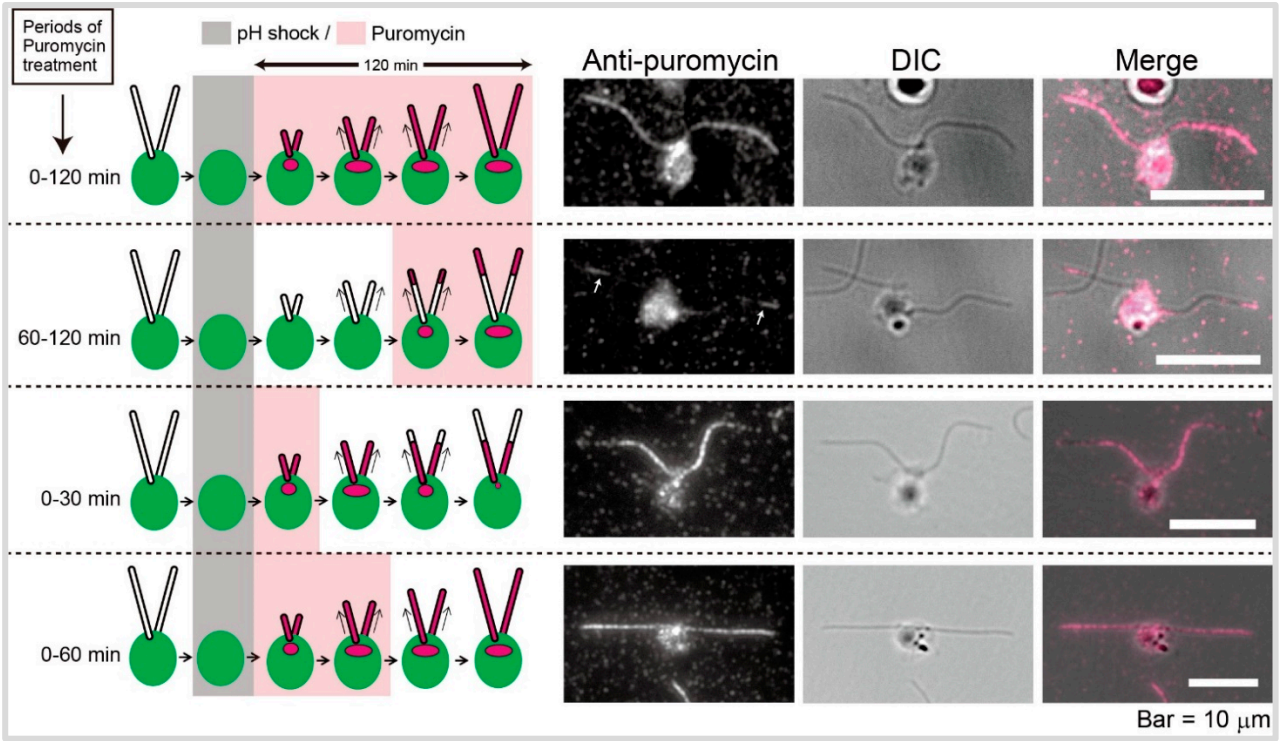
141　鞭毛構築に必須な鞭毛前駆体の実体解明	久保　智広

【目的】真核生物の鞭毛（繊毛と同義）は細胞運動、生体内の水流形成、シグナル伝達に関わる高度に保存された細胞小器官である。鞭毛の構築異常はヒトの「繊毛病」と総称される疾患を引き起こす。したがって、鞭毛がどのように構築されるのかを理解することは基礎生物学的にだけではなく、基礎医学的にも重要な課題である。本研究の大きな目標は、鞭毛前駆体の実体を解明することにより、真核生物一般に共通な鞭毛構築機構を理解しようとするものである。助成期間中は、クラミドモナスという 2 本の鞭毛を持つ単細胞緑藻類において新規合成蛋白質の標識方法を検討し　、鞭毛前駆体の実体解明に向けた足掛かりとした。

