

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06099

研究課題名(和文) 繊毛形成に必須な多サブユニット複合体IFT-Bコアの結晶構造解析

研究課題名(英文) Crystal structure analysis of multi-subunit IFT-B core complex involved in ciliogenesis

研究代表者

川崎 政人 (Kawasaki, Masato)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：00342600

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)：IFT-B複合体は繊毛内の軸系微小管に沿った順行輸送を担う。SUMOタグを利用した多サブユニット共発現系を用いてIFT-B複合体の16サブユニットの中からIFT74-81複合体、IFT22-74-81複合体について発現量の高いコンストラクトを得ることに成功し、大腸菌で共発現、精製し結晶化スクリーニングを行った。しかし、精製した複合体は数日間で分解が進行し、結晶が得られることはなかった。そこでクライオ電子顕微鏡を用いて、複合体を精製直後に凍結し測定したところ、分解前と考えられる棒状の粒子を確認することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のSUMOタグを利用した共発現系によって、発現の困難だった多サブユニット複合体の発現が可能になった。この手法はX線結晶構造解析だけでなくクライオ電子顕微鏡単粒子解析にも有効である。

研究成果の概要(英文)：The Intraflagellar transport (IFT)-B complex is involved in anterograde ciliary trafficking along the axoneme. Among 16 subunits of the IFT-B complex, IFT74-81 and IFT22-74-81 subcomplexes have been successfully expressed in *E. coli* using SUMO-tag and coexpression system. However, crystallization trials of the purified subcomplexes failed because of rapid protein degradation within a few days. By quick sample freezing after purification, a rod-like structure of IFT74-81 subcomplex was observed by cryo-EM single particle analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：繊毛内輸送 多サブユニット複合体 結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鞭毛・繊毛は細胞の運動器官であるだけでなく、感覚器官としても重要な役割を果たしている。特に、運動機能を持たない一次繊毛は、真核生物のほぼすべての細胞に存在し、外界の情報を感知するアンテナ機能に特化したオルガネラである。一次繊毛の形成が正常に起こらないと、発生段階で必要な細胞外からのシグナルを受容出来なくなり、繊毛病と呼ばれる重篤な疾患を引き起こす。

外界の情報を感知するために、繊毛内部には様々なシグナル受容体が運び込まれている。シグナル受容体の繊毛内への輸送は、IFT (intraflagellar transport) 装置と呼ばれる巨大なタンパク質複合体がモータータンパク質と結合して軸系微小管に沿って移動することで達成されている。IFT 装置は、いずれも多サブユニット複合体である IFT-A 複合体、IFT-B 複合体、BBSome から構成される。IFT-B 複合体がキネシン 2 と結合することで、IFT 装置とシグナル受容体は繊毛の根元から先端まで順行輸送され、一方 IFT-A 複合体がダイニン 2 と結合することで先端から根元へ逆行輸送される。シグナル受容体は IFT 複合体に結合した BBSome を介して繊毛内へと運ばれる。IFT 装置を構成するヒトの遺伝子に変異が生じると正常な繊毛形成が起こらず、繊毛病を発症する。

IFT 装置は細胞内の輸送小胞コートタンパク質とドメイン構成に共通点 (TPR などのソレノイド構造、プロペラ構造、GTPase ドメインなど) があり、両者は共通の祖先タンパク質から進化して来たと考えられている。しかし、繊毛内輸送は輸送小胞を介さないため、IFT 装置は小胞を覆うかご状のコートではなく、ラフト状の平板なコート様の形状を取る可能性が考えられるがその全体構造は未知である。

### 2. 研究の目的

IFT 装置の全体構造を解明するため、その中核部分から構造解析に着手する。IFT 装置は IFT-A 複合体、IFT-B 複合体、BBSome から構成されており、IFT-B 複合体は順行輸送を担う部分である。クラミドモナスの鞭毛から単離された IFT-B 複合体は高塩濃度で IFT-B コア複合体と IFT-B ペリフェラル複合体に解離する。IFT-B コア複合体はチューブリン結合ドメインを持ち、軸系微小管の伸長にも重要な部分と考えられる。本研究は IFT-B 複合体の機能と構造の中核となる IFT-B コア複合体の立体構造解析を目的とする。

### 3. 研究の方法

IFT-B コア複合体は 10 サブユニットから成る約 530 kDa のタンパク質複合体である。本研究では、研究代表者の改良した SUMO タグを利用した多サブユニット共発現系と、研究協力者の開発した VIP (visible immunoprecipitation assay) アッセイに基づく立体構造の均一化を組み合わせることで、多サブユニット複合体の結晶構造解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) SUMO タグを利用した多サブユニット共発現系の構築

