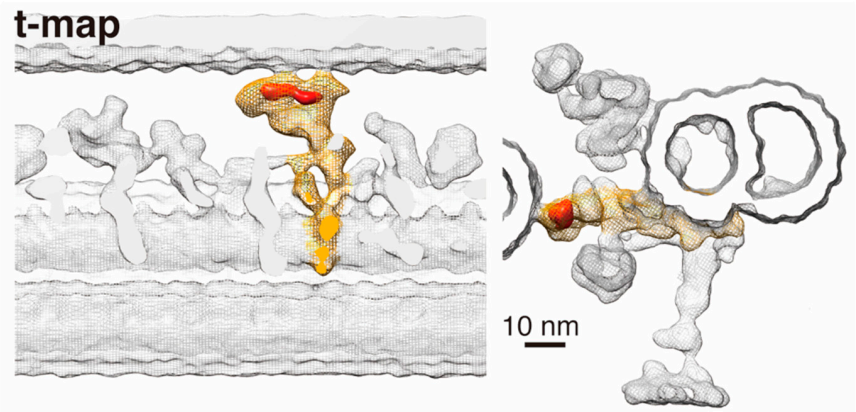
94　電子顕微鏡を用いた繊毛構築の分子メカニズム解明	小田　賢幸

【目的】繊毛・鞭毛は真核生物に広く保存された運動性の細胞小器官であり、哺乳類においては、精子の運動や気道粘液の排出、脳脊髄液の撹拌、そして初期発生における左右差決定など様々な生理現象に関わっている。繊毛の中心構造は軸糸と呼ばれ、9 本の二重微小管が円周上に配列した「9 + 2 構造」を持つ。軸糸微小管を構成する tubulin は様々な翻訳後修飾を受けているが、その局在や機能的意義には不明な点が多かった。本研究では、ポリグルタミル化（polyE）tubulin の三次元的局在を明らかにすると共に、遺伝子改変により繊毛運動における polyE チューブリンの機能的意義を解析した。

【方法】緑藻クラミドモナスの鞭毛から単離した軸糸を抗 polyE-tubulin 抗体でラベルし、クライオ電子トモグラフィーで三次元構造を再構成した。

【結果】PolyE-tubulin が微小管とダイニン制御複合体（N-DRC）と呼ばれる微小管架橋構造との接点に局在することを発見した。さらに表面電荷を改変した N-DRC タンパク質を繊毛に発現させることで、N-DRC と微小管との電荷的相互作用が繊毛運動を制御していることを突き止めた。

クライオ電子トモグラフィーによる polyE 化 tubulin の位置同定



94. 電子顕微鏡を用いた繊毛構築の分子メカニズム解明

小田　賢幸

*山梨大学 大学院総合研究部 医学域 基礎医学系 解剖学講座 構造生物学教室

Key words：cilia and flagella，cryo-electron microscopy，dynein，tubulin，post-translational modification

緒　言

繊毛・鞭毛は真核生物において広く保存された運動性細胞小器官であり、波打ち運動によって細胞の運動や液体の移動を行っている。哺乳類においては、精子の運動や気道粘液の排出、卵管内の卵子の移動、脳脊髄液の撹拌、そして初期発生における左右差決定など様々な生理現象に関わっている［1，2］。

繊毛の中心構造は軸糸と呼ばれ、9 本の二重微小管が円周上に配列した「9 + 2 構造」を持つ。この二重微小管にモータータンパク質のダイニンが規則的に並び、繊毛の波打ち運動を駆動している［3］。我々のグループはこの軸糸の三次元構造を、クライオ電子トモグラフィーを用いて再構築することで、繊毛の運動と構築の分子メカニズムを解析している［4］。

微小管を構成する tubulin はアセチル化、ポリグルタミル化、グリシル化、チロシン化、脱チロシン化など様々な翻訳後修飾を受けており、これらの修飾はモータータンパク質などの微小管結合タンパク質との親和性や微小管の安定化などに寄与している［5］。