【方法】クラミドモナスは pH ショックなどの刺激によって鞭毛を脱離するが、その後約 2 時間かけて元の長さに鞭毛を再生する。鞭毛前駆体の実体に迫るため、本研究では、Surface sensing of translation（SUnSET）法が鞭毛再生中のクラミドモナスに適用できるかを検証した。SUnSET 法は、新規合成ポリペプチド鎖に取り込まれた抗生物質ピューロマイシンを特異的な抗体によって生化学的に検出する方法である。

【結果】本助成期間中、主に次の結果が得られた。1. クラミドモナスに SUnSET 法を適用する場合、ピューロマイシンの至適濃度は 50 μg/ml 程度である。2. 鞭毛再生中の細胞は、細胞体および鞭毛にピューロマイシン標識蛋白質を効率良く取り込む。3. 新規合成蛋白質は、再生中の鞭毛の先端から取り込まれる（下図）。4. シクロヘキシミド（蛋白質合成阻害剤）はピューロマイシンの取り込みを著しく阻害する。

新規合成蛋白質の鞭毛先端からの取り込み



141. 鞭毛構築に必須な鞭毛前駆体の実体解明

久保　智広

山梨大学 大学院総合研究部 医学域 解剖学講座 解剖構造学教室

Key words：鞭毛，繊毛，クラミドモナス，SUnSET 法，蛋白質合成

緒　言

真核生物の鞭毛（繊毛と同義）は、生体内の水流形成、細胞運動、シグナル受容などに関わる高度に保存された細胞小器官である。鞭毛の構築は、鞭毛内輸送系、蛋白質リン酸化、蛋白質合成等の複数の細胞内プロセスが協調しながら進行する。本研究は、クラミドモナスという 2 本の鞭毛を持つ単細胞緑藻類を用いて、鞭毛構築に必須な鞭毛前駆体の実体を解明しようとする。クラミドモナスは pH ショックなどの脱鞭毛刺激に応じて鞭毛を脱離するが、その後 2 時間程度で新しい鞭毛をもとの長さまで再生する。助成期間中は、クラミドモナスで、Surface sensing of translation（SUnSET）法という新規合成蛋白質の標識方法を検討し、鞭毛前駆体の実体解明に向けた足掛かりとした。鞭毛の異常は、水頭症、網膜色素変性症、左右逆位、多発性嚢胞腎、骨格異常など「繊毛病」と総称される一連の疾患を引き起こす。鞭毛がどのように形成されるのかを明らかにすることは、基礎生物学的、基礎医学的に重要である。

方　法

1. 細胞と培養方法

クラミドモナスの野生株（cc124、cc125）を用いた。細胞は Tris-acetate-phosphate（TAP）寒天培地で保存・維持した。実験に使用する場合は、TAP 液体培地で 3～4 日間、12h～12h の明暗周期下で通気培養した。

2. 鞭毛再生実験

クラミドモナスは pH ショックを与えると脱鞭毛するが、その後新しく鞭毛を再生する［1］。その性質を利用し、鞭毛の再生を観察した。具体的には、TAP 液体培地で増やした細胞に対して 0.5 M の酢酸を加え pH4.5 まで下げ、20 秒間維持した。そのあと、0.5 M の水酸化カリウムを加え pH を中性付近へ戻した。15 分おきに 180 分間、細胞を少量ずつ分取し、それぞれ 1%グルタルアルデヒドによって固定した。固定した細胞サンプルを微分干渉顕微鏡によって観察し、鞭毛の長さを測定した。

3. クラミドモナスに対する SUnSET 法の適用

SUnSET 法は［2］を参考にした。細胞に pH ショックを与えた直後に、終濃度 50 μg/ml のピューロマイシンを加え、一定時間鞭毛を再生させた。細胞はその後 SDS サンプル化し、抗ピューロマイシン抗体（12D10，Sigma）によって Western blot した。

4. 免疫染色

クラミドモナスの免疫染色は［3］に従った。細胞壁を除去した細胞をスライドガラスに貼り付け、界面活性剤処理した。スライドガラスに残る細胞骨格分画を抗ピューロマイシン抗体と Alexa488 標識二次抗体で処理した。

