

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570189

研究課題名(和文) 鞭毛・繊毛運動機構におけるチューブリン・ポリグルタミル化の機能

研究課題名(英文) Function of tubulin polyglutamylation in cilia/flagella motility mechanism

研究代表者

神谷 律 (Kamiya, Ritsu)

学習院大学・理学部・客員教授

研究者番号：10124314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：鞭毛・繊毛運動機構におけるチューブリン・ポリグルタミル酸化修飾の役割を解明するため、修飾酵素TTLL9を欠失している長鎖グルタミン酸化の修飾ができないクラミドモナス突然変異株tpg1を用いて実験を行った。多数のダイニン分子種欠損変異株とtpg1の二重変異株の解析から、長鎖グルタミン酸化は、10種以上存在する軸系ダイニンのうち内腕ダイニンeと呼ばれる特定の分子種の運動性だけに大きな影響を与えることが明らかになった。さらに、別種の変異株tpg2を単離し、その解析からFAP234というタンパク質がTTLL9の輸送と安定化に関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To approach the function of tubulin polyglutamylation in cilia/flagella motility, we examined the motile properties of a Chlamydomonas tpg1, a mutant that lacks a tubulin polyglutamylation enzyme (TTLL9). Motility analyses in double mutants between tpg1 and various kinds of dynein-deficient mutants revealed that long-chain tubulin polyglutamylation affects the function of only one particular species of dynein, inner arm dynein e, among more than 10 species of axonemal dyneins. Furthermore, studies using another mutant, tpg2, showed that a protein designated FAP234 functions in the transport and stabilization of TTLL9.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：運動・輸送 分子モーター 翻訳後修飾 鞭毛・繊毛 微小管

研究開始当初の背景

チューブリンポリグルタミン酸化は、微小管機能を調節する翻訳後修飾として知られている。神経や鞭毛繊毛に多く見られ、修飾の程度によって微小管結合タンパク質との相互作用が変化することが示されている。また繊毛では、ポリグルタミン酸化欠損により、形成不全が起こることも知られていた。

われわれは鞭毛繊毛研究のモデル生物であるクラミドモナスにおいて、ポリグルタミル酸化酵素の1つ TTLL9 を欠損した突然変異株 *tpg1* を単離し、その株では軸系内腕ダイニンの機能が異常になるために鞭毛運動性が低下することを報告した(Kubo et al, Curr. Biol. 20, 441-445, 2010)。ポリグルタミン酸化が内腕ダイニンに特異的に影響を与えることは、他の生物では全く知られていなかった。TTLL9 は鞭毛繊毛を持つ生物に広く存在するので、この現象は真核生物の鞭毛繊毛運動調節機構として、一般的な重要性があると考えられる。

2. 研究の目的

チューブリンポリグルタミン酸化がダイニンの機能調節を通して鞭毛運動に影響を与える機構を解明するため、以下の問題にとりくんだ。また、ポリグルタミル酸化酵素と結合する新規タンパク質が発見されたため、そのタンパク質の挙動の検討も目的に加えた。

- (1) チューブリンポリグルタミン酸化修飾の程度と鞭毛運動性の関係の検討
- (2) チューブリンポリグルタミン酸化修飾が各種ダイニン重鎖におよぼす影響の検討
- (3) チューブリンポリグルタミン酸化がダイニン調節複合体(DRC)に及ぼす影響の検討
- (4) チューブリンポリグルタミン酸化酵素 TTLL9 と相互作用する軸系内タンパク質 FAP234 の性質の検討

3. 研究の方法

- (1) ポリグルタミン酸化修飾と運動性の関係

TTLL9 欠損変異株 *tpg1* とダイニン外腕欠損変異株 *oda2* の2重変異株を TTLL9 発現ベクターで形質変換し、さまざまな程度のチューブリン修飾を示す株を得た。それらの株の運動性をビデオ記録して解析した。*oda2* との2重変異株を用いたのは、チューブリン修飾の影響を鋭敏に検出するためである。