最近、繊毛 tubulin をポリグルタミル化（polyE 化）する酵素である TTLL9 を欠損したクラミドモナス株が単離された［6］。この株の解析により tubulin の polyE 化が、繊毛運動や微小管の安定性に寄与していることが示唆された。しかし、polyE 化 tubulin の局在や運動制御の分子メカニズムは不明であった。本研究では、クライオ電子トモグラフィーを用いて polyE 化 tubulin の局在を三次元的に明らかにすると共に、軸糸タンパク質の遺伝子改変により polyE 化 tubulin が繊毛運動を制御する分子メカニズムを解明した［7］。

方　法

緑藻クラミドモナスから軸糸を単離し、ビオチン化した抗 polyE 化 tubulin 抗体の Fab fragment でラベルした。ラベルした軸糸を更にストレプトアビジンとビオチン化シトクロム C でラベルすることで、ビオチン化 Fab を起点とするラベルの分子量を増幅させた［8，9］。軸糸を液体エタンで急速凍結し、クライオ電子顕微鏡を用いて連続傾斜像を撮影した。連続傾斜像から逆投影法を用いて三次元トモグラムを再構成し、サブトモグラムを平均化することで軸糸微小管の高解像三次元像を得た。抗体でラベルした軸糸と、ラベルされていない軸糸の三次元像を比較することで、polyE 化 tubulin の局在を同定した。

結果および考察

1. PolyE 化 tubulin の三次元位置同定

クライオ電子トモグラフィーにより、polyE 化 tubulin が繊毛の二重微小管（A-tubule と B-tubule により構成）の B-tubule 表面に局在することが分かった（図 1A，B）。さらにその局在部は、隣接する二重微小管を架橋しているダイニン制御複合体（Nexin-Dynein Regulatory Complex、N-DRC）が B-tubule 表面に接触している部分と一致した。N-DRC は 11 種以上の DRC タンパク質（DRC1～11）で構成される巨大な複合体であるが、DRC タンパク質の多くが塩基性アミノ酸に富んでいる。興味深いことに、DRC4 の Lys 残基に富むアミノ末端は N-DRC と B-tubule との接

*現在の所属：東京大学 大学院医学系研究科 生体構造学教室

点に位置することが我々の以前の研究により明らかになっていた（図 1C）[10]。これらの結果に基づき我々は、正に荷電していると考えられる DRC4 のアミノ末端と負に荷電している polyE 化 tubulin との間の静電気的相互作用が、隣接している微小管を架橋しているのではないかと考えた。

