

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23726

研究課題名(和文) 微小管内タンパク質のチューブリン格子構造構築への影響の解明

研究課題名(英文) Elucidating the effects of microtubule inner proteins on the architecture of the tubulin lattice.

研究代表者

市川 宗蔵 (Ichikawa, Muneyoshi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80844662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛由来のダブルレット微小管の立体構造をクライオ電子顕微鏡を用いて高分解能で明らかにすることで、その内部の微小管内タンパク質の構造の詳細を明らかにした。微小管内タンパク質を一部失ったチューブリン格子と比較することで、微小管内タンパク質がチューブリン格子を安定な伸長型の構造に固定することがわかった。また、プロトフィラメント間の角度を変化させることもわかった。質量分析によってこれらの構造に対応するタンパク質についても複数同定し、そのX線結晶構造についても得た。また、チューブリンとの共重合の結果から、微小管内タンパク質が内側からチューブリン格子構造の構築に与える影響について明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繊毛はヒトの体内においても多彩な機能を担う重要な構造体である。気管の上皮でウイルスなどの異物を除去するなど重要な機能を担っている。繊毛は1秒間に数十回波打つために安定かつしなやかな性質をもつが、繊毛がどのようにしてこのような特性を得ているかはわかっていなかった。本研究では、繊毛内のダブルレット微小管がどのようにして安定化されるかを初めて示すことができた。これは、ヒトの繊毛病の病態が引き起こされる機構の理解や、将来的にはその治療にも応用できる可能性のある重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：By obtaining high resolution structures of the doublet microtubule from cilia, detailed binding schemes of the microtubule inner proteins (MIPs) to the tubulin lattice have been revealed. By comparing the tubulin lattice with intact MIPs with the one with some MIPs missing, it was shown that the MIPs fix the tubulin lattice length into the stable elongated conformation. MIPs were also shown to change the angles between the protofilaments. Some of the protein identities of these MIPs were identified by mass spectrometry and X-ray crystal structures were obtained. Co-polymerization experiments of the MIP proteins and tubulins were also performed and the effects of the MIPs on the tubulin lattice formation from the inside have also been revealed.

研究分野：構造生命科学・生物物理学

キーワード：繊毛 ダブルレット微小管 微小管内タンパク質 クライオ電子顕微鏡 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

真核生物の繊毛は、細胞外の水流を発生させたり、細胞外のシグナルを細胞内へと伝えるアンテナとしての役割を担う重要なオルガネラである。運動能をもつ繊毛の内部構造は、中心対複合体を9本のダブルレット微小管が取り囲んだ構造をとっている。ダブルレット微小管はA小管とB小管からなる微小管構造であり、繊毛に機械的強度を与えていると考えられている。ダブルレット微小管は安定な微小管構造であるが、その安定化機構は十分解明されていなかった。繊毛のダブルレット微小管の構造は主にクライオ電子線トモグラフィ法を用いて約30-40 Å程度の分解能で得られてきた(Bui et al., 2012, JCB; Oda et al., 2014, Science)。これらの結果から、ダブルレット微小管のチューブリン格子内には、微小管内タンパク質 (Microtubule Inner Proteins, MIPs) が結合していることが明らかになった。私は、繊毛虫テトラヒメナ由来のダブルレット微小管の分解能を先行研究から大幅に向上し、MIPsを含むダブルレット微小管の構造を8.6 Åのサブナノメートルの分解能で初めて得た(Ichikawa et al., 2017, Nature Communications)。この結果から、ダブルレット微小管内にこれまで見出されていたよりも多くのMIPs構造が存在することが明らかになった。ダブルレット微小管はMIPs構造を持たないシングルレット微小管と比較して非常に安定であるため、これらのMIPs構造のネットワークがチューブリン格子構造を内側から安定化していると考えられた。また、ダブルレット微小管のチューブリン格子構造は、均一なシングルレット微小管とは異なり、歪んだ不均一な構造をとっている。これらの結果は、MIPsの結合がチューブリン格子構造の構築に内側から影響していることを示唆した。しかしながら、MIPsによるチューブリン格子構造の構築への影響の詳細を明らかにするためにはさらに高分解能で構造解析を行うことが必要であった。また、MIPs構造のタンパク質実体、そして個々のMIPタンパク質の機能の理解は不十分であった。

