

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18584

研究課題名(和文)新規青色光受容タンパク質による緑藻クラミドモナスの走光性分子機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel photoreceptor protein in the molecular mechanisms of phototaxis in *Chlamydomonas*

研究代表者

久富 理 (KUTOMI, Osamu)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：60773728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、緑藻クラミドモナスの走光性の分子機構に関与するか否かを検証することを目的として、ホヤ精子より同定された青色光受容ドメインを持つ新規軸系タンパク質DYBLUPのホモログ「MOT7」の分子特性を解析した。本研究期間において、主に以下の2つを明らかにした。

(1) 免疫沈降実験により、MOT7は内腕ダイニンfに直接結合する軸系タンパク質と結合することがわかった。

(2) 走光性実験により、野生株では始め青色光に集まり、時間が経つにつれ分散したが、MOT7欠損株では時間が経ってもほとんど分散しなかった。この結果は、MOT7は走光性の分子機構において青色光に対する順応性に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we characterized a novel ciliary axonemal protein from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, MOT7, which is a homologue of a dynein photoreceptor protein, DYBLUP from sperm flagella in the ascidian *Ciona intestinalis*. We examined whether MOT7 plays a role in molecular mechanism(s) of phototaxis in *Chlamydomonas* and obtained two following results. (1) The immunoprecipitation experiments revealed that MOT7 associates with a specific axonemal protein, which binds directly to the motor domain of the inner-arm dynein f. (2) Wild-type cells were swimming towards the high-intensity blue-light source just after irradiation, and subsequently were gradually escaping from the light. In contrast, the MOT7-null mutant was gathering around the light, and were not moving away from it. These results suggest that the MOT7 molecule is required for adaptation for blue-light in the *Chlamydomonas* phototaxis behavior.

研究分野：細胞生物学

キーワード：走光性 クラミドモナス 鞭毛 ダイニン 青色光受容

1. 研究開始当初の背景

鞭毛・繊毛は、ほぼすべての真核細胞に存在する毛状の細胞小器官で、鞭毛・繊毛内に存在するモーター分子のダイニンが、隣接する周辺微小管との間ですべり運動を発生することで、波打ち運動が起こる。これまでに我々は、海産脊索動物ホヤの精子から分子量 32,000 の新規の鞭毛軸系タンパク質を同定し、内腕ダイニンの分子種のひとつ「f」のモーター部位に直接結合することを明らかにした。さらにこのタンパク質は、緑藻ミドリムシや光合成細菌などで発見された青色光受容タンパク質が持つ、BLUF (Blue-light using FAD) ドメインを持っていることから、「DYBLUP (Dynein-associated BLUF Protein)」と命名した。以上のことから、鞭毛・繊毛そのものに光を受容する機構が存在し、鞭毛・繊毛運動が光によって制御されるという、これまで知られていない新たな鞭毛・繊毛運動の制御機構が存在する可能性が示唆された。

単細胞緑藻クラミドモナスは、2本の鞭毛を持ち、青色光に向かって泳いだり、逃げたりする「走光性」を示すことが知られているが、この分子機構の全貌は未だ不明な点が多い。DYBLUP のホモログは、クラミドモナスにも存在しており、「MOT7」としてゲノムデータベース/プロテオームデータベースに登録済である (NCBI ID: XM_001690072.1)。我々はウェスタンブロットティングと免疫染色を行い、クラミドモナス鞭毛に MOT7 が存在することを確認している。また、我々はイオン交換カラム抽出で内腕ダイニン f 欠損に伴い、MOT7 の溶出量が減少することを示した。これまでに内腕ダイニン f 欠損株は走光性を示さないことが知られていることから (King and Dutcher, *J. Cell Biol.*, 1997)、クラミドモナスの走光性の分子機構に MOT7 が関与する可能性が浮かび上がった。

2. 研究の目的

本研究では、MOT7 の分子特性の解析を通して、MOT7 がクラミドモナスの走光性の分子機構に関与するかどうかを検証した。本研究期間内において、(1) MOT7 と相互作用する軸系タンパク質の探索、(2) MOT7 欠失株を用いた MOT 欠損が及ぼす走光性への影響、の 2 点について明らかにした。

3. 研究の方法

研究目的 (1) :

上述のように、DYBLUP は内腕ダイニン f のモーター部位に直接結合することが明らかになっている。MOT7 が DYBLUP と同様に内腕ダイニン f に結合するか、あるいは別の鞭毛タンパク質と結合するかどうかを検証するため、MOT7 に HA タグを付加したレスキュー株 (大阪大・山本遼介博士の協力のもと作製) を用いて、単離した鞭毛から高塩濃度で抽出した分画に対して抗 HA タグ抗体による免疫沈降を行い、沈降物を質量分析 (MALDI-TOF/MS) で同定した。質量分析は受託サービス BioGARAGE (運営: 株式会社リバナ) に依頼した。

研究目的 (2) :

クラミドモナス遊泳行動を、走光性に影響を及ぼさない赤色光で観察し、この条件下で様々な波長および強度を示す LED 照明をあて、そのときの遊泳行動変化を解析した。MOT7 欠失株は、クラミドモナス変異株ライブラリ (CLiP: 米国 Martin Jonikas 博士作製: <https://www.chlamylibrary.org/>) より入手した。この株において MOT7 遺伝子の翻訳領域が欠損しており、当該タンパク質を発現していないことを確認した後に本実験に使用した。本実験は先端バイオイメージング支援プラットフォーム (支援機関: 筑波大学下田臨海実験センター・稲葉一男博士研究室) の支援を受けて行った。

4. 研究成果

(1) MOT7 と相互作用する軸糸タンパク質の探索:

上述した方法にしたがって、HA タグを付加した MOT7 レスキュー株を用いた免疫沈降を行ったところ、分子量 250 kDa 付近において特異的なバンドがいくつか検出された (図 1)。これらのバンドを切り出し、質量分析を行ったところ、機能未知の軸糸タンパク質「FAP44」(NCBI ID: XP_001695270.1) が同定された。FAP44 は内腕ダイニン f のモーター部位に直接結合することが、最近のクライオ電子線トモグラフィ解析によって明らかになっている (Fu et al., *Mol. Biol. Cell* 2018; Kubo et al., *Mol. Biol. Cell* 2018)。この知見を合わせると、本実験結果によって MOT7 は FAP44 と相互作用することと、ホヤ精子 DYBLUP の場合と同様に、内腕ダイニン f のモーター活性の調節に関わる可能性が示された。

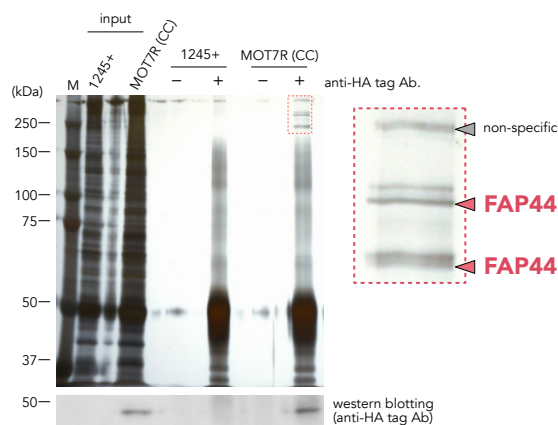


図 1: クラミドモナス野生株 (1245+)、HA タグ付 MOT7 レスキュー株 (MOT7R) における、抗 HA タグ抗体を用いた免疫沈降。MOT7R において 250 kDa 付近にいくつかのバンドが検出された (赤破線枠)。これらのバンドのうち、質量分析により FAP44 が同定された。同時に抗 HA タグ抗体によるウェスタンブロッティングを行い、MOT7R の分画にのみ HA タグが発現していることを確認した。

(2) MOT7 欠失株を用いた MOT 欠損がおよぼす走光性へ影響:

まず、顕微鏡視野の片側に青色光を照射したところ、野生株でははじめ光源に向かって泳ぐが、次第に光源から遠ざかる遊泳を示した。これに対して MOT7 欠損株では、遠ざかる遊泳があまり見られなかった。これは MOT7 欠損株では本来クラミドモナスが持っていると考えられる光の順応性に欠陥が生じている可能性を示している。

次に、この可能性をさらに検証するため、光学顕微鏡視野の中央に強光の青色光が照射されるようにセットし、そのときのクラミドモナスの遊泳の様子を解析した。その結果、野生株では照射直後は光源に集まり、時間が経つにつれて光源から離れていく様子が見られた。これに対して MOT7 欠損株では、野生株よりも分散する個体が少なく、光源にトラップされる様子が見られた (図 2)。

したがって、MOT7 は走光性の分子機構において、青色光に対する順応性 (慣れ) に機能している可能性が示された。

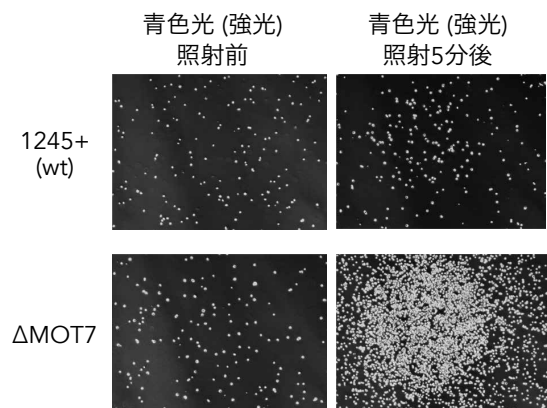


図 2: クラミドモナス野生株 (1245+)、MOT7 欠損株 (Δ MOT7) における、青色光に対する走光性実験。視野中央に青色光を照射したところ、 Δ MOT7 では光源にとどまり続けた。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

(○: 発表者)

1. 久富 理○, 竹田 扇.
T 細胞分化過程における繊毛関連分子の機能解析 (口頭発表). 第 123 回日本解剖学会・全国学術集会 (日本獣医生命科学・日本医科大学武蔵野キャンパス, 東京). 2018. 3. 28-30.
2. Osamu Kutomi, Keiko Hirose, Katsutoshi Mizuno, Kogiku Shiba, Ryosuke Yamamoto, Daisuke Shibata, Mami, Nomura, Lixy Yamada, Masako Nakajima, Hitoshi, Sawada, Sen Takeda, Takahide Kon, Ken-ichi Wakabayashi, Kazuo Inaba○.
Light-responsive regulation of ciliary motility by a novel subunit of axonemal dynein with a photoreceptor protein (口頭発表, 招待講演). International Workshop Dyenein 2017 (Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan). 2017. 10. 29-11. 1.
3. 久富 理○, 竹田 扇.
T 細胞分化過程における繊毛関連分子の役割 (口頭発表). 繊毛研究会 2017 (筑波大学下田臨海実験センター, 静岡). 2017. 10. 26-27.
4. 久富 理○.
ゾウリムシ細胞表層シートを用いた繊毛運動調節機構の研究 (口頭発表, 招待講演). 日本動物学会第 88 回大会 (富山県民会館, 富山). 2017. 9. 21-23.
5. Osamu Kutomi○, Manabu Hori.
Analysis on the ciliary movements in *Paramecium* using the ciliated cortical sheet (口頭発表, 招待講演). 2017 日本生物物理学会第 55 回年会 (熊本大学黒髪北地区, 熊本). 2017. 9. 19-21.

6. 久富 理○, 竹田 扇.
マウス胸腺内における免疫シナプスの構造解析 (ポスター発表). 第 122 回日本解剖学会・全国学術集会 (長崎大学坂本キャンパス, 長崎). 2017. 3. 28-30.
7. Osamu Kutomi, Keiko Hirose, Katsutoshi Mizuno, Kogiku Shiba, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada, Daisuke Shibata, Ryosuke Yamamoto, Kazuo Inaba○.
A novel subunit of axonemal dynein contains a photoreceptor protein domain (口頭発表). 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.). 2016. 6. 26-7. 1.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

解剖学講座細胞生物学教室/山梨大学医学部・大学院総合研究部

<http://cellbiology.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久富 理 (KUTOMI, Osamu)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号: 60773728