

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440074

研究課題名(和文) 鞭毛繊維毛に微量しか存在しない新規ダイニンの構造・機能解析

研究課題名(英文) Structural and functional analyses on novel minor dyneins localized to the proximal regions in cilia and flagella

研究代表者

八木 俊樹 (Yagi, Toshiki)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：40292833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：クラミドモナス繊維毛には15種類ものダイニンが存在するが、そのうち4種類(DHC3, DHC4, DHC11, DHC12)は、存在量が微量なマイナーダイニンである。本研究では、各マイナーダイニンの *in vivo* における機能を明らかにするために、それぞれの欠失株を単離し、その運動性を野生株のものと比較した。通常遊泳条件では、どの株の運動性も野生株と変わらなかったが、培養液の粘度を上げると、DHC4, DHC12の欠失株は野生株よりも低い粘性下に遊泳が停止することがわかった。この結果は、これら2種は他のダイニンに比べて大きな力を発揮して鞭毛運動に貢献していることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：A green algae *Chlamydomonas* has fifteen axonemal dynein heavy chains (DHCs), which hydrolyze ATP and generate force to translocate axonemal microtubules. We previously found that flagellar contents of four minor-type DHCs (DHC3, DHC4, DHC11, and DHC12) are 10-20% of other eleven major-type DHCs. We surmised that the four DHCs have some unique roles to produce flagellar bending movements. To understand the function of each minor-dynein, we isolated novel mutants missing specific DHCs and characterized the mutant motilities. Under usual culture condition, each mutant motility appeared to be comparable to that of wild type. Interestingly, however, the swimming speeds of mutants missing DHC4 or DHC12 decreased more steeply than that of wild type with the increase of viscosity of culture media, suggesting that the two DHCs generate more power than other DHCs to swim against large viscous resistance. This is the first report that reveals the function of minor dyneins.

研究分野：生物物理学

キーワード：ダイニン ATP 微小管 鞭毛繊維毛

1. 研究開始当初の背景

鞭毛・繊毛運動の基礎はダイニンによる微小管の滑り運動である(以下、繊毛と略記する)。このことはすでに確立しているが、滑りが規則正しい波動運動に変換される機構はよくわかっていない。そこにはダイニンがもつ固有の性質が関与すると考えられる。モデル生物緑藻クラミドモナスを用いたこれまでの研究から、繊毛には多種類のダイニンが存在することが知られていたが、最近、ダイニンの繊毛内での配置は必ずしも一様ではなく、偏った位置に配置されるダイニンも存在することが分かってきた。繊毛根元に局在するものや、それとは相補的に存在するものが見出されたのである(Yagi et al., 2009; 計画の項の表参照)。また、ごく最近になって、私たちは、特定の繊毛微小管にのみ存在する新しいタイプのダイニン(DHC12)を見出し、ダイニンの局在はさらに多様であることを明らかにした。特定の場所に配置される個々のダイニンの機能はまだ分かっていないが、それぞれが独自の機能を持ち繊毛運動に貢献している可能性が高い。多種類のダイニンが「適材適所に」配置されることが、波動運動の発生に本質的に重要であるものと想像される。

2. 研究の目的

本研究では、繊毛内での配置場所が異なるクラミドモナスダイニンそれぞれにどのような機能の違いがあり、それが繊毛運動の発生にどのような役割を担っているのかを明らかにする。特に、根元や特定微小管などに配置され、微量にしか存在しないマイナーダイニンは特殊な性質を持っている可能性があり、それらに注目して以下のような実験を行う。

1) マイナーダイニンの in vivo 機能解析

特定のダイニンを欠失した変異株を作成しその運動性を調べ、屈曲運動における役割を明らかにする。

2) クライオ電子顕微鏡によるマイナーダイニンの繊毛内局在解析

各ダイニンの構造と機能の関係を調べるために、クライオ電子線トモグラフィーを用いて、各ダイニンの構造、繊毛内配置様式の違いを比較検討する。

3. 研究の方法

1) マイナーダイニンの in vivo 機能解析

研究初期には、各種マイナーダイニンの欠失株を、RNA 干渉法により得ることを考え準備を進めたが、この方法は変異株の表現形が不安定であるという欠点があった。本研究の途中で、米国スタンフォード大学の Jonikas 博士らによりクラミドモナスの遺伝子破壊株のライブラリーが作成され、一般に公開された。ライブラリーデータベースを調べたと

ころ、ライブラリーには4つのマイナーダイニンいずれの破壊株も存在することがわかった。そこで、それらを取り寄せ、各株ゲノムにおけるダイニン遺伝子の破壊の様子を調べ、また、繊毛内で実際にダイニンが欠失していることを特異的な抗体を用いて確認した。欠失が確認できた株を用いて、遊泳速度、繊毛打頻度、繊毛の最大屈曲角度などの運動性を野生株のものと比較した。

2) クライオ電子顕微鏡によるマイナーダイニンの繊毛内局在解析

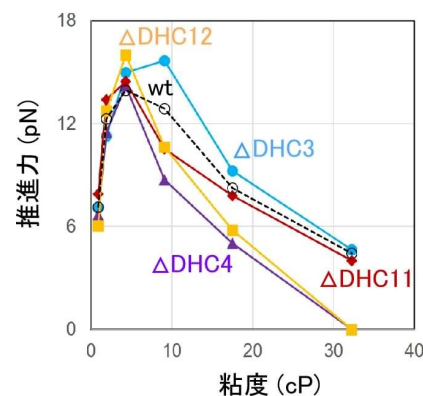
クラミドモナス繊毛内にある15種類のダイニンは繊毛長軸に96 nm 周期で規則正しく並んでいると考えられている。繊毛内での局在位置は各ダイニンが固有の機能を発揮するために重要であると考えられるが、マイナーダイニンの局在位置はわかっていない。