2. 研究の目的

以下のように研究を行うことで、MIPタンパク質のチューブリン格子への結合様式と、その安定性・構築への影響を解明することを目的とした。

- (1) ダブルレット微小管の構造を高分解能で得ることで、MIPsがチューブリンにどのように結合しているかの詳細を明らかにする。
- (2) MIPsによるダブルレット微小管の安定化機構についても示唆を得る。
- (3) 各MIPタンパク質の候補を同定し、ダブルレット微小管構造内での各MIPタンパク質の位置同定を行う。
- (4) 同定した各MIPタンパク質のチューブリン格子構築への影響を調べるとともに、高分解能の立体構造を得る。

3. 研究の方法

- (1) ダブルレット微小管全体の構造については、テトラヒメナ繊毛からダブルレット微小管を単離し、クライオ電子顕微鏡法による単粒子解析を用いて構造解析を行うことでその高分解能の立体構造を得る。
- (2) ダブルレット微小管を、超音波破碎または界面活性剤(0.2% Sarkosyl)で処理し、これらの処理がダブルレット微小管に与える影響からMIPsによるチューブリン格子構造の安定化機構についての示唆を得る。
- (3) 単離したダブルレット微小管を質量分析法によって解析を行うことで、MIPタンパク質の候補を同定し、クライオ電子顕微鏡構造内で構造モデリングすることでその構造モデルを得る。
- (4) 得られたMIPタンパク質の候補については大腸菌で発現・精製し、チューブリンとの共重合を行う。また、精製したタンパク質の結晶化を行い、X線結晶構造を得る。

4. 研究成果

- (1) 繊毛虫テトラヒメナから繊毛を精製し、さらにダブルレット微小管を単離した。単離したダブルレット微小管がランダムな配向をとるように超音波破碎で細断した上で氷包埋した。氷包埋したクライオグリッドをクライオ電子顕微鏡で撮像し、構造解析用の電頭像を7,838枚分撮像した。得られた電頭像からダブルレット微小管を切り出し、SPIDER, FREALIGN, RELIONなどの構造解析ソフトを用いた構造解析を行った。これにより、これまで得られていたダブルレット微小管の

構造から分解能をさらに向上し、ダブルレット微小管のチューブリン格子及びその内部の MIPs 構造を、4.7 Å という高分解能で立体構造を得ることができた(図 1A)。得られた構造を注意深く調べたところ、微小管内タンパク質は、チューブリン格子内で複雑なネットワークを形成していた(図 1B)。A 小管と B 小管を比較したところ、A 小管の方が B 小管に比べてより多くの MIPs 構造が存在していた。さらに、ダブルレット微小管のプロトフィラメント間の角度を測定したところ、非常に大きな角度分布を示した。また、ダブルレット微小管のチューブリンダイマー間の長軸方向の長さは、シングレット微小管の GTP 加水分解前の伸長型に近い値を示した。

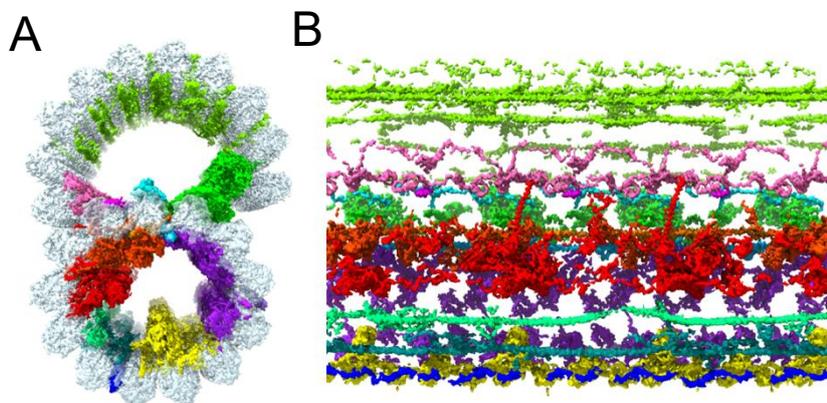


図 1. ダブルレット微小管のクライオ電子顕微鏡構造。
A. ダブルレット微小管の全体構造。
B. MIPs 領域の構造。

(2) ダブルレット微小管の細断化の際にソニケーション処理をした際、物理的刺激によって B 小管側が壊れた A 小管のみの構造体も得られていた(図 2)。また、0.2%の界面活性剤 Sarkosyl で処理した場合でも、B 小管側が先に壊れ始め、A 小管のみの構造体を得られた。A 小管の方が B 小管に比較してより複雑な MIPs 構造のネットワークを有していた結果と合わせて考察すると、MIPs 構造のネットワークの存在がチューブリン格子構造を内側から裏打ちして安定化していると考えられる。