- (2) 各種ダイニンに及ぼす影響の検討

クラミドモナスには1種の外腕ダイニン(3種の重鎖を含む)と7種の内腕ダイニン(8種の重鎖を含む)があり、それらをさまざまな組み合わせで欠失した変異株が得られている。それらの株と *tpg1* の2重変異株を作製し、その運動性を調べることにより、各種ダイニン重鎖に及ぼすチューブリンポリグルタミン酸化修飾の影響を検討した。外

腕欠失変異株との2重変異株については以前報告したが、今回は現在知られている内腕ダイニン欠失変異株すべてを用いた。内腕ダイニンには分子種 a~g の7種があり、そのうち f だけが2本の重鎖、他は1本の重鎖を持つ。用いた変異株は次のとおりである：*ida1* (f を欠失)、*ida4* (a, c, d 欠失)、*ida5* (a, c, d, e 欠失)、*ida6* (e 欠失)、*ida9* (c 欠失)。

- (3) ダイニンの機能を調節している複合体(DRC)に対する影響

DRC の機能を失っている変異株4種(*pf2*, *pf3*, *sup-pf-3*, *sup-pf-4*)と *tpg1* の2重変異株の運動性を検討して、DRC に対する影響を評価した。

- (4) TTLL9 と相互作用するタンパク質 FAP234 の挙動の解析

tpg1 類似の表現形を示す新規突然変異株を単離し、その原因遺伝子が FAP234 と呼ばれるタンパク質をコードしていることをつきとめた。抗体を作製し、超遠心分析、間接蛍光抗体法観察などにより、FAP234 の局在と TTLL9 との結合性を解析した。

4. 研究成果

- (1) ポリグルタミン酸化修飾と運動性の関係

TTLL9 の発現と軸系チューブリンのポリグルタミン酸化のレベルが異なる形質転換株5種について、軸系微小管のポリグルタミル酸化の程度と細胞遊泳速度の相関を検討した。この実験で用いた *tpg1oda2* という2重変異株は、長鎖ポリグルタミン酸化修飾の欠失がある上にダイニン外腕を持たないので、鞭毛運動を全く行えない。しかしその形質転換株は、チューブリンポリグルタミン酸化修飾の回復と並行して運動性を示すようになった。この実験結果は、チューブリン修飾は鞭毛運動機能を連続的に変化させることができることを意味している。すなわち、チューブリン修飾は鞭毛繊毛運動のアナログ調節機構としてはたらいっている可能性が強く示される。

- (2) チューブリンポリグルタミン酸化修飾が各種ダイニン重鎖におよぼす影響の検討

軸系内に存在する多数のダイニン重鎖がそれぞれチューブリン修飾によってどのような影響を受けるかを調べるため、まず鞭毛軸系から調整したチューブリンを試験管内で重合させ、単離したダイニンによる *in vitro motility* 検定法で運動性を検討する試みを行った。しかし、鞭毛軸系からのチューブリン調製が技術的に困難であることが判明し、この計画は実行に至らなかった。

次に、各種ダイニンを欠失している突然変異株と *tpg1* の2重変異株を作製し、それらの運動性からポリグルタミン酸化修飾の各種ダイニンに及ぼす効果を間接的に評価す

る実験を行った。その結果、ダイニン e を欠失している突然変異株 (*ida5*, *ida6*) では *tpg1* 変異の有無による運動性の変化がほとんど現れないという、思いがけない結果が得られた。この結果は、ダイニン e がチューブリンポリグルタミン酸化修飾によって最も大きく影響を受けるダイニンであることを示唆する。ダイニン e 重鎖の微小管結合部は、全ダイニン中最も塩基性であり、酸性のポリグルタミン酸側鎖と強い静電相互作用を行う可能性がある。

