

令和元年6月5日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15115

研究課題名(和文)チューブリンポリグルタミン酸化修飾による鞭毛繊維構築メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of flagellar/ciliary assembly mechanism by tubulin polyglutamylation

研究代表者

久保 智広 (KUBO, Tomohiro)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：70778745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：鞭毛繊維の構築におけるチューブリン・ポリグルタミン酸化修飾の意義を解明するために、哺乳類のポリグルタミン酸化酵素TTLL6と相同な蛋白質を欠損した新規のクラミドモナス変異株ssa11を解析した。ssa11は既存のポリグルタミン酸化修飾tpg1変異株(TTLL9を欠損)と二重変異株にすると、軸系のポリグルタミン酸化修飾がtpg1よりも大きく低下し、そのために顕著な運動低下を示す。また、興味深いことにssa11tpg1は野生株と比較して鞭毛の構築速度が有意に遅いことが分かった。このことは、ポリグルタミン酸化修飾が軸系微小管の安定性に何らかの影響を及ぼしていることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、鞭毛のモデル生物クラミドモナスを用い、チューブリン・ポリグルタミン酸化修飾が鞭毛の構築にどのように関与するかを解明しようとするものである。ポリグルタミン酸化酵素TTLL6を欠失した新規の変異株ssa11を解析したところ、ssa11は既存のポリグルタミン酸化修飾変異株tpg1と二重変異にすると鞭毛の構築が顕著に遅くなることが分かった。このことは、ポリグルタミン酸化修飾が軸系微小管の安定性に何らかの影響を及ぼしていることを示唆する。鞭毛繊維は多くのヒト繊維病に関わる。その構築機構を解明することは生物学的・基礎医学的に重要である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the function of tubulin polyglutamylation in flagellar assembly, I analyzed a novel Chlamydomonas mutant ssa11 lacking a protein homologous to mammalian polyglutamylase TTLL6. When combined with the previously investigated tpg1 mutant (lacking Chlamydomonas TTLL9), ssa11 exhibited a dramatic reduction of axonemal polyglutamylation even more than the tpg1, thereby causing a severe motility defect. Interestingly, ssa11tpg1 had slower flagellar regeneration kinetics compared to wild type. This result suggests that tubulin polyglutamylation affects the stability of axonemal microtubules.

研究分野：細胞生物学

キーワード：鞭毛・繊維 クラミドモナス チューブリン 翻訳後修飾 ポリグルタミン酸化 TTLL 運動性

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

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の微小管細胞骨格を構成するチューブリンは、ポリグルタミン酸化を受ける。これはチューブリンの C 末端付近から様々な長さのグルタミン酸の側鎖が形成される翻訳後修飾で、神経細胞、中心体、紡錘体、鞭毛繊毛などを構成する微小管に多く見られる。ポリグルタミン酸化されたチューブリンは、分子モーターなど微小管結合蛋白質と微小管の相互作用に大きな影響を与えると考えられている。

単細胞緑藻類クラミドモナスを用いた研究によって、この修飾は鞭毛の運動性と伸長に重要であることが明らかにされてきた。申請者らは以前、ポリグルタミン酸化修飾酵素の一種 TTLL9 に相応な蛋白質をコードする遺伝子を欠失したクラミドモナス変異株 *tpg1* 株を単離・同定し、その解析を行った。その結果、ポリグルタミン酸化修飾は特定の内腕ダイニンあるいはダイニン制御複合体 (Dynein regulatory complex) と呼ばれる構造に特に影響を及ぼすことによって、鞭毛運動全体を制御することが明らかになった (Kubo et al., 2010; 2012)。また TTLL9 と 1:1 で相互作用し、TTLL9 の鞭毛内局在を決定する FAP234 という蛋白質を同定した (Kubo et al., 2014)。さらに、ポリグルタミン酸化修飾がおそらく微小管の安定性を変化させて、軸系微小管の長さを制御している可能性を見出した (Kubo et al., 2015)。