結果および考察

1.　SUnSET 法による鞭毛再生時の新規合成蛋白質の検出

SUnSET 法の原理は次の通りである。抗生物質のピューロマイシンはアミノアシル tRNA と構造が類似しているの

で、合成中のポリペプチド鎖に取り込まれる性質がある。ピューロマイシンが付加された時点でポリペプチド鎖はリボソームから解離するが、そのポリペプチド鎖はピューロマイシンに特異的な抗体によって検出することができる［2］。

本研究では、クラミドモナスの鞭毛再生時における蛋白質合成を検出するために、SUnSET 法が利用できるかを検証した。クラミドモナスは、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドによって蛋白質の合成を完全に抑制されても、半分の長さの鞭毛は形成できる［1］。これは細胞体に存在する鞭毛前駆体が利用されるためと解釈されている。まず、一般的に蛋白質合成阻害剤として利用されているピューロマイシンがクラミドモナスの鞭毛再生にどの程度影響を持つかを検証した。その結果、野生株は 50 μg/ml の濃度では正常な鞭毛再生を示したが、1 mg/ml では鞭毛が半分までしか再生しなかった。この結果は、ピューロマイシンが高濃度において蛋白質合成阻害効果を持つことを意味する（図 1A）。その後の実験は、ピューロマイシンが蛋白質合成阻害効果を示さない 50 μg/ml の濃度で行った。

次に、鞭毛再生中の細胞にピューロマイシンが取り込まれるかどうかを検証した。まず、脱鞭毛直後の細胞の培地にピューロマイシンを添加し、120 分間鞭毛を再生させた。その後、サンプル化した細胞体を用いて抗ピューロマイシン抗体による Western blot を行ったところ、ピューロマイシンを加えなかった群においてはシグナルが全く検出されなかったのに対し、ピューロマイシンを加えた群ではピューロマイシン標識蛋白質を示すバンドがはっきりと検出された（図 1B）。また、鞭毛再生中の細胞を経時的にサンプル化し、ピューロマイシンの取り込み量を調べたところ、時間の経過とともにピューロマイシン標識蛋白質の量が増加することが分かった（図 1C）。これらの実験によって、クラミドモナスでも SUnSET 法によって新規合成蛋白質を検出することが可能であること、さらにその際のピューロマイシンの至適濃度が 50 μg/ml であることが分かった。

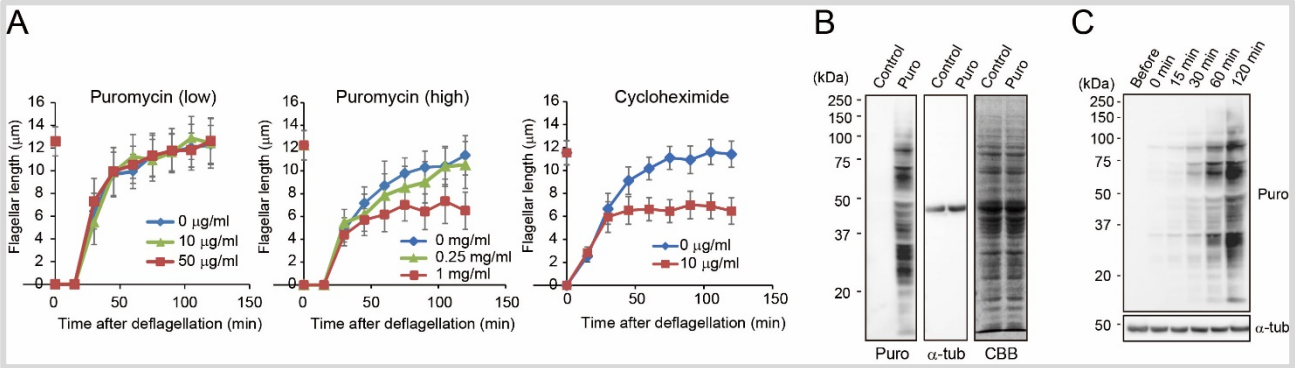


図 1. クラミドモナスに対する SUnSET 法の適用

A) クラミドモナスの野生株（cc124）の鞭毛再生速度。脱鞭毛直後にピューロマイシンおよびシクロヘキシミドを表記の濃度で処理した。

B) 抗ピューロマイシン抗体を用いた Western blot。脱鞭毛後、0 あるいは 50 μg/ml のピューロマイシンで処理した細胞のサンプルを抗ピューロマイシン抗体、抗αチューブリン抗体で検出した。