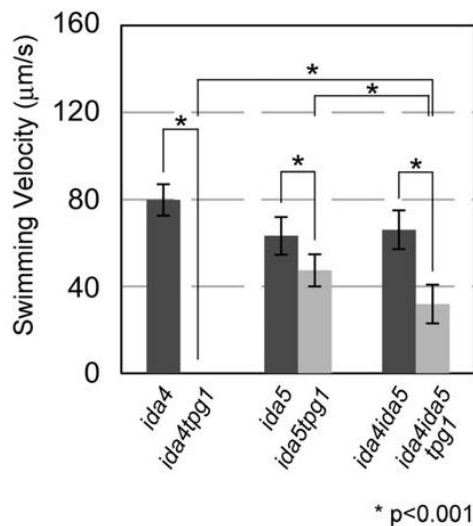


図1. 内腕ダイニン欠失変異株 *ida4*, *ida5* の運動性に対する *tpg1* 変異の影響。 *ida4* はダイニン a, c, d, *ida5* はダイニン a, c, d, e を欠失している。 *tpg1* との 2 重変異株は *ida4* の方がはるかに低い運動性を示す。このことはチューブリンポリグルタミン酸化修飾ができない微小管に対してダイニン e が異常なふるまいを示している。

(3) ダイニン調節複合体への影響

ダイニン調節複合体 (DRC) は、最近、周辺微小管同士を架橋する構造であるネキシンリンクそのものであることが示されている。また、生化学実験により、7 種の主要内腕ダイニンのうち、ダイニン e とだけ物理的に結合していることが知られている。上記の実験により、チューブリンポリグルタミン酸化によってダイニン e が特に大きく影響を受けることが判明したので、ダイニン e と同時に DRC の機能がチューブリン修飾によって強い影響を受けるかどうか、興味深い問題である。そこで、DRC に異常がある 4 種の変異株と *tpg1* 株の 2 重変異株を作製し、その運動性を解析した。その結果、4 種とも *tpg1* 変異の共存によって運動性は大きな影響を受けなかった。このことは、元来 DRC はチューブリンポリグルタミン酸化によって大きな影響を受けるが、DRC を部分欠損している株の運動性はポリグルタミン酸化の欠如によってさらに低下することはないことを示している。すなわち、以上の結果は、チューブリ

ンポリグルタミン酸化がダイニン e と DRC を通して鞭毛繊毛の運動性を調節している可能性を強く示唆するものである。

われわれは、これらの結果から、チューブリンポリグルタミン酸化修飾は、ダイニン e と DRC との相互作用によって微小管間の距離を短縮し、それによってダイニン e ばかりでなく他の内腕ダイニンの活性を高めるはたらきをしているというモデルを提唱した (図 1)。

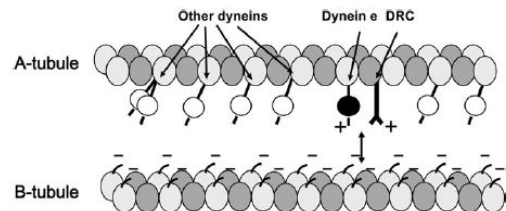


図2. ポリグルタミン酸側鎖がダイニン e と DRC と静電相互作用して微小管間距離を変化させ、その結果として多くのダイニンの活性を制御するというモデル。B 小管上の突起はポリグルタミン酸側鎖を表す。

(4) チューブリングルタミン酸化酵素 TTLL9 と相互作用する軸系内タンパク質 FAP234 の性質の検討

本研究を実施中に、*tpg1* 変異株と同一の表現型を示す新しい変異株を単離した。この株もチューブリンのポリグルタミン酸化に異常があったため *tpg2* と命名した。4 分子分析によるポジショナルクローニングとデータベースの検索から、*tpg2* は機能未知の鞭毛タンパク質 FAP234 に異常があることが判明した。

FAP234 と TTLL9 の関係などを調べるため、FAP234 の抗体を作製し、軸系と軸系抽出物中の両者の存在様式を調べた。その結果、FAP234 と TTLL9 は複合体を形成し、軸系内で同じ局在を示した。興味深いことに、*tpg1* 変異株では FAP234 単独で鞭毛内に輸送されるのに対し、*tpg2* では TTLL9 は鞭毛内に輸送されず、細胞質でも消失することが判明した。このことから、FAP234 は TTLL9 の細胞質における安定化と、その鞭毛内の輸送に参与している可能性が考えられる。