このように、クラミドモナスを用いた研究によって、この修飾と鞭毛・繊毛の関係性についての重要な発見があったが、まだ多くのことが分かっていない。例えば、ポリグルタミン酸化は Tubulin-tyrosine ligase-like (TTLL) protein に属する複数の蛋白質が担っているが、機能と反応特異性が異なるものが 10 種類程度存在する (van Dijk et al., 2007)。一つの修飾に対してこれほど多くの酵素が存在するのは、様々な長さの側鎖を形成するためと想像されるが、長い側鎖と短い側鎖の機能の違いがよく分かっていない。また、TTLL が鞭毛・繊毛内に局在するためには鞭毛内輸送系によって酵素が輸送される過程が必要であるが、それがどのように行われるかはまだ不明である。さらに、申請者の以前の研究によって、TTLL9 を欠失したクラミドモナス変異株は短鞭毛変異株の表現型を抑制するという予想外なことが分かった。ポリグルタミン酸化チューブリンが微小管の安定性に関与していることが示唆されるが、その詳しい機構はまだよく分かっていない。

このような背景の中、申請者はポリグルタミン酸化修飾酵素を欠失した新規のクラミドモナス変異株の解析を開始した。多くの TTLL をコードする遺伝子は複数あるものの、クラミドモナスにおいては以前単離された *tpg1* 以外は変異株が存在しなかったため、その他の TTLL 変異株を解析することで大きな進展があると考えられた。

### [参考文献]

- Kubo, T. et al. (2010). *Curr Biol.* 20, 441-445  
Kubo, T. et al. (2012). *Cytoskeleton.* 69, 1059-1068  
Kubo, T. et al. (2014). *MBoC.* 25, 107-117.  
Kubo, T. et al. (2015). *MBoC.* 26, 2810-2822.  
van Dijk et al. (2007). *Moll Cell.* 26, 437-448.

### 2. 研究の目的

本研究の大きな目標は、クラミドモナス変異株を用いてチューブリン・ポリグルタミン酸化修飾がどのように鞭毛の構築に寄与しているかを解明することである。クラミドモナスは古くから使われてきた鞭毛・繊毛のモデル生物である。鞭毛の単離が容易である点、多くの鞭毛や鞭毛基部体の変異株が単離されている点、ゲノムデータベースや鞭毛プロテオームが完備されている点、など、鞭毛を研究する上でうってつけの生物である。上記の目標を達成するために、研究開始当初は以下三つの目的を設定した。

- (1) 鞭毛構築異常を伴う新規ポリグルタミン酸化酵素欠損株の解析、
- (2) 周辺微小管 B 小管特異的修飾メカニズムの解明、
- (3) 修飾が生じる B 小管プロトフィラメントの決定

### 3. 研究の方法

研究の目的(1)-(3)に対応するように、以下の研究方法(1)-(3)を設定した。

- (1) *tll6* の表現型解析およびIFT キネシンの *in vitro* motility assay
  - (2) TTLL6 ポリグルタミン酸化活性の定量
  - (3) 抗ポリグルタミン酸化チューブリン抗体を用いた軸系のクライオ電子線トモグラフィー
- しかしながら、2017 年度の研究実施報告書で記述した理由で、(1), (2)については変更を余儀なくされた。そのため、*tll6* 変異株の解析は中止し、その代わりに *ssa11* という新規のポリグルタミン酸化修飾の変異株の解析を開始した。

#### 4. 研究成果

(1) チューブリン・ポリグルタミン酸化に異常を持つ新規クラミドモナス変異株 *ssa11* の解析  
 TTLL9 以外のポリグルタミン酸化酵素の機能を調べるために、クラミドモナスの変異株ライブラリーから TTLL 遺伝子に変異を持つ変異株を複数得た。そのうち、哺乳類の TTLL6 (あるいは TTLL13) に相同な遺伝子に変異を持つ *ssa11* に着目して解析を行った。その結果、以下三点の知見を得た。

