備的な結果を定量的に検証しなおし、クラミドモナスは酸化剤および抗酸化処理剤処理によって、可逆的・濃度依存的にそれぞれ正の走光性、負の走光性を示すことを明らかにした(文献3,5)。走光性の符号を完全に入れ替える因子の発見はこれが初めてである。

さらに、正、負の走光性を示す細胞をそれぞれ採取して低温蛍光分光法で解析した。蛍光スペクトルのピークの形(2つのピークのうち左側が光化学系II(PSII)の蛍光、右側が光化学系I(PSI)の蛍光)から判断したところ、正の走光性を示す細胞はステート1、負の走光性を示す細胞はステート2であることがわかった(図1)。葉緑体のチラコイド膜上での電子伝達の様式が細胞レベルの運動とリンクしているというこの発見は意外なものであった。現在、ステート遷移異常株の走光性の検定などを行い、ステート遷移と走光性符号変化の因果関係を調べている。

(この実験は、基生研・環境光生物部門 皆川純教授のグループとの共同研究として行った。)

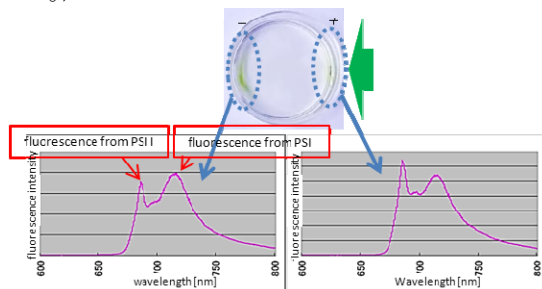


図1: クラミドモナス野生株培養液に右から光を当てた。正の走光性を示す株はステート1でリニア電子伝達(PSII 蛍光>PSI 蛍光)、負の走光性を示す株はステート2でサイクリック電子伝達(PSI 蛍光>PSII 蛍光)にあることが低温蛍光分光法によりわかった。

2. ミュータントの解析

3種のミュータントについて、AFLP法による遺伝子マッピングおよび次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンシングによって変異同定を試みた。

ips1 株については色素の生合成経路に関わる酵素をコードしている可能性が高いことがわかった。実際、この株は色素合成に異常があった(図2)。走光性の符号に色素の合成が関わっているという結果は意外なものであった。現在、表現型相補実験を行なっている。

agg1 株については、候補遺伝子を4種にまで絞ることができた。現在、*agg1* 株ゲノムの従来法によるシーケンシング、表現型相補実験によって原因遺伝子を同定する実験が進行中である。

Isp1 株についてはまだ解析の途中である。(この実験は、東大・院理・生物科学 廣野雅文准教授、基生研・分析室 重信秀治特任准教授との共同研究として行った。)

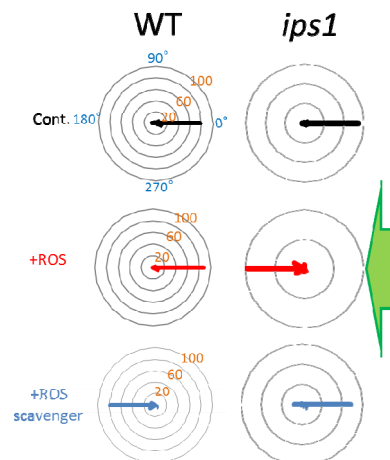


図2: 走光性の符号検定の極ヒストグラム。(0度が正の走光性) *ips1* 株は薬剤処理後、野生株と逆に泳ぐ。

3. 鞭毛ダイニン型チオレドキシンの基質タンパク質の同定

ダイニンサブユニット型チオレドキシンの相互作用するタンパク質を、変異導入したチオレドキシンをクラミドモナスで発現させ、チオレドキシン-基質タンパク質複合体を精製することを試みた。しかし、変異チオレドキシが生体内で確かに基質を補足していることは確かめられたが、質量分析に足