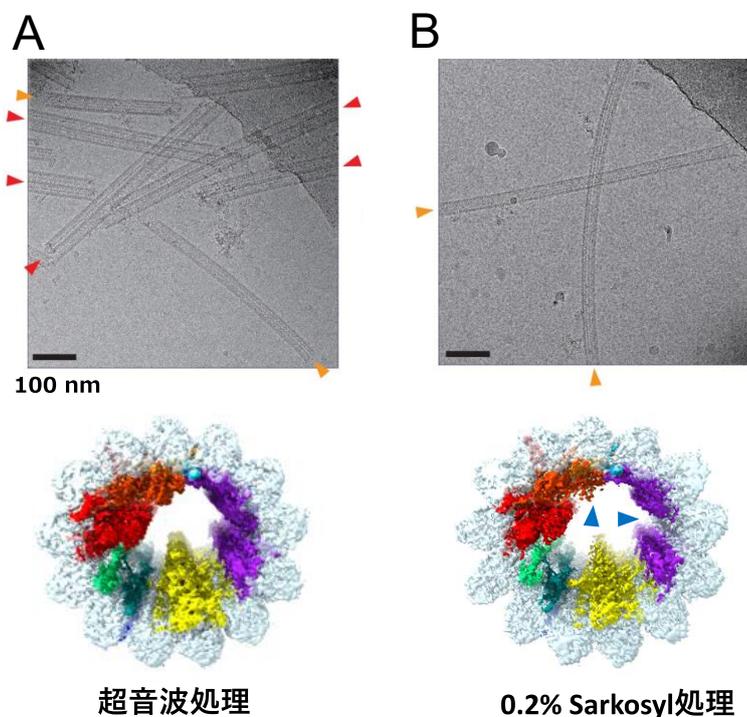


図 2. A 小管のみのクライオ電子顕微鏡構造。

A. 超音波破碎後のダブルレット微小管(赤矢頭)及びA小管(オレンジの矢頭)のクライオ電顕像及び、構造解析で得た超音波破碎後のA小管の立体構造。
B. 0.2% Sarkosyl 処理で得たA小管の電顕像(オレンジの矢頭)及び構造解析で得た立体構造。青矢頭の部分のMIPs構造が失われていた。

これらの二種類の方法で得た A 小管のクライオ電顕像を用いて構造解析を行い、二種類の異なる A 小管の立体構造を得た。当初予想しなかった副次的な結果として、Sarkosyl 処理で得た A 小管では、いくつかの MIPs 構造が失われていた(図 2B)。これらの MIPs が失われていた領域では、隣接するプロトフィラメント間の角度がダブルレット微小管と比較して有意に変化していることがわかった。超音波処理で得た MIPs を保持した A 小管では、このようなプロトフィラメントの角度変化は起きていなかった。また、長軸方向のチューブリン間距離を比較したところ、MIPs を保持していた A 小管では、インタクトなダブルレット微小管に近い伸長型の構造を取っていたのに対し、Sarkosyl 処理したいくつかの MIPs 構造を失ったダブルレット微小管では、GTP 加水分解後の GDP 状態に近い短縮型の距離をとっていた。短縮型のチューブリン格子は、不安定な微小管構造に対応しているため、MIPs を失ったチューブリン格子構造は不安定になっていると考えられる。これらの結果から、MIPs はチューブリン格子構造の構築を内側から制御しており、さらに、チューブリン格子構造を安定な伸長型の構造に固定することで、先端からのチューブリンの脱重合を防いでいると示すことができた。ここまでの内容を投稿論文として発表した。これらの結果は MIPs によるチューブリンの格子構造を直接内側から制御していることを世界に先駆けて示したものであり、当該分野に大きなインパクトを与えるものである。

