

161. 繊毛ダイニン前集合機構の解明

山本 遼介

*大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 分子細胞運動学研究室

Key words : 繊毛, 前集合 (pre-assembly), ダイニン, クラミドモナス, 変異株

緒言

運動性繊毛は、真核生物において多様な役割を担う細胞小器官である。原生生物では、運動性繊毛は個体運動や外界感知に用いられる。また、高等動物においては、運動性繊毛が気管・脳室・精子・輸卵管等の細胞表面に存在し、異物排出・恒常性維持・正常発生・生殖等に必須な役割を担っている。運動性繊毛の波動運動は、繊毛内部微小管上に存在するモータータンパク質複合体『繊毛ダイニン』により駆動される [1]。繊毛ダイニンは複数種類存在し、そのどれもが重鎖を含む複数のサブユニットから構成されている。繊毛内にはタンパク質合成系が存在しないため、これらの繊毛ダイニンは繊毛に運ばれる前に細胞質内において前集合 (pre-assembly) と呼ばれる機構によって各種サブユニット (重鎖・中間鎖・軽鎖) から組み立て/折り畳まれることが現在までの研究で明らかになっている [2]。この繊毛ダイニン前集合に異常が生じると、各種繊毛ダイニンが正しく組み立てられず、繊毛運動に異常が生じ、ひいては左右軸逆位・水頭症・不妊等を含む繊毛病 (Ciliopathy) を発症することが判明している。しかしながら、その重要性にも関わらず、繊毛ダイニン前集合に関与すると示唆されている分子 (前集合因子) は少数であり、その詳細な分子機構も不明である。本研究では、新規繊毛ダイニン前集合因子の同定を通して、前集合機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

方法

通常モデル生物であるマウス・ショウジョウバエ・ゼブラフィッシュ・線虫等では、微小な細胞小器官である繊毛を大量に単離しその構築機構を詳細に研究するのは困難であると考え、2本の運動性繊毛を持つ単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を用いて本研究を行った。クラミドモナスは完全人工培地での大量培養が可能であり、繊毛単離が容易で、遺伝学も利用可能であるため、本研究に適したモデル生物である [3]。所属研究室にクラミドモナスの培養と変異株単離の系を構築し、新規繊毛ダイニン前集合異常株の単離を試みた。

結果および考察

1. 遺伝子変異導入薬剤を用いたクラミドモナス変異株ライブラリーの作製

新規繊毛ダイニン前集合因子の同定を目指し、まず繊毛ダイニン前集合に異常を持つ新規クラミドモナス変異株の単離を試みた。クラミドモナス野生型株 (cc124 株または cc125 株) を遺伝子変異導入薬剤である EMS (**E**thyl **M**ethane**S**ulfonate) もしくは MNNG (1-**M**ethyl-3-**N**itro-1-**N**itroso**G**uanidine) で処理し、薬剤を洗い流した後、底部を遮光し上部のみ光を当てた 15 ml ファルコンチューブ内で液体培養を開始した。その後、数日おきに数回、チューブ底部に溜まった細胞を注意深く新しいチューブに移し、再度底部を遮光し上部のみ光を当てるという作業を繰り返した。この手法は、クラミドモナスが光に集まる性質 (走光性) を利用したものであり、無繊毛であったり、運動性が悪かったりする株はチューブ底部に溜まるので、繊毛ダイニン前集合異常株の濃縮に有効だと判断し利用した [4]。次に、十分濃縮された変異株を寒天培地上に薄く拡げて撒き、上部から光を当てて各変異株の細胞塊 (コロニー) 形成を促した。

*現在の所属：大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 細胞構築学研究室

2. 変異株ライブラリーからの前集合異常候補株 1 次スクリーニング (遊泳速度/繊毛長観察)

各変異株細胞が十分な大きさのコロニーを形成したのを確認した後、滅菌した爪楊枝で1つずつコロニーを突き、96穴プレート内の液体培地にコロニーを移動して明所で液体培養を開始した。変異株コロニーは少なくとも数百個以上を突くように心がけた。その後、実体顕微鏡下で96穴プレート内の各変異株を観察し、野生型に比べて顕著に遅い遊泳を示す株をSS株 (**S**low **S**wimming 株) として以降の解析候補株とした。命名法としては、EMSが変異原の場合はESS (**E**MS-**S**low **S**wimming) 株、MNNGが変異原の場合はMSS (**M**NNG-**S**low **S**wimming) 株とし、株ごとに番号を振っていった。同時に、既知の繊毛ダイニン前集合異常株は、貧栄養液体培地内では繊毛を生やすが、富栄養液体培地内では繊毛を生やしにくい、極く短い繊毛しか生やさない場合が多くみられるので [5, 6]、それらの表現型を示す株も優先的に以降の解析候補株とし、NF株 (**N**on **F**lagella 株) と命名した (ENF: **E**MS-**N**on **F**lagella, MNF: **M**NNG-**N**on **F**lagella)。何度か96穴プレート内で表現型観察を繰り返し、結果として、4株のESS株 (ESS1-ESS4)、5株のENF株 (ENF1-ENF5)、18株のMSS株 (MSS1-MSS18)、23株のMNF株 (MNF1-MNF23) を単離することに成功した。

