

令和元年5月27日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15123

研究課題名(和文)ノード繊毛特異的に繊毛打が失われるCFAP53の解析

研究課題名(英文)Analysis of Cfap53 that necessary for cilia motility in node

研究代表者

井手 隆広 (Ide, Takahiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：40777801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、軸系タンパク質Cfap53は運動性繊毛を持つ細胞で発現し、繊毛のProximal側に局在する軸系タンパク質であり、繊毛を駆動させる外腕ダイニンの構築には必須ではないが、ダイニンと軸系を強く結合させるタンパク質であることが分かった。また、Cfap53による結合力が無いと、外腕ダイニンは繊毛駆動力を発生できないことが明らかになった。ここからCfap53欠失マウスの気管では、活性化したダイニンの発生する力が軸系との結合力を上回ることで一部のダイニンで解離が起きるといった繊毛運動に関するモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Cfap53がダイニン及びダイニンドッキング複合体ではない、ダイニンの結合に寄与する軸系タンパク質であることが明らかになった。特に、気管繊毛では根元付近に局在し、これはダイニン重鎖Dnah11の局在と似ていることから繊毛構築に関する新たな局面を提供できるものと期待している。さらに、Cfap53欠失マウスの気管繊毛における、一部の外腕ダイニンが欠失するという特徴とダイニンの機能不全化は、繊毛運動の原動力となるダイニンのすべり力と根元を固定させる静的な力の比較を可能にする糸口になると考えている。

研究成果の概要(英文)：Cfap53 expressed in the cells which have motile cilia and localized on proximal region of tracheal cilia. This protein was not extract with 0.6 M NaCl in which outer arm dyneins, main power generator of cilia, were extracted. Outer arm dyneins were partially lost in 9+2 structures in Cfap53 mutant mice. Hence, Cfap53 is not necessary to dock outer arm dyneins on the axonemes, however boosts the binding affinity between axonemal doublet microtubules and outer arm dyneins. Furthermore, the outer arm dyneins cannot generated ciliary beating without Cfap53 protein in Cfap53 and Wdr63, the component of inner arm dyneins, double mutant mice. Therefore, we generated the model about outer arm dynein docking that the binding affinity of outer arm dyneins by contribution of Cfap53 is necessary for enduring dynein power stroke and achieving ciliary beating.

研究分野：生物学

キーワード：Cfap53 Ccdc11 ノード繊毛

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は外観では左右対称であるが、内部の臓器は左右非対称である。左右非対称性は、マウス胚を用いた研究により発生初期に一時的に形成される「ノード」で決定することが分かっている。ノードの細胞には長さ 2~5 μm のノード繊毛が 1 本ずつ生えており、時計回りの回転をすることで左右非対称な水流を起こし左側特異的な遺伝子の発現を誘導する (Nonaka et al., *Cell*, 1998)。このような体軸形成に必須なノード繊毛だが「なぜ回転運動なのか?」「なぜ時計回りなのか?」は、機能に関わる重要な課題であるが理解は不十分である。この時計回りの回転運動は、他の真核生物の繊毛・鞭毛の運動と比較して非常にユニークである。気管や卵管の繊毛は平泳ぎのような「繊毛型」を示し、精子の鞭毛は正弦波様の波が付け根から先端に向かう「鞭毛型」である。「繊毛型」「鞭毛型」の運動軌跡は 2 次元的であり、ノード繊毛の 3 次元的な回転運動とは明らかに異なる。この運動様式の違いは内部構造の違いによる (Shinohara et al., *Dev Cell*, 2015) と考えられている。しかし、申請者の以前の研究で扱っていたクラミドモナスのノード繊毛様構造になる変異体では運動ができなくなることや、ゼブラフィッシュの回転運動をする繊毛は 9+2 構造を持つ。これらの知見から内部構造の違いだけで、ノード繊毛の運動を説明することは不十分であると考えられる。

2. 研究の目的

哺乳類の左右を決める「ノード繊毛」は気管や精子の繊毛/鞭毛と比較して「運動の様式」や「内部構造」が大きく異なっている。これらのノード繊毛特有の特徴は、その機能に重要にもかかわらず、どのような仕組みで起こるのか分かっていない。本研究は、*Cfap53* (CCDC11; Coiled-Coil Domain Containing protein 11) という遺伝子に着目する。*Cfap53* のノックアウトマウスは、ノード繊毛でのみ繊毛が動かなくなるという興味深い形質を持つ。そこで *Cfap53* の解析によりノード繊毛に特異的な仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Cfap53* の組織・細胞内・繊毛内でどこに発現・局在しているかを調べるために *Cfap53*-LacZ、*Cfap53*::Venus をそれぞれ発現するマウスを作製した。また、繊毛を用いた生化学的な解析のために anti-*Cfap53* 抗体を作製し、繊毛の内部構造である軸系に対する結合性を評価した。