さらに、FAP234 は軸系だけでなく鞭毛内の細胞質分画にも存在することがわかり、その鞭毛内での局在には、鞭毛内輸送系 (IFT) が重要であることが示唆された。そこで IFT の温度感受性と *tpg1* または *tpg2* との 2 重変異株を作製して制限温度下で培養したところ、TTLL9、FAP234 とともに鞭毛内への局在は抑制された。したがって、FAP234 と TTLL9 が IFT によって輸送されていることは間違いない。

(5) 鞭毛内でチューブリンポリグルタミン酸化反応が起こる場の決定

鞭毛内のチューブリンポリグルタミン酸化修飾は、軸系周辺微小管のB小管上だけで起こることが知られている。その場合、ポリグルタミン酸化は形成された微小管上で起こるという可能性と、重合する前のチューブリン上で起こり、その修飾されたチューブリンが微小管に組み込まれるという可能性がある。このことはまだ解決していない。そこでわれわれは、*tpg1* 変異株と野生株の配偶子を掛け合わせ、その接合過程で生じる4本鞭毛の接合子におけるチューブリンポリグルタミン酸化の程度を、間接蛍光抗体法で評価した。その結果、接合が開始してから、*tpg1* 由来の鞭毛軸系が徐々にポリグルタミル酸化されることが見出された。すなわち、完成した鞭毛軸系微小管上で、チューブリンのポリグルタミン酸化が起こることが直接的に証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Kubo T, Yanagisawa HA, Liu Z, Shibuya R, Hirono M, Kamiya R. (2014). A conserved flagella-associated protein in *Chlamydomonas*, FAP234, is essential for axonemal localization of tubulin polyglutamylase TTLL9. *Mol. Biol. Cell* 25, 107-117. 査読有 doi: 10.1091/mbc.E13-07-0424.

Yamamoto, R., Song, K., Yanagisawa, H., Fox, L., Yagi, T., Wirschell, M., Hirono, M., Kamiya, R., Nicastro, D., and Sale, W.S. (2013). The MIA complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility. *J. Cell Biol.* 201: 263-278. 査読有 doi: 10.1083/jcb.201211048.

Kubo, T., Yagi, T., and Kamiya, R. (2012). Tubulin polyglutamylase regulates flagellar motility by controlling a specific inner-arm dynein that interacts with the dynein regulatory complex, *Cytoskeleton* 69, 1059-1068. 査読有 doi: 10.1002/cm.21075.

Bui, K.H., Yagi, T., Yamamoto, R., Kamiya, R., and Ishikawa, T. (2012). Polarity and asymmetry in the arrangement of dynein and related structures in the *Chlamydomonas* axoneme. *J. Cell Biol.* 198, 913-925. 査読有 doi: 10.1083/jcb.201201120.

〔学会発表〕(計12件)

Ritsu Kamiya (2013). (招待講演) Regulation of dynein activity by a conserved tubulin polyglutamylase system. The 25th CDB Meeting: Cilia and centrosomes: from fertilization to cancer. 2013年6月17日~2013年6月18日、理化学研究所 CDB (兵庫県神戸市)

Ritsu Kamiya (2013) (招待講演) Regulation of axonemal dynein activity by a conserved tubulin polyglutamylase system. International Workshop: Dynein 2014. 2013年10月13日~2013年11月3日、オルビスホール(兵庫県神戸市)

神谷 律 (学会賞受賞講演) 鞭毛運動におけるダイニン機能とその調節機構の研究 2012年9月14日 第83回日本動物学会、大阪大学(大阪府豊中市)

〔図書〕(計1件)

神谷 律 (2012) 太古からの9+2構造: 繊毛のなぞ 岩波書店 124頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 律 (KAMIYA, Ritsu)
学習院大学理学部・客員教授

研究者番号: 10124314

(2) 研究分担者

なし。