##### *ssa11tpg1* は顕著な運動異常を示す

*ssa11* 自体は運動性に異常を持たないが、既存のポリグルタミン酸化修飾異常株 *tpg1* と二重変異株にすると運動性が *tpg1* よりも大きく低下する (図 1)。遊泳速度がおおむね *tpg1* の 6 割程度、また野生株の 1/3 程度までに低下することが分かった。一方、鞭毛打頻度は野生株の 6 割程度であった。この理由は今後の詳細な解析が必要であるが、おそらく鞭毛波形の異常によるものと考えられる。

##### *ssa11tpg1* は顕著なポリグルタミン酸化修飾異常を持つ

*ssa11tpg1* のポリグルタミン酸化修飾の度合いを調べるために、ポリグルタミン酸化チューブリン特異的な抗体を用いて、間接蛍光抗体法を行った。すでに報告されているように polyE 抗体で染色すると *tpg1* の鞭毛はポリグルタミン酸化修飾を示す蛍光が弱まっている。ところが、興味深いことに *ssa11tpg1* は *tpg1* よりも一層蛍光が弱いことが分かった (図 2)。鞭毛基部体と鞭毛基部付近に蛍光が多少存在するが、これは TTLL9 と TTLL6 以外の修飾酵素によるものと考えられる。

##### *ssa11tpg1* は鞭毛再生速度が有意に低下する

*ssa11tpg1* の鞭毛再生速度を測定したところ、野生株と比較して有意に遅いことが分かった (図 3)。このことはポリグルタミン酸化修飾が軸系微小管の安定性に影響を及ぼしていることを示唆する。

図 1

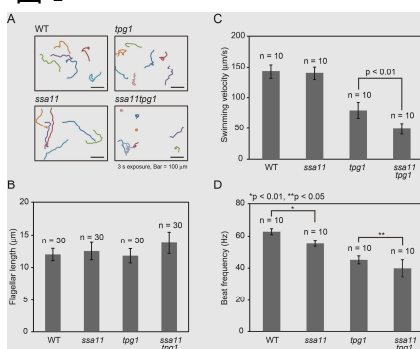


図 2

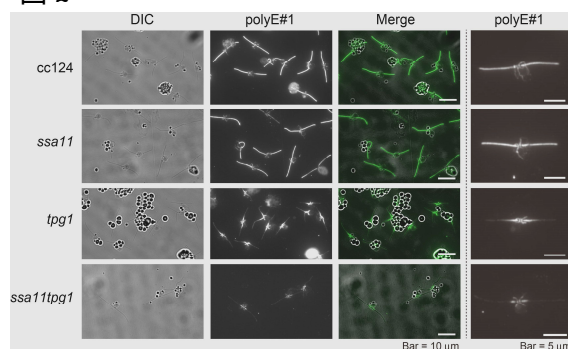
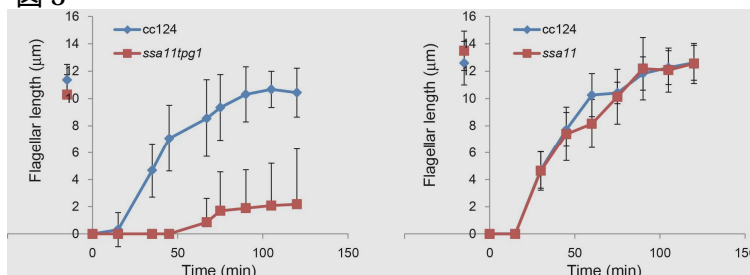
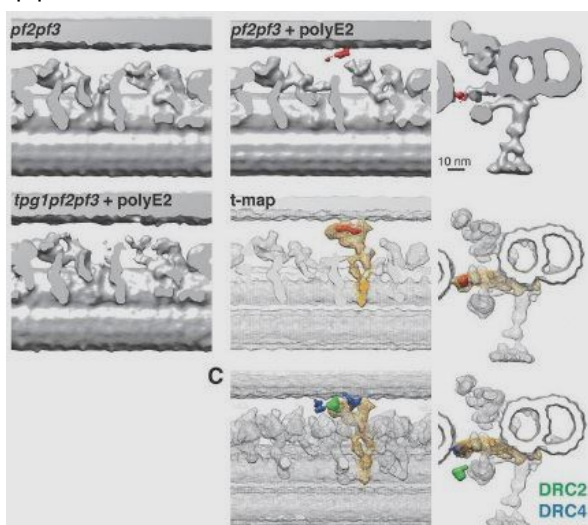