C) 鞭毛再生過程の細胞を経時的にサンプリングし、抗ピューロマイシン抗体によって Western blot を行った。ピューロマイシン標識蛋白質の量は時間経過とともに増加する。

2. ピューロマイシン標識蛋白質は再生中の鞭毛へ取り込まれる

次にピューロマイシン標識蛋白質が鞭毛へ取り込まれるかどうかを検証した。ピューロマイシン存在・非存在下で 2 時間鞭毛再生させた細胞の細胞骨格分画をスライドグラスに固着させ、抗ピューロマイシン抗体による免疫染色を行った。ピューロマイシン処理を行わなかった細胞はシグナルを示さなかったが、ピューロマイシン処理を行った細胞は鞭毛軸糸、鞭毛基部体において強いシグナルを示した（図 2A）。鞭毛蛋白質は細胞体において合成され、その後鞭毛内輸送系によって鞭毛内へ運び込まれる。この結果は、ピューロマイシン標識が付加されていても鞭毛蛋白質は正常に鞭毛内へ輸送されることを示す。

次にピューロマイシン存在・非存在下において鞭毛再生させた細胞から単離した鞭毛を用いて、抗ピューロマイシン

抗体による Western blot を行った。その結果、意外なことに、ピューロマイシン標識蛋白質のバンドの高さは銀染色ゲルにおける鞭毛蛋白質のバンドの高さと一致することが分かった（図 2B)。銀染色ゲルのバンドはピューロマイシン標識蛋白質と非標識蛋白質の両方を含むと考えられる。したがって、このことは、ピューロマイシン標識蛋白質は、全長の長さまで翻訳された産物のみが鞭毛に組み込まれるが、標識により合成途中で止まってしまった産物は、鞭毛内へ組み込まれないことを示唆する。

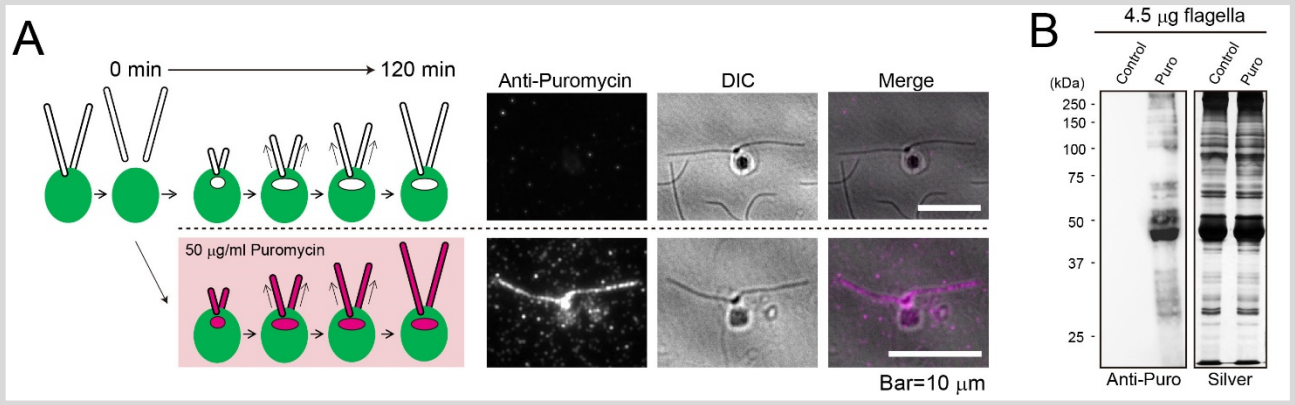


図 2. ピューロマイシン標識蛋白質は鞭毛に取り込まれる

A) 鞭毛再生中、ピューロマイシン処理した細胞の抗ピューロマイシン抗体による免疫染色。上段はピューロマイシン無処理の細胞、下段は 50μg/ml ピューロマシンで処理した細胞を示す。