(3) MIPs タンパク質の候補を同定するため、繊毛の微小管画分を質量分析で解析を試みた。テトラヒメナの繊毛を用いて質量分析を行おうとしたところ、ムコシスト(粘液胞)由来のタンパク質のコンタミネーションが多かったため、クラミドモナスの鞭毛を pH ショック法によって得た。得られた鞭毛を脱膜して泳動し、全タンパク質を一つのバンドとして切り出し、質量分析で解析した。得られた微小管画分は、ダブルレット微小管由来のタンパク質と、中心対複合体由来のタンパク質の両方を含んでいたため、中心対複合体を持たないクラミドモナス変異株の微小管画分の質量分析の結果と比較することで、ダブルレット微小管由来のタンパク質候補を絞り込んだ。また、クラミドモナス由来のダブルレット微小管についても氷包埋し、クライオ電子顕微鏡法による単粒子解析で構造解析を行うことで、ダブルレット微小管の B 小管が閉じる領域(インナージャンクション領域)の構造を 3.9 Å の分解能で得た。クライオ電子顕微鏡法で得た高分解能のタンパク質構造と質量分析によって得たタンパク質候補を比較することで、高分解能のインナージャンクション領域内で各タンパク質をモデリングしていき、インナージャンクション領域の原子モデルを構築した(図 3)。これらの結果について投稿論文として報告した。チューブリンの翻訳後修飾が MIPs の結合に関与するという新たな知見についても得ることができた。今後、これらの翻訳後修飾と MIPs 結合の関係についても新たな研究を進展することが可能であろう。また、当初は予想していなかった副次的な結果として、中心対複合体をもつ野生株クラミドモナスの質量分析の結果と、中心対複合体を持たない変異株クラミドモナスの質量分析の結果を比較することで、新たな中心対複合体タンパク質を複数同定することができた。これらの結果についても、別の投稿論文として報告した。

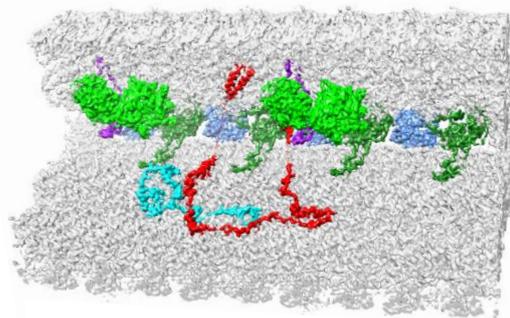


図 3. インナージャンクション領域の構造モデル.

(4) 上記の質量分析の結果同定した MIPs タンパク質のうちいくつかを大腸菌で発現し精製を行った。精製したタンパク質をチューブリンと共重合し、電子顕微鏡で観察することで、そのチューブリン格子構築への影響を調べた。これらの内容について学会発表を行った。また、MIPs タンパク質の結晶化を試みた。このうち、PACRG の X 線結晶構造が MEIG1 タンパク質との共結晶として得られ、2.1 Å 分解能という高分解能でその立体構造を得ることができた。蛍光観察による結果と合わせて、PACRG-MEIG1 がチューブリンをリクルートする機構について明らかにし、これらの内容について投稿論文として報告した。これは、ダブルレット微小管の構築機構に踏み込んだ結果であり、大きな意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Khan Nimra, Pelletier Dylan, McAlear Thomas S., Croteau Nathalie, Veyron Simon, Bayne Andrew N., Black Corbin, Ichikawa Muneyoshi, Khalifa Ahmad Abdelzاهر Zaki, Chaaban Sami, Kurinov Igor, Brouhard Gary, Bechstedt Susanne, Bui Khanh Huy, Trempe Jean-Francois	4. 巻 -
2. 論文標題 Crystal structure of human PACRG in complex with MEIG1 reveals roles in axoneme formation and tubulin binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2021.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 YAGI Toshiki, TODA Akiyuki, ICHIKAWA Muneyoshi, KURISU Genji	4. 巻 61
2. 論文標題 織毛ダイニン軽鎖と重鎖微小管結合部位の 複合体構造 見えてきた軽鎖LC1の役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 020 ~ 022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.020	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 -