3. 変異株ライブラリーからの前集合異常候補株 2 次スクリーニング (細胞全体/繊毛内のダイニン量測定)

上記した計50株の繊毛ダイニン前集合異常候補株から、更に解析候補株を取捨選択する目的で、まず変異株細胞全体での繊毛ダイニンサブユニット (中間鎖・軽鎖) の存在量を、ウェスタンブロット法により野生型株と比較した。既知の繊毛ダイニン前集合異常株では、繊毛ダイニン複合体が各種サブユニットから正しく組み立て/折り畳まれないために、細胞体内に過剰に繊毛ダイニンサブユニットが蓄積するか、または分解され減少してしまう事象が観察されている [5, 6]。50株の前集合異常候補株から SDS-PAGE 用の全細胞サンプルを調整し、各種繊毛ダイニン中間鎖・軽鎖抗体でウェスタンブロット法を行った結果、野生型と比較した場合、繊毛ダイニン中間鎖・軽鎖存在量に何らかの差異があると思慮される15株を選び出すことが出来た (表1) (ESS1, ESS2, ESS3, MSS2, MSS7, MSS8, MSS9, MSS10, MSS15, MSS16, MNF3, MNF9, MNF12, MNF15, MNF16)。次に、これら15株から繊毛単離が特に困難であった株を除外し、残った株から繊毛を単離して繊毛ダイニンサブユニットの存在量をウェスタンブロット法により野生型株と比較した。その結果、ESS1, ESS2, ESS3株では軸糸外腕ダイニンサブユニットであるIC69 [7] の繊毛内存在量が顕著に減少していることが観察され、特にESS2, ESS3株では検出限界以下にまでIC69量が減少していた (図1)。

表1. 前集合異常候補 15株の表現型

ESS1	富栄養下でSlow swimming, oda変異株に似る, "jerky" swimming
ESS2	富栄養下でSlow swimming, oda変異株に似る, "jerky" swimming
ESS3	富栄養下でSlow swimming, oda変異株に似る, "jerky" swimming
MSS2	富栄養下でSlow swimming, 繊毛波形異常
MSS7	富栄養下でSlow swimming, "sporadic twitching"
MSS8	富栄養下でSlow swimming, ida変異株に似る, "smooth" swimming
MSS9	富栄養下でSlow swimming, "non-motile" もしくは "sporadic twitching"
MSS10	富栄養下でSlow swimming, oda変異株もしくはmia変異株に似る
MSS15	富栄養下でSlow swimming, 後ろ向きに泳ぐ傾向, mbo変異株に似る
MSS16	富栄養下でSlow swimming, "non-motile" もしくは "sporadic twitching"
MNF3	富栄養下で無繊毛か短鞭毛, 貧栄養下でも繊毛を生やしにくい傾向あり
MNF9	富栄養下で無繊毛か短鞭毛, 貧栄養下でも繊毛を生やしにくい傾向あり
MNF12	富栄養下で無繊毛か短鞭毛, 貧栄養下で繊毛を生やす, "non-motile" もしくは "sporadic twitching"
MNF15	富栄養下で無繊毛か短鞭毛, 貧栄養下で繊毛を生やす, "non-motile"
MNF16	富栄養下で無繊毛か短鞭毛, 貧栄養下でも短鞭毛を生やす, "non-motile"

左欄に変異株の単離名を、右欄に表現型を記す。既存の変異株に遊泳パターンが似ている場合はそれを記した。“smooth”、“jerky”、“sporadic twitching”、“non-motile”は繊毛運動/クラミドモナス運動の印象を表す。

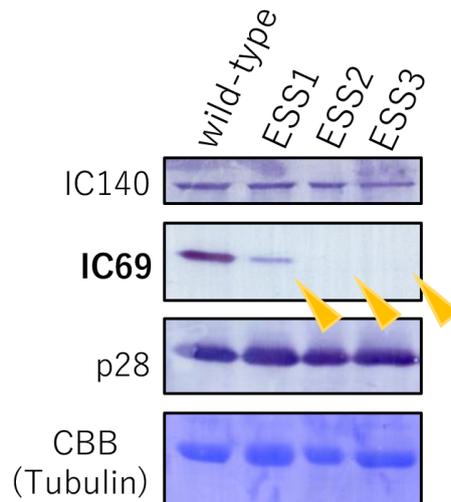


図1. 各種繊毛ダイニン中間鎖・軽鎖抗体による前集合異常候補株繊毛軸系のウェスタンブロット
野生型株 (wild-type) と繊毛ダイニン前集合異常候補株 (ESS1、ESS2、ESS3) から繊毛を単離し、
界面活性剤で除膜した後、SDS-PAGE で展開し、その後 IC140 (内腕ダイニン f/I1 中間鎖)・IC69 (外
腕ダイニン中間鎖)・p28 (内腕ダイニン a/c/d 軽鎖) に対する各抗体でウェスタンブロットを行った。
ESS1 では繊毛軸系内の IC69 存在量が顕著に減少し、ESS2、ESS3 では更に検出限界以下にまで落ち
込んでいることが分かる (黄矢尻)。