(2) *Cfap53* と繊毛内で相互作用するタンパク質などの因子の同定のため、気管から単離した繊毛に対しタンパク質を架橋し架橋産物に含まれているタンパク質を Immunoblot や質量分析を用いて解析を行った。

(3) *Cfap53* の欠失マウスでは、繊毛運動の低下がみられる。そこで、繊毛の原動力となるモータータンパク質の変化をノード・気管繊毛のそれぞれにおいて、間接蛍光抗体法と電子顕微鏡による観察を行った。

(4) (3)において一部の外腕ダイニンが残存していることが明らかになった。そこで、残存している外腕ダイニンが、繊毛を駆動する能力を有するかを一部の内腕ダイニン欠失マウスと二重欠失マウスを作製することで検討した。

4. 研究成果

(1) *Cfap53* は軸系を構成するタンパク質であり、気管では Proximal 側に存在する

Cfap53 は、Lac-Z をレポーターとする解析により気管・脳室・卵管や、発生初期胚のノードで発現していることが分かった。従って、*Cfap53* は運動性繊毛を持つ細胞で発現していることが明らかになった。気管・ノードにおいて、*Cfap53*::Venus を発現するトランスジェニックマウスを用いて、*Cfap53*-Venus タンパク質が繊毛内に局在していることが明らかになった。気管繊毛について詳細に局在を検討したところ、興味深いことに *Cfap53*-Venus は繊毛全体ではなく Proximal 側のみに局在していることが分かった (図 1)。さらに、繊毛内でのどのように存在しているかを明らかにするために、マウスの気管繊毛を単離し塩抽出実験を行った結果、*Cfap53* は外腕ダイニンが軸系から遊離する条件で軸系に残留した。従って、*Cfap53* は、外腕ダイニンのコンポーネントではなく、軸系に強く結合しているタンパク質であることが明らかになった。

これらを総合すると、*Cfap53* は運動性繊毛に発現するタンパク質であり、繊毛に輸送され軸系の構成成分となっていることが強く示唆された。

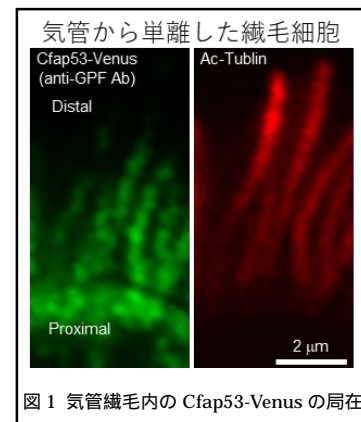


図 1 気管繊毛内の *Cfap53*-Venus の局在

(2) Cfap53 と相互作用するタンパク質の解析について

繊毛内で Cfap53 と相互作用するタンパク質の同定のため、単離繊毛ゼロリングス架橋剤 EDC による処理を行ったところ、架橋剤添加特異的に Cfap53 を含む約 130 kDa の架橋産物を得た(図 2)。架橋候補タンパク質として、外腕ダイニンの中間鎖 IC1、
、チュープリンを検討したが、いずれも架橋産物には含まれていなかった。架橋産物周辺の SDS-PAGE を用いた質量分析を行ったが、微量であることから架橋産物の同定には、至っていない。

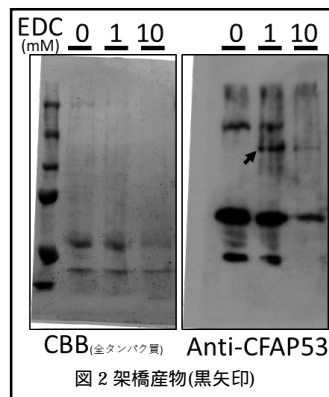


図 2 架橋産物(黒矢印)