1) で得られたダイニン破壊株と野生株の繊毛の構造を電子線トモグラフィーにより3次元レベルで観察して、特定ダイニン破壊株軸系上の「構造の欠失」を探索して、ダイニンの局在位置の特定を試みた。

4. 研究成果

1) マイナーダイニンの in vivo 機能解析

クラミドモナスの遺伝子欠損株を用いて、鞭毛内での存在量が微量なマイナーダイニン(DHC3, DHC4, DHC11, DHC12)の機能を調べた。方法の項で述べたライブラリーから、各マイナーダイニンの破壊株を探索し、それぞれの株を取り寄せ、野生株との戻し交配によりマイナーダイニン遺伝子のみが破壊された株を得た。得られた株の運動性を野生株のものと比較した。その結果、通常の遊泳条件では、どの株の運動性も野生株のそれと変わらなかったが、培養液の粘度を上げると、各株の運動性に差が見られるようになった。DHC4, DHC12 の欠失株は粘度上昇に対する感受性が高く、野生株よりも低い粘性下に遊泳が停止したが、DHC3, DHC11 株の粘度感受性は野生株と同じだった(下図)。高粘性下では大きな粘性抵抗に抗して遊泳する必要があることから、DHC4, DHC12 は、高粘度下の遊泳において、他のダイニンに比べて大きな力を発揮している可能性が考えられた。



2) クライオ電子顕微鏡によるマイナーダイニンの鞭毛内局在解析

DHC3, DHC12 の鞭毛内局在を明らかにするために、これらダイニンの欠失株鞭毛のクライオ電子顕微鏡構造解析を行った(東京大学大学院医学研究科・吉川雅英教授との共同研究)。不思議なことに、欠失株と野生株の間に構造上の差が見られず、ダイニンの局在位置を決定できなかった。この結果は、失われたダイニンの位置に別のダイニンが置き換わって配置された可能性を示唆する。どうして別のダイニンが置き換われるのか、それを調べることが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- 1 Kamimura S, Fujita Y, Wada Y, Yagi T, Iwamoto H.

X-ray fiber diffraction analysis shows dynamic changes in axial tubulin repeats in native microtubules depending on paclitaxel content, temperature and GTP-hydrolysis. *Cytoskeleton* (Hoboken): 73(3):131-44, 2016. doi: 10.1002/cm.21283.

2. Ichikawa M, Saito K, Yanagisawa HA, Yagi T, Kamiya R, Yamaguchi S, Yajima J, Kushida Y, Nakano K, Numata O, Toyoshima YY. Axonemal dynein light chain-1 locates at the microtubule-binding domain of the γ heavy chain. *Mol Biol Cell*. 26(23):4236-47. 2015. doi: 10.1091/mbc.E15-05-0289.

[学会発表](計 8 件)

1. Identification of nine novel Chlamydomonas mutants missing a single species of five major-type or four minor-type inner-arm dyneins
Y. Kondo, T. Komatsu, N. Tanaka, K. Fujimoto, M. Kikkawa, T. Yagi
International workshop "Dynein 2017"
2017 年 10 月 29 日
2. クラミドモナス・ダイニン外腕中間鎖変異による運動性の低下
小川 倫加, 菅野 英美里, 近藤 裕祐, 廣野 雅文, 箕浦 高子, 神谷 律, 八木 俊樹
第 8 8 回動物学会年会 2017 年 9 月 20 日

3. 外腕ダイニン中間鎖の点突然変異によるクラミドモナス鞭毛運動性の低下

小川 倫加, 菅野 英美里, 近藤 裕祐, 廣野 雅文, 箕浦 高子, 神谷 律, 八木 俊樹
第 5 5 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月 19 日

4. Resurrection of flagellar bending movements in chlamydomonas paralyzed mutants at high pressure

T. Yagi, M. Nishiyama
第 6 1 回米国生物物理学会大会 2017 年 2 月 11 日

5. Regulation of dynein motor activity through the change of axoneme diameter

T. Yagi
The 28th CDB meeting "Cilia and Centrosomes" 2016 年 11 月 27 日

6. 軸糸直径サイズ変化による鞭毛繊維の屈曲運動の制御

八木 俊樹, 上村 慎治, 岩本裕之
第 5 4 回日本生物物理学会 2016 年 11 月 25 日

7. Resurrection of flagellar bending movements in chlamydomonas paralyzed mutants at high pressure

Yagi T, and Nishiyama M.
17 th International conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas
2016 年 6 月 26 日

8. 高圧負荷により誘導されるクラミドモナス非運動性変異株鞭毛の屈曲運動

八木 俊樹, 西山雅祥
日本動物学会 2015 年 9 月 17 日

[図書](計 2 件)

1. "Handbook of dynein (2nd edition)" (K. Hirose & LA. Amos, editor)
Yagi T. and Kamiya R.
an Stanford Publishing Pte Ltd. (In press)
2. "Dyneins (2nd edition)" (King SM, editor)
Yagi T., and Kamiya R. (担当:分担執筆, 範囲:Chapter 9. Genetic approaches to axonemal dynein function in Chlamydomonas and other organisms.)
Elsevier, Amsterdam (2017), 219-248, 2017 年 11 月

[産業財産権]

なし

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pu-hiroshima.ac.jp/~yagit/lab-molmach.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木俊樹 (YAGI, Toshiki)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号： 40292833