る標品の量を集めることはできなかつた。現在、タンパク質精製法の改善およびアフィニティカラム法への変更を検討中である。

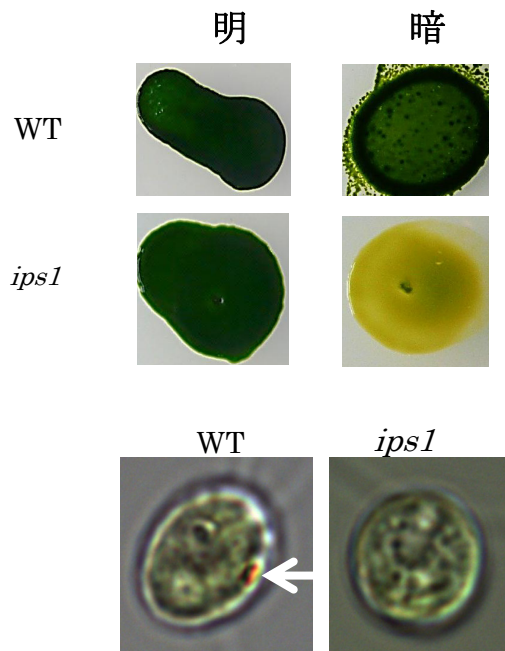


図3：*ips1*株細胞の観察。上：寒天培地の観察。暗闇で育てると色素量が減る。下：顕微鏡観察。眼点を示す色素が見られない。

まとめると、

- (1) 走光性符号のレドックス調節という新しい細胞行動調節機構を発表できた。
- (2) ステート遷移と走光性の連関という新しい現象を見出すことができた。
- (3) レドックス感受性異常による走光性変異株3種のうち、1種については原因遺伝子を同定し、別の1種については候補遺伝子を4つに絞り込むことができた。

走光性を調節するレドックス・シグナリングの分子機構の理解に向け、大きな一歩を踏み出すことができたと考える。

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. Ide, T., Owa, M., King, S.M., Kamiya, R., Wakabayashi, K. (2013) Protein-Protein Interactions between Intermediate Chains and the Docking Complex of *Chlamydomonas* Flagellar Outer Arm Dynein *FEBS Letters* in press. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.058.

2. Engel, B.D., Ishikawa, H., Wemmer, K.A., Geimer, S., Wakabayashi, K., Hirono, M., Craige, B., Pazour, G.J., Witman, G.B., Kamiya, R., and Marshall, W.F. (2012) The role of retrograde intraflagellar transport in flagellar assembly and function *Journal of Cell Biology* 199:151-167. doi: 10.1083/jcb.201206068.

3. Mochiji, S., Wakabayashi, K.* (2012) (*: corresponding) Redox regulation of phototactic migration in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its possible application *Communicative and Integrative Biology* 5: 196-8 doi: 10.4161/cib.18890.

4. VanderWaal, K.E., Yamamoto, R., Wakabayashi, K., Fox, L., Kamiya, R., Dutcher, S.K., Bayly, P., Sale, W.S., and Porter, M.E. (2011) *bop5* mutations reveal new roles for the IC138 phosphoprotein in the regulation of flagellar behavior *Molecular Biology of the Cell* 22:2862-74 doi: 10.1091/mbc.E11-03-0270.

5. Wakabayashi, K.*, Misawa, Y., Mochiji, S., and Kamiya, R. (2011) (*: corresponding) Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:11280-4 doi: 10.1073/pnas.1100592108.

6. Kohno, T., Wakabayashi, K., Diener, D.R., Rosenbaum, J.L., and Kamiya, R. (2011) Subunit interactions within the *Chlamydomonas* flagellar spokehead *Cytoskeleton* 68:237-46 doi: 10.1002/cm.20507.

〔学会発表〕(計19件)(*: 演者)

1. クラミドモナス走光性符号のレドックス調節
*持地翔太、大西紀和、皆川純、神谷律、若林憲一
第54回日本植物生理学会年会、岡山(岡山大学津島キャンパス)、2013年3月21-23日