1. 著者名 Daniel Dai, Muneyoshi Ichikawa, Katya Peri, Reid Rebinsky, Khanh Huy Bui	4. 巻 17
2. 論文標題 Identification and mapping of central pair proteins by proteomic analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bsj-2019048	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 Ichikawa Muneyoshi, Khalifa Ahmad Abdelzاهر Zaki, Kubo Shintaroh, Dai Daniel, Basu Kaustuv, Maghrebi Mohammad Amin Faghfor, Vargas Javier, Bui Khanh Huy	4. 巻 116
2. 論文標題 Tubulin lattice in cilia is in a stressed form regulated by microtubule inner proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 19930 ~ 19938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1911119116	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 Khalifa Ahmad Abdelzاهر Zaki, Ichikawa Muneyoshi, Dai Daniel, Kubo Shintaroh, Black Corbin Steven, Peri Katya, McAlear Thomas S, Veyron Simon, Yang Shun Kai, Vargas Javier, Bechstedt Susanne, Trempe Jean-Francois, Bui Khanh Huy	4. 巻 9
2. 論文標題 The inner junction complex of the cilia is an interaction hub that involves tubulin post-translational modifications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.52760	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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Shintaroh Kubo, Ahmad Khalifa, Muneyoshi Ichikawa, Daniel Dai, Corbin Black, Katya Peri, Shun Kai Yang, Jaiver Vargas, Khanh-Huy Bui
2. 発表標題 How Rib43a and Acetylation of K40 control the rigidity of Microtubules
3. 学会等名 65th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Muneyoshi Ichikawa
2. 発表標題 Remodeling and activation mechanisms of outer arm dynein revealed by cryo-EM
3. 学会等名 18th BSCB GenSoc UK Cilia Network e-symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shintaroh Kubo, Ahmad Khalifa, Muneyoshi Ichikawa, Daniel Dai, Corbin Black, Katya Peri, Shun Kai Yang, Jaiver Vargas, Khanh-Huy Bui
2. 発表標題 How Rib43a and Acetylation of K40 control the rigidity of Microtubules
3. 学会等名 EMBO WORKSHOP (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川宗蔵
2. 発表標題 ダブルレット微小管上での外腕ダイニンの高分解能構造
3. 学会等名 第10回分子モーター討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Muneyoshi Ichikawa, Ahmad Khalifa, Daniel Dai, Shintaroh Kubo, Corbin Black, Katya Peri, Thomas McAlear, Simon Veyron, Shun Kai Yang, Javier Vargas, Susanne Bechstedt, Jean-Francois Trempe, Khanh Huy Bui
2. 発表標題 Cryo-EM revealed unique and diverse binding schemes of the microtubule inner proteins at the inner junction region of cilia
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshitoki Shibao, Corbin Black, Muneyoshi Ichikawa, Junya Kirima, Kazuhiro Oiwa, Khanh Huy Bui, Tomoya Tsukazaki
2. 発表標題 Characterization of properties of microtubule inner protein FAP85.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Muneyoshi Ichikawa, Ahmad Khalifa, Daniel Dai, Shintaroh Kubo, Corbin Black, Katya Peri, Thomas McAlear, Simon Veyron, Shun Kai Yang, Javier Vargas, Susanne Bechstedt, Jean-Francois Trempe, Khanh Huy Bui
2. 発表標題 クライオ電顕によるダブルレット微小管の近原子分解能構造
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会 日本 - カナダ 二国間交流シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川 宗蔵 , Khalifa Ahmad Abdelzاهر Zaki , 久保 進太郎 , Basu Kaustuv, Daniel Dai , Amin Maghrebi , Javier Vargas , Bui Khanh Huy
2. 発表標題 微小管内タンパク質によるチューブリン格子構造の内側からの制御
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 Ichikawa Muneyoshi、Khalifa Ahmad Abdelzاهر Zaki、Kubo Shintaroh、Dai Daniel、Basu Kaustuv、Maghrebi Mohammad Amin Faghfor、Vargas Javier、Bui Khanh Huy
2. 発表標題 Microtubule Inner Proteins Weave Into The Doublet Microtubule Tubulin Lattice
3. 学会等名 2019 ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dai Daniel , Ichikawa Muneyoshi , Peri Katya, Rebinsky Reid, Bui Khanh Huy
2. 発表標題 Identifying and Mapping the Protein Composition of the Central Pair Apparatus through Proteomics
3. 学会等名 2019 ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Khalifa Ahmad Abdelzاهر Zaki、Ichikawa Muneyoshi、Dai Daniel、Kubo Shintaroh、Black Corbin Steven、Peri Katya、McAlear Thomas S、Veyron Simon、Yang Shun Kai、Vargas Javier、Bechstедt Susanne、Trempe Jean-Francois、Bui Khanh Huy
2. 発表標題 The inner junction complex of the cilia is an interaction hub that involves tubulin post-translational modifications.
3. 学会等名 64th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース
<http://www.naist.jp/pressrelease/2019/09/006167.html>

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			
カナダ	McGill大学			