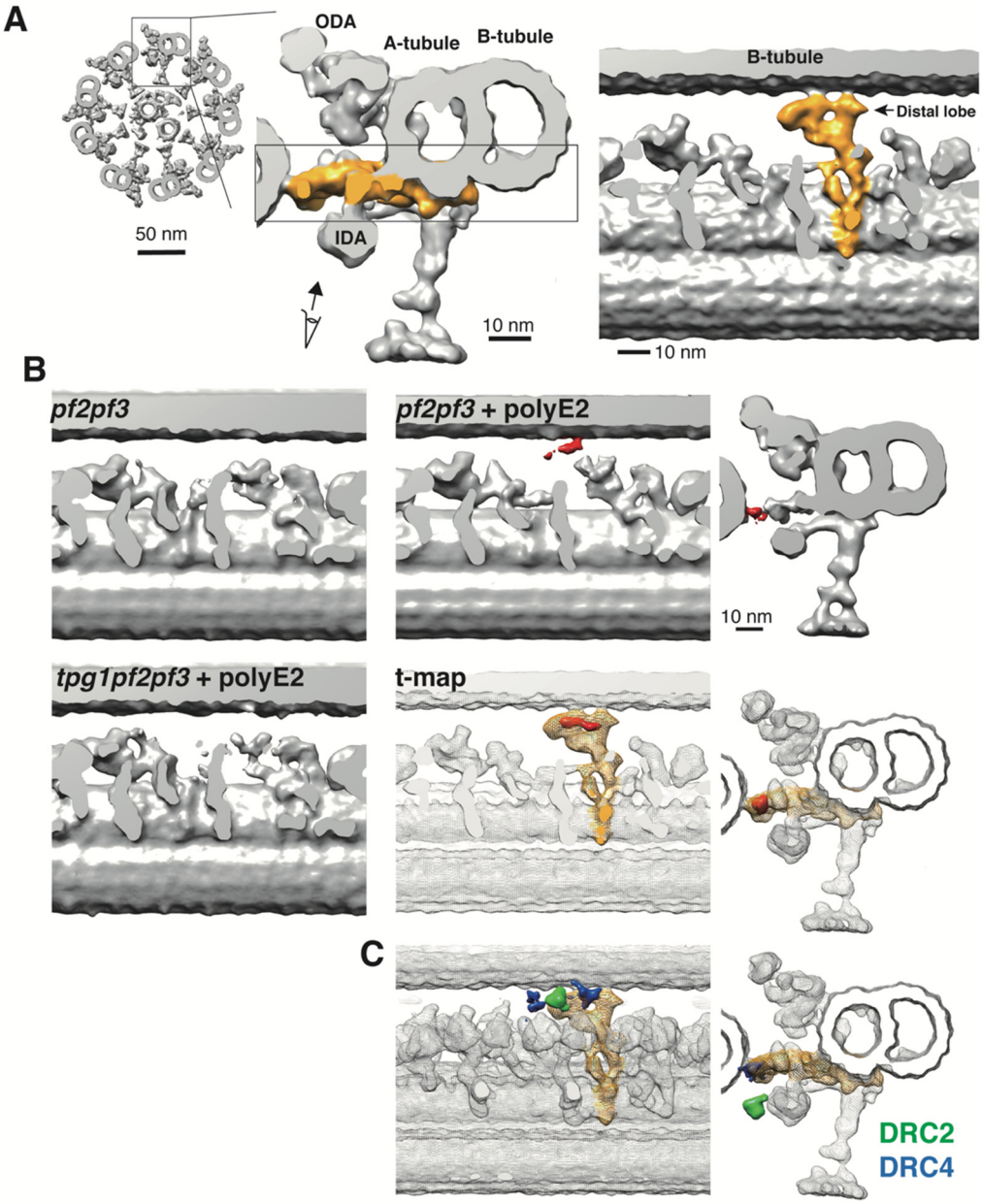


図 1. クライオ電子トモグラフィーによる polyE 化 tubulin の三次元位置同定

A）繊毛軸糸の三次元構造。9 + 2 構造の外周を成す 9 本の二重微小管はそれぞれ、A-tubule と B-tubule より構成される。A-tubule には外腕ダイニン（outer dynein arm, ODA）と内腕ダイニン（inner dynein arm, IDA）が結合している。A-tubule の内側面から隣接する二重微小管の B-tubule へ N-DRC（黄色）が伸びている。N-DRC の B-tubule 接触面は広がっており、distal lobe と呼ばれる。B) N-DRC を完全に欠損した変異体（*pf2pf3*）に polyE 化 tubulin 抗体（polyE2）を結合させると、抗体の電子シグナルが distal lobe にあたる部分に観察された（赤色）。このシグナルは polyE 化酵素を欠損した変異体（*tpg1pf2pf3*）では観察されなかった。*pf2pf3* と *pf2pf3* + polyE2 のデータセットをそれぞれ 3 分割し、得られた 6 maps に対して Student t-test を行い、$t > 7.17$ （$p < 0.001$）を閾値とする isosurface map （*t*-map, 赤色）を作成した。 C）DRC2 および DRC4 のアミノ末端を streptavidin でラベルし、三次元位置を同定した。特に DRC4 のアミノ末端が polyE2 シグナルと非常に近接した位置に同定された。

2. 遺伝子改変による N-DRC-tubulin 間の相互作用解析

前述の仮説を検証するために、まずアミノ末端の Lys 残基を Glu に置換した DRC4 を *drc4* 遺伝子欠損株に発現した。その結果、置換した Lys 残基の数と繊毛運動の低下率に正の相関があることが分かった。次に、アミノ末端に 23 の Lys/Arg 残基 を付加した DRC4（DRC4polyK）を、DRC2 の欠損により N-DRC の機能が大きく損なわれている株（*drc2*）に発現した。*drc2* の繊毛は波打ち運動を殆ど起こせないが、DRC4polyK の発現により繊毛運動を有意に回復させることが出来た。興味深いことに、正常な N-DRC に DRC4polyK を発現させると、繊毛運動は有意に低下した。