B) ピューロマイシン処理細胞から単離した鞭毛の抗ピューロマイシン抗体による Western blot。

3. 新規合成蛋白質は鞭毛の先端から取り込まれる

鞭毛を構成する蛋白質は多くが鞭毛の先端から軸糸へ組み込まれる［4〜6］。新規合成蛋白質が再生中の鞭毛のどこに取り込まれるかを調べるために、ピューロマイシンの処理時間・タイミングを変えた細胞の免疫染色を行った（図 3)。脱鞭毛直後から 120 分もしくは 60 分間、ピューロマイシン処理を行った細胞は、鞭毛の全長にピューロマイシン標識蛋白質が局在することが分かった（図 3 の 1 段目と 4 段目)。しかし、脱鞭毛開始から 60 分間経ってから 60 分間ピューロマイシン処理を行った細胞は、鞭毛の先端のみにピューロマイシン標識蛋白質が局在することが分かった（図 3 の 2 段目)。一方、脱鞭毛直後から 30 分間だけピューロマイシン処理を行った細胞は鞭毛の根本が良く染まるが、先端はシグナルが弱かった（図 3 の 3 段目)。これらの結果は、新規に合成された鞭毛蛋白質が確かに鞭毛の先端から取り込まれることを示す。

4. ピューロマイシンの取り込みはシクロヘキシミドによって阻害される

最後に、ピューロマイシンの取り込みと蛋白質合成が共役しているかどうかを調べた。クラミドモナスは 10μg/ml のシクロヘキシミド（蛋白質合成阻害剤）存在下において、蛋白質を合成せず、その結果として半分長の鞭毛しか再生しない［1，7］。脱鞭毛直後の細胞に対してピューロマイシンと異なる濃度のシクロヘキシミドを処理し、ピューロマイシンの取り込みを Western blot によって検証した。その結果、1μg/ml 以上のシクロヘキシミド存在下では、鞭毛の再生が半分までしか行わず、ピューロマイシン標識蛋白質を示すシグナルが検出されないことが分かった（図 4)。この結果は、確かにピューロマイシンの取り込みと蛋白質合成が共役していることを示す。

5. 鞭毛前駆体の実体解明に向けて：SUnSET 法の利用

鞭毛は細胞体に存在する鞭毛前駆体という蛋白質複合体によって構築されるが、鞭毛前駆体が 1）どのように作られるか、2）どのような形態で存在するのか、3）どこに局在しているか、4）鞭毛内へ輸送されるために必要なシグナルを持つか、などについては全く分かっていない。本研究では、クラミドモナス鞭毛の新規合成蛋白質が SUnSET 法に

よって感度良く、簡便に標識できることが分かった。今後、ピューロマイシン標識蛋白質の動態や性質を詳しく調べていくことによって、鞭毛前駆体の実体に迫れるのはないかと考えている。なお、ここの結果は論文としてまとめ［8］、現在査読中である（2022 年 4 月 4 日現在）。