最初に大腸菌共発現系 MultiBac を用いてヒト IFT-B コア複合体の 10 サブユニットすべての共発現系を構築したが、ほとんど発現が認められなかった。しかし、発現を促進するために SUMO タンパク質と個々のサブユニットを融合することで、発現量が飛躍的に上昇することを見出し、IFT-B コア複合体を精製することが可能になった。VIP アッセイに基づいて相互作用するサブユニットを組み合わせると同時に、二次構造予測に基づきフレキシブルな領域をできるだけ削除し、安定で均一な部分複合体を取り出すことを試みた。

#### (2) IFT74-81 および IFT22-74-81 複合体の精製と結晶化

IFT-B コア複合体はコア 1 とコア 2 に大きく分割される (図 1)。IFT-B コア 1 のうち、IFT74 と IFT81 はコイルドコイル 2 量体を形成し、コア 1 の中心的骨格となると予想される。IFT74 と IFT81 の N 末端側の約 100 アミノ酸および C 末端側の約 60 アミノ酸のフレキシブルな領域を削除して共発現させることで、大腸菌で可溶性画分に発現する量が大幅に上昇することを見出した (図 2)。VIP アッセイに基づいて IFT22 と共発現させることで、IFT22-74-81 の三者複合体の精製にも成功した (図 2)。得られたサンプルを用いて結晶化スクリーニングを行った。しかし、精製した複合体は数日間で分解が進行し、結晶が得られることはなかった。

#### (3) IFT74-81 複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析

精製サンプルが数日間で分解してしまうことから、結晶化に時間を要する結晶構造解析は困難と考えられた。そこでクライオ電子顕微鏡を用いて、複合体を精製直後に凍結し測定したところ、分解前と考えられる棒状の粒子を確認することが出来た。画像の二次元クラス分類で得られた棒状の粒子を選択し (図 3)、三次元モデルを作成したところ、長さ 110 程度で一部枝分かれしたような棒状のマップが得られた (図 4)。

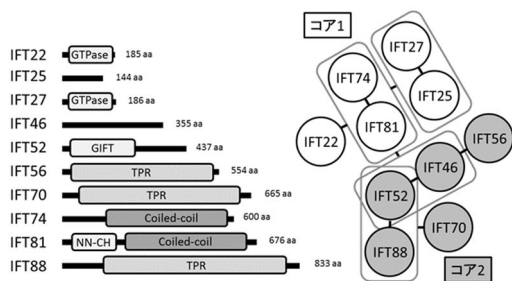


図1 IFT-Bコア複合体サブユニットのドメイン構造(左)とVIPアッセイによるIFT-Bコア複合体の相互作用マップ(右)

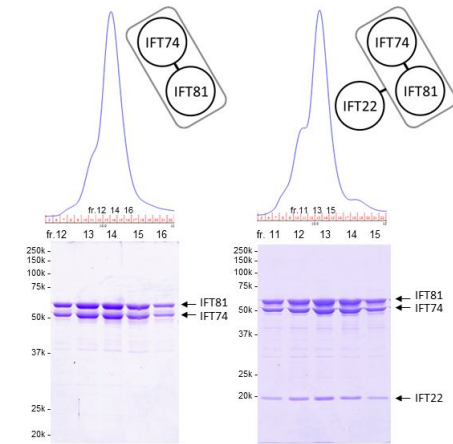


図2 MultiColi発現系により発現した複合体のゲルろ過プロファイル(上)とそのSDS-PAGE(下)  
(左)IFT74-81複合体。(右)IFT22-74-81複合体



図3 IFT74-81複合体のクライオ電顕二次元平均画像

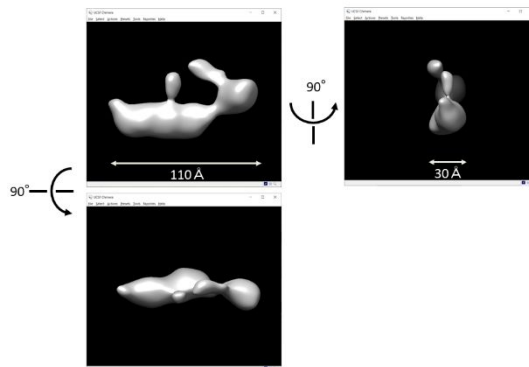


図4 IFT74-81複合体のクライオ電顕三次元マップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	中山 和久  (Nakayama Kazuhisa)  (40192679)	京都大学・薬学研究科・教授    (14301)	
研究協力者	加藤 洋平  (Katoh Yohei)  (90568172)	京都大学・薬学研究科・助教    (14301)	

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