

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15117

研究課題名(和文) 繊毛ダイニン前集合におけるMOT48分子の機能探索

研究課題名(英文) Molecular function(s) of MOT48 in the dynein pre-assembly

研究代表者

山本 遼介 (Yamamoto, Ryosuke)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：10743114

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)：運動性繊毛は内部の巨大モータータンパク質複合体「繊毛ダイニン」により駆動される。繊毛ダイニンは細胞質内において各種サブユニットから組み立てられ、この機構は「前集合」と呼ばれている。繊毛ダイニン前集合の異常は人体疾患の引き金となるが、その詳細な分子機構には謎が多い。本研究では単細胞緑藻クラミドモナスの前集合異常株を用いて、繊毛ダイニン前集合の分子基盤の一端の解明を目指した。本研究により、クラミドモナスの3種の前集合因子(PF13/MOT48/TWI1)が組み立てる繊毛ダイニン分子種が明らかとなり、同時にこれら分子の前集合における機能には一定の冗長性と相補性が存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛ダイニンの細胞質内における組み立て/折り畳み(前集合)異常は、左右軸逆位/気管支炎/不妊等を含む重篤な人体疾患の引き金となる。しかしながら、その重要性にも関わらず、繊毛ダイニン前集合機構の分子基盤には不明な点が多い。我々は、2本の運動性繊毛を持つ単細胞緑藻クラミドモナスの変異株を用いて、遺伝学的/生化学的/構造生物学的な手法により前集合の分子基盤の一端の解明に努めた。その結果、2種の新規前集合異常株(mot48-2及びtwi1株)の単離に成功し、複数種の繊毛ダイニン前集合因子(PF13/MOT48/TWI1)が具体的にどの繊毛ダイニン種の組み立て/折り畳みに関与するのかを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Motility of cilia is driven by the gigantic motor-protein complexes called "ciliary dyneins". Ciliary dyneins are folded/assembled from their subunits (HC/IC/LC) in the cytoplasm, and this process is called "pre-assembly". Defects in the dynein pre-assembly cause various severe human diseases, but the underlying molecular mechanism(s) of the dynein pre-assembly has been poorly understood. In this study, by analyzing several pre-assembly deficient mutants of a green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) we aimed to elucidate the molecular mechanism(s) of the dynein pre-assembly. We identified ciliary dynein species, which were folded/assembled by the three *Chlamydomonas* pre-assembly factors (PF13/MOT48/TWI1). Further, we found that the functions of these three dynein pre-assembly factors were somewhat redundant and complementary, suggesting the mechanism of dynein pre-assembly is far more complex than has been previously thought.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛 前集合 pre-assembly MOT48 TWI1 PF13 ダイニン *Chlamydomonas*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動性繊毛は、多くの真核生物細胞上に観察される運動性の細胞小器官である。哺乳類を含む高等多細胞動物においては、運動性繊毛は脳室/気管/輸卵管/精子などの細胞に存在し、発生/生殖/異物排出/恒常性維持などに大きな役割を担う。ヒトにおいても、運動性繊毛の異常は、水頭症/左右軸逆位/気管支炎/不妊などの疾患の原因となることが明らかになっており、最近では新型コロナウイルス感染症における興味深い役割も示唆されている。かつては「細胞上の不要な進化の遺物」と見做されたこともあったが、運動性繊毛の様々な人体疾患への関連が明らかになるに従い、現在、その運動性機構と構築機構に深い関心が寄せられている。

運動性繊毛の波状運動は、繊毛内に存在する巨大モータータンパク質複合体「繊毛ダイニン」により駆動される。繊毛ダイニンは、ATPの化学エネルギーを力学的な力に変換する巨大酵素複合体であり、一般に複数の重鎖/中間鎖/軽鎖から構成される。繊毛ダイニンは、細胞質内においてこれらの構成要素から組み立て/折り畳まれることが明らかになっており、この機構は「前集合 (pre-assembly)」と呼ばれる。人体内で繊毛ダイニン前集合機構に異常が生じると、前述したような重篤な複合的疾患を引き起こす。しかしながら、その重要性にも関わらず、前集合機構に関与する分子群やその分子機構には不明な点が多く残されている。また、前集合異常により引き起こされる人体疾患の診断法/治療法ともに未だ手探りの状態にあり、根治療法は開発されていない。

2. 研究の目的

以前、研究代表者は繊毛ダイニン前集合機構に必須な分子として **MOT48 (IDA10p)** を同定した。**MOT48** 分子は単細胞生物から多細胞動物に至るまで真核生物界に広く保存されており、その欠陥は特定種の繊毛ダイニン (内腕ダイニン) の前集合異常を引き起こすことを明らかにしていた。しかしながら、**MOT48** 分子の具体的な分子機能は未解明であり、どの様に繊毛ダイニン前集合に関与するのかも詳しくは明らかになっていなかった。そこで、本研究では **MOT48** の分子機能解明を足掛かりとし、繊毛ダイニン前集合機構の分子基盤の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスやショウジョウバエなどの一般的なモデル生物では、微細な細胞小器官である運動性繊毛、及びその構成要素である繊毛ダイニンの細胞質内における組み立て過程を詳細に研究することは困難である。従って、本研究では 2 本の運動性繊毛を有する単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) をモデル生物として用いた。クラミドモナスは大量培養が可能であり、繊毛の単離も容易で遺伝学も利用可能であるため、繊毛ダイニン前集合の研究には理想的なモデル生物である。クラミドモナスの新規前集合異常株の単離、それらの原因遺伝子間の遺伝的相互関係の探索、及び原因タンパク質がどの種類の繊毛ダイニンの前集合に関与しているのかの決定を本研究では行った。