2.
緑藻クラミドモナスの運動とレドックス制御
若林憲一
第 54 回日本植物生理学会年会 (招待講演)、岡山 (岡山大学津島キャンパス)、2013 年 3 月 21-23 日
3.
ダイニン外腕ドッキング複合体の軸系微小管への結合様式
*大和幹人、井手隆広、神谷律、若林憲一
生体運動研究合同班会議 広島 (広島大学) 2013 年 1 月 12-14 日
4.
Structural and Biochemical Properties of the Outer-Dynein-Arm Docking Complex (ODA-DC) in Chlamydomonas flagella
*M. Owa, T. Ide, S. M. King, R. Kamiya, K. Wakabayashi
2012 Annual Meeting of American Society of Cell Biology, San Francisco (Moscone Center), CA, USA 2012 年 12 月 15-19 日
5.
クラミドモナスの鞭毛運動マシナリー
若林憲一
第 85 回日本生化学会大会 福岡 (福岡国際会議場) 2012 年 12 月 14-16 日
6.
Redox-regulated switching of the phototactic sign in Chlamydomonas
*Shota Mochiji, Norikazu Ohnishi, Jun Minagawa, Ritsu Kamiya, Ken-ichi Wakabayashi
日本生物物理学会第 50 回年会 名古屋 (名古屋大学) 2012 年 9 月 22-24 日
7.
Structural and Biochemical Properties of the Outer-Dynein-Arm Docking Complex (ODA-DC) in Chlamydomonas flagella
*Mikito Owa, Takahiro Ide, Ritsu Kamiya, Ken-ichi Wakabayashi
日本生物物理学会第 50 回年会 名古屋 (名古屋大学) 2012 年 9 月 22-24 日
8.
Analysis of protein-protein interactions required for the assembly of outer arm dyneins on the axonemal microtubules in Chlamydomonas
*Takahiro Ide, Mikito Owa, Kaoru Yoshida, Manabu Yoshida, Ritsu Kamiya, Ken-ichi Wakabayashi
日本生物物理学会第 50 回年会 名古屋 (名古屋

屋大学) 2012 年 9 月 22-24 日

9.
軸系外腕ダイニンの微小管結合における中間鎖の役割
*井手隆広、吉田薫、吉田学、神谷律、若林憲一
生体運動研究合同班会議 つくば (筑波大学) 2012 年 1 月 6-8 日
10.
暗視野顕微鏡法における遊泳細胞の三次元トラッキング
*荒井祐介、持地翔太、若林憲一、吉川雅英、奥寛雅、石川正俊
第 12 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会、京都 (京都大学吉田キャンパス)、2011 年 12 月 23-25 日
11.
クラミドモナス走光性符号のレドックス調節
持地翔太、三澤優花、神谷律、*若林憲一
第 9 回クラミドモナス・ワークショップ 岡崎 (岡崎カンファレンスセンター) 2011 年 11 月 25-26 日
12.
クラミドモナス光行動のレドックス調節
*若林憲一
第 9 回クラミドモナス・ワークショップ 岡崎 (岡崎カンファレンスセンター) 2011 年 11 月
13.
クラミドモナス走光性符号のレドックス調節
*持地翔太、三澤優花、神谷律、若林憲一
日本動物学会第 82 回大会、旭川 (大雪クリスタルホール)、2011 年 9 月 21-23 日
14.
ダイニン外腕ドッキング複合体の軸系微小管への結合様式
*大和幹人、神谷律、若林憲一
日本動物学会第 82 回大会、旭川 (大雪クリスタルホール)、2011 年 9 月 21-23 日
15.
組み換え蛋白質を用いた鞭毛外腕ダイニン中間鎖の機能解析
*井手隆広、神谷律、若林憲一
日本動物学会第 82 回大会、旭川 (大雪クリスタルホール)、2011 年 9 月 21-23 日
16.
クラミドモナス走光性符号のレドックス調

節

*若林憲一、三澤優花、持地翔太、神谷律
生体運動研究合同班会議、大阪（大阪市立大学）、2011年1月7-9日

17.

クラミドモナス走光性符号のレドックス調節

*若林憲一、三澤優花、持地翔太、神谷律
第8回クラミドモナス・ワークショップ、東京（東京大学理学部2号館講堂）、2010年12月11-12日

18.

ダイニン外腕ドッキング複合体の軸系微小管への結合様式

*大和幹人、神谷律、若林憲一
日本動物学会第81回大会、東京（東京大学駒場Iキャンパス）、2010年9月23-25日

19.

鞭毛外腕ダイニン基部タンパク質のインタラクトーム解析

*井手隆広、神谷律、若林憲一
日本動物学会第81回大会、東京（東京大学駒場Iキャンパス）、2010年9月23-25日

〔図書〕（計1件）

1.

Wakabayashi, K. (2011)
Regulation of axonemal outer-arm dyneins in cilia
Dyneins: Structure, Biology and Disease, Elsevier Inc. pp.297-311

〔その他〕

ホームページ等

http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori_HomePage/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 憲一 (WAKABAYASHI, Ken-ichi)
東京工業大学・資源化学研究所・准教授
研究者番号：80420248

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし