

令和元年6月5日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2018

課題番号：17H05057

研究課題名(和文)三次元構造解析に基づく繊毛微小管の構築と繊毛運動の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Three-dimensional Structural Analysis of Cilia

研究代表者

小田 賢幸(Oda, Toshiyuki)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：20569090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛は人体において、気道からの異物除去、脳脊髄液の循環、精子の運動など様々な生理現象に関わる重要な運動性細胞小器官である。今回の研究では主に以下の2点の発見があった。

1. 繊毛の主要構造タンパク質であるチューブリンに負電荷を与える修飾が、繊毛運動を制御していることを明らかにした。
2. 繊毛に存在する未解析のタンパク質、FAP43, FAP44, FAP244, FAP70の解析を行い、それらが繊毛を動かすモータータンパク質の活性制御を行っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、人体において重要な役割を果たしている繊毛の運動を制御している新しい分子メカニズムが明らかになった。繊毛の機能不全は、胎児期の発生異常や慢性気道感染症、水頭症、不妊などの様々な疾患に関わっている。今回の研究はこれらの繊毛関連疾患の病態理解を深め、疾患の治療の進歩に貢献することが期待される。またチューブリンの修飾に関する発見は繊毛だけでなく、細胞骨格に関わる広範な細胞生物学の理解に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Cilium is a conserved motile organelles and plays essential roles in cellular motility, airway clearance, and cerebrospinal fluid circulation. Below are the major findings in our study:

1. We investigated the function of a post-translational modification of ciliary tubulin using genetics and cryo-electron tomography. We revealed that tubulin poly-glutamylation occurs at specific sites on the ciliary microtubules and the negative charges applied to the positions are essential for normal ciliary motility.
2. We analyzed the function of novel ciliary proteins: FAP43, FAP44, FAP244, and FAP70. We found that FAP43, FAP44 and FAP244 form a "tethering" complex, which connects the inner dynein f to the microtubule. We also found that FAP70 is a novel regulatory subunit for the outer dynein arm.

研究分野：構造生物学

キーワード：繊毛 モータータンパク質 クライオ電子顕微鏡 微小管 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

繊毛には波打ち運動により液体の流動を生み出す運動性繊毛と、運動性を持たず細胞のセンサーとして働く一次繊毛の二種類がある。運動性繊毛は気管上皮細胞、卵管上皮細胞、精子の尾部、原始線条、脳室上衣細胞など多くの器官に存在し、その欠損や機能障害は、慢性気道感染症、不妊、内臓逆位、水頭症などを特徴とする原発性繊毛運動不全症と呼ばれる先天性疾患を引き起こす。繊毛は二重微小管という特殊な微小管を基礎とした、極めて均一な構造を作っているが、その構築メカニズムは殆ど分かっていない。

2. 研究の目的

繊毛は二重微小管という特殊な微小管を基礎とした、極めて均一な構造を作っているが、その構築メカニズムは殆ど分かっていない。本研究においては、繊毛の微小管構造を、電子顕微鏡を用いて三次元的に解析することで、「繊毛微小管の構築メカニズム」と「繊毛の運動機能の分子メカニズム」を微細形態から解明する。

3. 研究の方法

緑藻クラミドモナスの様々な変異体、遺伝子導入体から繊毛軸系を単離し、その三次元構造を、クライオ電子顕微鏡を用いて解析した。得られた構造データをもとに、生化学的活性測定や遺伝学的機能解析を行い、繊毛タンパク質の構造と機能を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 繊毛チュープリンのポリグルタミル化の三次元局在と機能の解明

繊毛微小管を構成するチュープリンの翻訳後修飾に着目し、ポリグルタミル化が繊毛微小管とダイニン制御複合体との接合面に限局して起こることを、抗ポリグルタミル化抗体による構造ラベリングとクライオ電子トモグラフィーを用いて三次元的に示した。また遺伝子改変を用いて、負に荷電したポリグルタミル化 チュープリンと、正に荷電したダイニン制御複合体との間の電荷的相互作用が微小管の滑り運動を制御していることを示した。この電荷的相互作用は精緻に制御されており、相互作用が強すぎても弱すぎても繊毛運動に負の影響を与えることを明らかにした。(Kubo and Oda, *Molecular Biology of the Cell* 2017)

(2) 内腕ダイニンを制御する新規複合体の発見

繊毛ダイニンの1つである内腕ダイニン *f* の motor domain を微小管に固定する tether complex を発見し、それが FAP43/FAP244 と FAP44 の複合体で構成されることを示した。また、内腕ダイニン *f* の ATP 依存的構造変化を三次元的に解析し、tether complex がダイニンの構造的安定性に寄与することで、モーター活性を制御していることを示した。また、tether complex により固定された内腕ダイニン *f* のモータードメインは、微小管の長軸方向ではなく鉛直方向に power stroke を起こすことを明らかにした。(Kubo et al, *Molecular Biology of the Cell*, 2018)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Kubo T, Hou Y, Cochran DA, Witman GB, Oda T. A microtubule-dynein tethering complex regulates the axonemal inner dynein f (I1). *Molecular Biology of the Cell*. 29 (9): 1060-1074, 2018. 査読有, DOI: 10.1091/mbc.E17-11-0689
2. Shamoto N, Narita K, Kubo T, Oda T, Takeda S. CFAP70 Is a Novel Axoneme-Binding Protein That Localizes at the Base of the Outer Dynein Arm and Regulates Ciliary Motility. *cells*. 7: pii

E124, 2018. 査読有, DOI: 10.3390/cells7090124

3. Kubo T, Oda T. Chlamydomonas as a tool to study tubulin polyglutamylated. *Microscopy*. 68 (1), 80-91. doi: 10.1093/jmicro/dfy044, 2018. 査読有, DOI: 10.1093/jmicro/dfy044
4. Kubo T, Oda T. Electrostatic interaction between polyglutamylated tubulin and the nexin-dynein regulatory complex regulates flagellar motility. *Molecular Biology of the Cell*. 28 (17): 2260-2266, 2017. 査読有, DOI: 10.1091/mbc.e17-05-0285
5. Oda T. Three-dimensional structural labeling microscopy of cilia and flagella. *Microscopy*. 66 (4): 234-244, 2017. 査読有, DOI: 10.1093/jmicro/dfx018
6. 小田賢幸 クライオ電子トモグラフィーの実用技術 顕微鏡 53 (1): 2018, 査読有
http://microscopy.or.jp/jsm/wp-content/uploads/publication/kenbikyo/53_1/53_1j06to.html
7. Yamaguchi H, Oda T, Kikkawa M, Takeda H. Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly. *elife*. 7:e36979, 2018, DOI: 10.7554/eLife.36979

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Oda T. 3D structural analysis of cilia using cryo-electron tomography. 8th Asia Pacific International Congress of Anatomists. 2018.
2. 小田賢幸 クライオ電顕の試料作製とデータ解析 平成 30 年度電顕サマースクール 2018
3. 小田賢幸 クライオ電子トモグラフィーによる繊毛モーターおよびチューブリン修飾の構造解析 機能タンパク質の構造と機能のダイナミクスと、それに基づく細胞・生体システム作動機構の研究拠点の形成 平成 29 年度末 シンポジウム 2018.
4. Oda T. Electrostatic interaction between polyglutamylated tubulin and the nexin-dynein regulatory complex regulates flagellar motility. Dynein 2017. 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。