図 3



(2) 抗ポリグルタミン酸化チューブリン抗体を用いた軸系のクライオ電子線トモグラフィー  
 ポリグルタミン酸化修飾は軸系の周辺微小管のうち、B 小管特異的に生じることが知られている (Lechtreck and Geimer, 2000)。ところが B 小管のどの部分に限局して存在するかは分かっていなかった。そのことを調べるために、私たちはポリグルタミン酸化チューブリン特異的な抗体を処理した軸系を用いて、クライオ電子線トモグラフィーを行った。その結果、ポリグルタミン酸化チューブリンを示すシグナルが、ダイニン制御複合体 (Dynein regulatory complex, DRC) と相互作用する接触面に存在することが分かった (図 4)。この結果は、以前私たちが変異株を用いて行った結果と一致する。

図 4



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件) 全て査読有

Tomohiro Kubo and Toshiyuki Oda. (2018). Microscopy. *Chlamydomonas* as a tool to study tubulin polyglutamylation. (In press, Review). doi: 10.1093/jmicro/dfy044.

Noritoshi Shamoto, Keishi Narita, Tomohiro Kubo, Toshiyuki Oda, and Sen Takeda. (2018). CFAP70 is a Novel Axoneme-Binding Protein that Localizes at the Base of the Outer Dynein Arm and Regulates Ciliary Motility. *Cells*. pii: E124. doi: 10.3390/cells7090124.

Tomohiro Kubo, Yuqing Hou, Deborah Cochran, George B. Witman, and Toshiyuki Oda. 2018. A microtubule-dynein tethering complex regulates the axonemal inner dynein f (I1). *Molecular Biology of the Cell*. 29, 1060-1074. doi: 10.1091/mbc.E17-11-0689.

Tomohiro Kubo and Toshiyuki Oda. 2017. Electrostatic interaction between polyglutamylated tubulin and the nexin-dynein regulatory complex regulates flagellar motility. *Molecular Biology of the Cell*. 28; 2260-2266. doi: 10.1091/mbc.E17-05-0285.

Yuya Nishijima, Yohei Hagiya, Tomohiro Kubo, Ryota Takei, Yohei Katoh and Kazuhisa Nakayama. 2017. RABL2 interacts with the IFT-B complex and CEP19, and participates in ciliary assembly. *Molecular Biology of the Cell*. 28; 1652-1666. doi: 10.1091/mbc.E17-01-0017.

〔学会発表〕(計 4 件)

(学会発表)

Tomohiro Kubo, Yuqing Hou, Deborah Cochran, George B. Witman, and Toshiyuki Oda. A microtubule-dynein tethering complex regulates the axonemal inner dynein f (I1). 18<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. Washington. (2018 年 6 月 18 日) .

Tomohiro Kubo, Yuqing Hou, Deborah Cochran, George B. Witman, and Toshiyuki Oda. A microtubule-dynein tethering complex regulates the axonemal inner dynein f (I1). 第 70 回日本細胞生物学会. タワーホール船堀 (2018 年 6 月 5 日-8 日) .

(招待講演)

Tomohiro Kubo, Jason Brown, Karl Bellve, Branch Craige, Julie Craft, Kevin Forgarty, Karl Lehtreck, George Witman. The IFT81 and IFT74 N-termini together form the main module for intraflagellar transport of tubulin. 第 69 回日本細胞生物学会大会. 仙台 (2017 年 6 月 13 日).

久保智広、小田賢幸. Structural biology of *Chlamydomonas* flagella. 日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会. 札幌 (2017 年 5 月 31 日).

〔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  
なし

(2)研究協力者  
なし

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。