4. 研究成果

まず、クラミドモナス新規前集合異常株探索の結果、2 種の新規繊毛ダイニン前集合異常株 (*mot48-2* 株及び *twi1* 株) を単離することに成功した。*mot48-2* 株の原因タンパク質は前述の **MOT48**、*twi1* 株の原因タンパク質は **MOT48** と同じ **PIH1 (Protein Interacting with HSP90 1)** ドメインを有する **TWI1** であった。**PIH1** ドメインは各種シャペロンへの結合部位となる可

能性が現在までに報告されており、**MOT48/TWI1** 分子は共にシャペロンの共因子としての機能を有している可能性を示唆するものであった。**TWI1** は **MOT48** 同様、繊毛を持つ高等多細胞動物にまで真核生物界で広く保存されていた。

次に、**mot48-2** 株と **twi1** 株の原因遺伝子間の相互関係を決定するために、これらの株の 2 重変異株 (**mot48-2; twi1** 株) の作成を行った。また、既知の繊毛ダイニン前集合因子であり **PIH1** ドメインを有する **PF13** タンパク質に欠損を持つクラミドモナス変異株 (**pf13** 株) を入手し、**pf13** 株と **mot48-2** 株/**twi1** 株の 2 重変異株 (**pf13; mot48-2** 株/**pf13; twi1** 株) も同様にそれぞれ作成した。これらの 2 重変異株及び単変異株の繊毛ダイニン量を相互に比較したところ、興味深いことに **MOT48/TWI1/PF13** という **PIH1** ドメインを有する繊毛ダイニン前集合因子の働きには一定の冗長性と相補性が存在するらしいことが明らかとなった。

また、前述の繊毛ダイニン存在量比較の過程で、繊毛ダイニンの存在量を半定量的に見積もる実験より、複数種存在する繊毛ダイニン種のうち **MOT48/TWI1/PF13** 分子がそれぞれの種の前集合に主として関与するのかが明らかにすることが出来た。結果を総合すると、繊毛ダイニン前集合機構は以前考えられていたよりも遥かに複雑な経路を持つことが明らかとなり、本研究成果を国際学術誌に発表した (**Yamamoto et al., 2020. PLoS Genet. 16(11):e1009126**)。

これに加え、繊毛ダイニン前集合で組み立てられる部品としての繊毛ダイニン構成要素の探索も行い、1 種の新規繊毛ダイニン軽鎖 (**DYBLUP/MOT7**) を同定した。この新規軽鎖は内腕ダイニン種 **fl11** と呼ばれる分子種の構成要素であり、興味深いことに分子内に光感受性ドメインとして報告されている **BLUF (sensors of Blue-Light Using FAD)** ドメインを有していた。また、クラミドモナスにおける当該軽鎖の欠損株 (**mot7** 株) は野生型と比較して光への応答が異常になっている可能性が得られた。これらの結果は、繊毛ダイニンの活性制御が光によっても行われる可能性を示唆するものであり、これらの成果も国際学術雑誌に発表した (**Kutomi*, Yamamoto*, et al., 2021. Sci Adv. 7(9):eabf3621 [*: 同等貢献]**)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osamu Kutomi*, Ryosuke Yamamoto* et al. (*: equal contribution)	4. 巻 7
2. 論文標題 A dynein-associated photoreceptor protein prevents ciliary acclimation to blue light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf3621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abf3621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ryosuke Yamamoto, Shiho Yanagi, Masahito Nagao, Yuya Yamasaki, Yui Tanaka, Winfield S. Sale, Toshiki Yagi, Takahide Kon	4. 巻 16
2. 論文標題 Mutations in PIH proteins MOT48, TWI1 and PF13 define common and unique steps for preassembly of each, different ciliary dynein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takahide Kon, Hiroshi Imai, Ryosuke Yamamoto
2. 発表標題 Transport toward the center of the cell: structure & mechanism of microtubule-based systems [MOT7/DYBLUP, a novel dynein subunit with a BLUF domain]
3. 学会等名 台湾清華大学 大阪大学 国際シンポジウム (2021 NTHU-OU Virtual Symposium on Biological and Medical Sciences) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本遼介, 中桐侑平, 久富理, 今井洋, Song Chihong, 村田和義, 光岡薫, 若林憲一, 石川尚, 稲葉一男, 昆隆英
2. 発表標題 クライオ電子線トモグラフィー法による光感受性ドメインを持つ新規ダイニン軽鎖局在決定
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryosuke Yamamoto, Yuuhei Nakagiri, Osamu Kutomi, Hiroshi Imai, Chihong Song, Kazuyoshi Murata, Ken-ichi Wakabayashi, Takashi Ishikawa, Kazuo Inaba, Takahide Kon
2. 発表標題 Structural/functional analyses on MOT7, a novel light chain of ciliary dynein f/I1
3. 学会等名 第57回 日本生物物理学会 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Yamamoto, Y. Nakagiri, O. Kutomi, H. Imai, C. Song, K. Murata, K. Mitsuoka, K. Wakabayashi, T. Ishikawa, K. Inaba, T. Kon
2. 発表標題 Cryo-electron tomography revealed localization of a novel ciliary dynein subunit, MOT7
3. 学会等名 生理研研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Connecticut Health Center			
スイス	Paul Scherrer Institute			
米国	Emory University			
米国	SUNY Upstate Medical University			