これらの結果から、塩基性アミノ酸により正に荷電した N-DRC と、polyE 化により負に荷電した微小管表面との間の静電気的相互作用により、隣接する二重微小管同士の連結が維持されていることが示された（図 2）。また、静電気的相互作用は強すぎても弱すぎても繊毛運動にマイナスの効果があるということも分かった。これは、繊毛運動には架橋構造だけでなく、隣接する二重微小管を滑らせる必要があるので、微小管間の相互作用は架橋と滑りを両立させるために適度な強度に調節されていると考えられる。

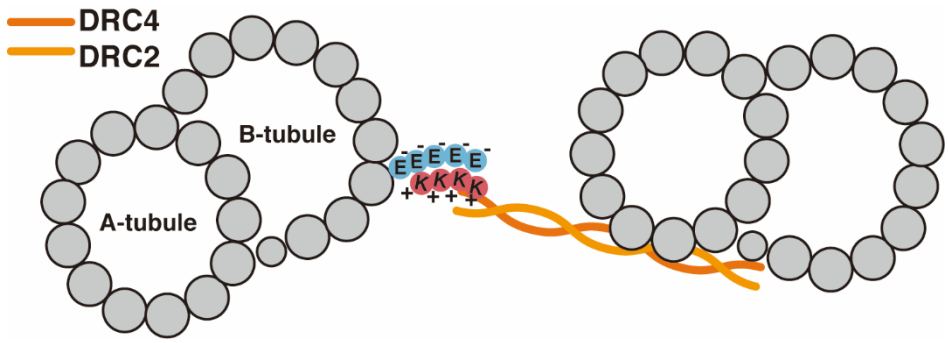


図 2. PolyE 化 tubulin と N-DRC の静電気的相互作用

B-tubule 上に局在する polyE 化 tubulin（E）の負電荷と、N-DRC の distal lobe に局在する Lys 残基の正電荷の間に生じる相互作用が、隣接する微小管間の架橋と滑り運動を可能にしている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山梨大学大学院総合研究部医学域解剖学講座構造生物学教室の久保智広助教である。本研究で用いたクライオ電子顕微鏡について、東京大学大学院医学系研究科の吉川雅英教授と柳澤春明助教のご支援を頂いた。ここに深謝申し上げる。

文　献

1） Gibbons IR. Cilia and flagella of eukaryotes. J. Cell. Biol. 1981 91: 107s-124s.PMID: 6459326

2） Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, and Takeda S Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. Cell. 2006 125: 33-45. PMID: 16615888 DOI:10.1016/j.cell.2006.03.002

3） Nicastro D, Schwartz C, Pierson J, Gaudette R, Porter ME, and McIntosh JR. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. Science. 2006 313: 944-948. PMID: 16917055 DOI:10.1126/science.1128618

4） Oda T. Three-dimensional structural labeling microscopy of cilia and flagella. Microscopy. (Oxf). 2017 66: 234-244. PMID: 28541401 DOI: 10.1093/jmicro/dfx018

5） Janke C. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. J. Cell. Biol. 2014 206: 461-472.PMID: 25135932 DOI:10.1083/jcb.201406055

6) Kubo T, Yanagisawa HA, Yagi T, Hirono M, and Kamiya R. Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins. Curr. Biol. 2010 20: 441-445. PMID: 20188560 DOI:10.1016/j.cub.2009.12.058

7) Kubo T, and Oda T. Electrostatic interaction between polyglutamylated tubulin and the nexin-dynein regulatory complex regulates flagellar motility. Mol. Biol. Cell. 2017 28: 2260-2266. PMID: 28637765 DOI:10.1091/mbc.E17-05-0285

8) Oda T, and Kikkawa M. Novel structural labeling method using cryo-electron tomography and biotin-streptavidin system. J. Struct. Biol. 2013 183: 305-311. PMID: 23859837 DOI:10.1016/j.jsb.2013.07.003

9) Oda T, Yanagisawa H, Yagi T, and Kikkawa M. Mechanosignaling between central apparatus and radial spokes controls axonemal dynein activity. J. Cell. Biol. 2014 204: 807-819. PMID: 24590175 DOI: 10.1083/jcb.201312014

10) Oda T, Yanagisawa H, and Kikkawa M. Detailed structural and biochemical characterization of the nexin-dynein regulatory complex. Mol. Biol. Cell. 2015 26: 294-304. PMID:25411337 DOI: 10.1091/mbc.E14-09-1367