4. 前集合異常候補株の戻し交配作業と多型株との掛け合わせによる変異遺伝子決定

現在、上記スクリーニングを経て選び出した15株の中から、手始めに6株 (MSS2、MSS7、MSS8、MSS10、MSS15、MNF12) を選び、変異遺伝子を決定する前段階として、野生型株との戻し交配を行っている [8]。クラミドモナスは一倍体であるため、多型株との掛け合わせにより割合容易に変異遺伝子 mapping が可能であるが、その際に目的とする表現型を単一の遺伝子変異に帰属させ、薬剤変異導入の際にランダムに挿入された背後の余分な変異を取り除く必要があるためである [9]。既にいくつかの株では2回目の戻し交配作業が終了しており、この作業を2~3回行って余分な背後変異を取り除いた後、多型株を用いた変異遺伝子 mapping [10] を行うことを予定している。これらの株の変異遺伝子が決定された後は、原因遺伝子産物の機能解析と併せ、残りの変異株についても順次網羅的に変異遺伝子決定を行っていく予定である。本研究は途上ではあるが、有力な前集合異常候補株を複数単離することに成功した。今後は、研究を更に発展させ、繊毛ダイニン前集合因子の網羅的同定と、各々の分子機能決定を通して、繊毛ダイニン前集合機構の全貌を明らかにしたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院理学研究科細胞構築学研究室の昆隆英教授、ならびに山崎裕也氏である。本研究にご支援を賜った上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Gibbons IR, Rowe AJ. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science*. 1965;149(3682):424-6. Epub 1965/07/23. doi: 10.1126/science.149.3682.424. PubMed PMID: 17809406.
- 2) Kobayashi D, Takeda H. Ciliary motility: the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation*. 2012;83(2):S23-9. Epub 2011/12/14. doi: 10.1016/j.diff.2011.11.009. PubMed PMID: 22154137.
- 3) Vincensini L, Blisnick T, Bastin P. 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol Cell*. 2011;103(3):109-30. Epub 2011/02/01. doi: 10.1042/bc20100104. PubMed PMID: 21275904.
- 4) Lewin RA. Mutants of *Chlamydomonas moewusii* with impaired motility. *J Gen Microbiol*. 1954;11(3):358-63. Epub 1954/12/01. doi: 10.1099/00221287-11-3-358. PubMed PMID: 13221756.
- 5) Yamamoto R, Hirono M, Kamiya R. Discrete PIH proteins function in the cytoplasmic preassembly of different subsets of axonemal dyneins. *J Cell Biol*. 2010;190(1):65-71. Epub 2010/07/07. doi: 10.1083/jcb.201002081. PubMed PMID: 20603327; PubMed Central PMCID: PMC2911668.
- 6) Yamamoto R, Obbineni JM, Alford LM, Ide T, Owa M, Hwang J, et al. *Chlamydomonas* DYX1C1/PF23 is essential for axonemal assembly and proper morphology of inner dynein arms. *PLoS Genet*. 2017;13(9):e1006996. Epub 2017/09/12. doi: 10.1371/journal.pgen.1006996. PubMed PMID: 28892495; PubMed Central PMCID: PMC5608425.
- 7) King SM, Otter T, Witman GB. Characterization of monoclonal antibodies against *Chlamydomonas* flagellar dyneins by high-resolution protein blotting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(14):4717-21. Epub 1985/07/01. PubMed PMID: 3161075; PubMed Central PMCID: PMC390975.
- 8) Sager R. MENDELIAN AND NON-MENDELIAN INHERITANCE OF STREPTOMYCIN RESISTANCE IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDI*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1954;40(5):356-63. Epub 1954/05/01. PubMed PMID: 16589487; PubMed Central PMCID: PMC534135.
- 9) Dutcher SK, Gibbons W, Inwood WB. A genetic analysis of suppressors of the PF10 mutation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 1988;120(4):965-76. Epub 1988/12/01. PubMed PMID: 3224813; PubMed Central PMCID: PMC1203588.
- 10) Kathir P, LaVoie M, Brazelton WJ, Haas NA, Lefebvre PA, Silflow CD. Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome. *Eukaryot Cell*. 2003;2(2):362-79. Epub 2003/04/10. PubMed PMID: 12684385; PubMed Central PMCID: PMC154841