(3) Cfap53 は外腕ダイニンと軸系との結合を高める

Cfap53 欠失マウスはノード繊毛では運動性が無くなるが、

気管繊毛では運動性を不十分ながら維持している。そこで繊毛運動の主な原動力となるモータータンパク質である外腕ダイニンの有無を間接蛍光抗体法で調べた。その結果ノード繊毛では外腕ダイニンが失われ、一方で気管繊毛では外腕ダイニンが存在していることが明らかになった。より詳細に調べるために、ノード、気管の繊毛の内部構造を電子顕微鏡で観察したところ、ノード繊毛では9本あるダブレット微小管のうち、ほとんどの微小管から外腕ダイニンが無くなっていった。一方で、気管繊毛では、3~5本のダブレット微小管から外腕ダイニンが消失しているにとどまっていた(図 3,4)。従って、*Cfap53* は外腕ダイニンの結合に必須ではないが、外腕ダイニンの軸系への結合の安定化には強い関与を持つタンパク質であることが分かった。

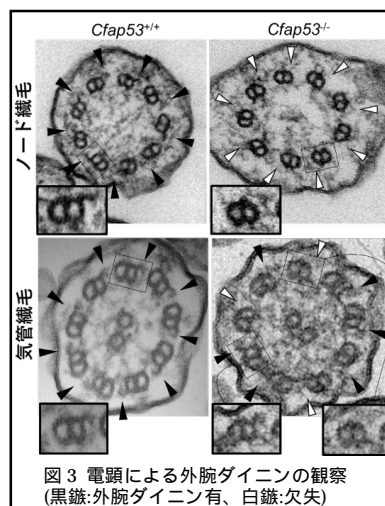


図 3 電顕による外腕ダイニンの観察 (黒鑑:外腕ダイニン有、白鑑:欠失)

(4) *Cfap53* 欠失マウスで残存する外腕ダイニン

には、繊毛運動を駆動する能力はない

Cfap53 欠失マウスの気管には外腕ダイニンが残存している。残存しているダイニンが、繊毛の運動に寄与しているかどうかを内腕ダイニン f の中間鎖 IC140 のマウスホモログである *Wdr63* との二重欠失変異マウスを作製し気管繊毛の運動性を検討した。繊毛は外腕・内腕のダイニンを同時に失うと繊毛運動ができなくなることが先行研究より知られている。*Cfap53*^{-/-}*Wdr63*^{-/-}のマウスは繊毛の Proximal 側の約半分で運動性を失っていた。運動性を失う範囲は *Cfap53* の局在と似ていることから、*Cfap53* の欠失は外腕ダイニンの結合性を低下させるだけでなく、軸系に残存している外腕ダイニンも繊毛を駆動する力を失っていると考えられる。

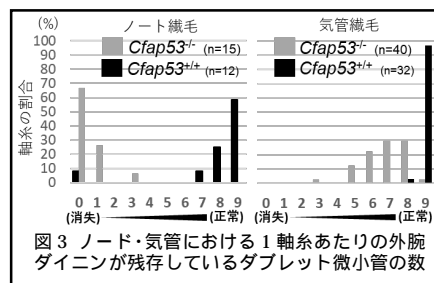


図 3 ノード・気管における 1 軸あたり外腕ダイニンが残存しているダブレット微小管の数

以上のことから本研究により、*Cfap53* について次のことが明らかになった。

- Cfap53* は運動性繊毛を持つ細胞で発現し、繊毛の Proximal 側に局在する
- Cfap53* は繊毛を駆動させる外腕ダイニンを軸系強く結合させるタンパク質である
- Cfap53* による結合力が無いと、外腕ダイニンの繊毛駆動力を発生できない

運動中の繊毛内部では、「繊毛型」の場合 9本のダブレット微小管のうち 2~3個に結合しているダイニンが活性化していると考えられている。*Cfap53* 欠失マウスの気管では、この活性化したダイニンの発生する力が、軸系との結合力を上回るのでダイニンの解離が一部で起きるといモデルを考えている。このモデルをノード繊毛に適用すると、ノード繊毛ではすべてのダイニンが力を発生することになり、これは「回転運動」時に 9組のダイニンが順々活性化することの間接的な示唆となると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Wang Twan, Takahiro Ide, Nicole Henninger, Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada
第 41 回 日本分子生物学会年 (2018, 横浜)
井手隆広, Wang Twan, Nicole Henninger, 白鳥秀卓, 濱田博司

2018年 生体運動研究合同班会議 (2018, 東京)

井手 隆広

兵庫県立こども病院-CDB 第2回ジョイントシンポジウム (2017, 神戸)

Takahiro Ide, Wang Twan, Nicole Henninger, Hidetaka Shiratori, Hiroshi Hamada
International Workshop - Dynein 2017 (2017, 神戸, 国際学会)

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

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。