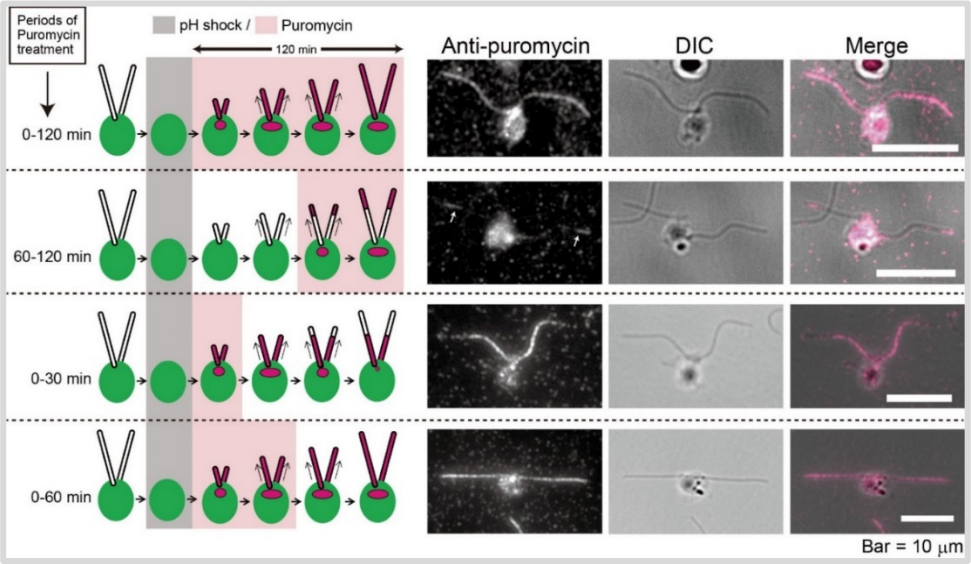


図 3. 新規合成蛋白質の鞭毛先端からの取り込み

pH ショックによって脱鞭毛した細胞に対して、表記の時間とタイミングでピューロマイシン処理を行い、その後抗ピューロマイシン抗体によって免疫染色を行った。新規合成蛋白質は鞭毛の先端から取り込まれる。

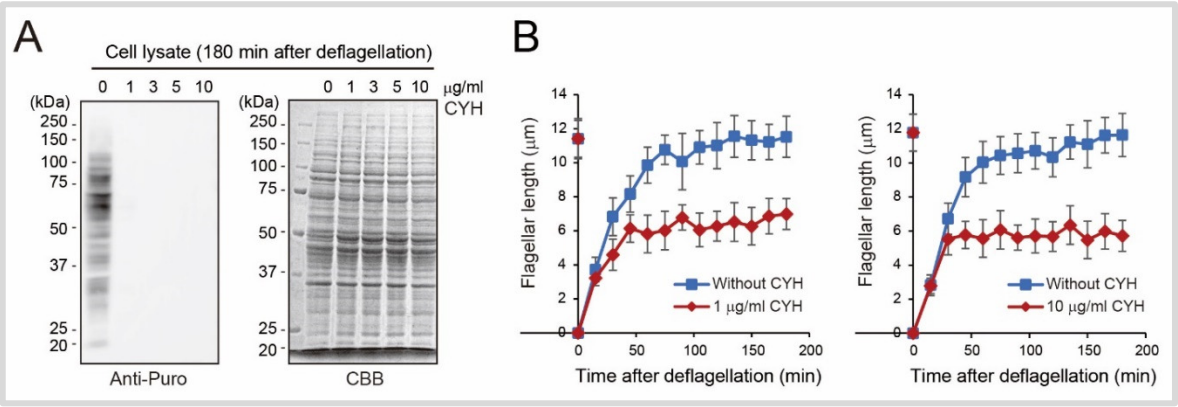


図 4. シクロヘキシミドによるピューロマイシンの取り込み阻害

A) 脱鞭毛後、ピューロマイシンと異なる濃度のシクロヘキシミドで処理した細胞の Western blot と CBB 染色ゲル。シクロヘキシミドはピューロマイシンの取り込みを強く阻害する。

B) シクロヘキシミド存在下における鞭毛の再生速度。

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基礎医学系解剖学講座構造生物学教室の小田賢幸教授ならびに加納夏美氏である。本研究にご支援を賜った上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げる。

文　献

1) Rosenbaum JL, Moulder JE, Ringo DL. (1969). Flagellar elongation and shortening in Chlamydomonas. The use of cycloheximide and colchicine to study the synthesis and assembly of flagellar proteins. J Cell Biol. 41, 600-619. PMID: 5783876. doi: 10.1083/jcb.41.2.600.

2) Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, and Pierre P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. Nat Methods. 6, 275-277. PMID: 19305406. doi: 10.1038/nmeth.1314.

3) Kubo T, Hirono M, Aikawa T, Kamiya R, and Witman GB. Reduced tubulin polyglutamylation suppresses flagellar shortness in Chlamydomonas. Mol Biol Cell. 26, 2810-2822. PMID: 26085508. doi: 10.1091/mbc.E15-03-0182.

4) Johnson KA, and Rosenbaum JL. (1992). Polarity of flagellar assembly in Chlamydomonas. J Cell Biol. 119, 1605-1611. PMID: 1281816. doi: 10.1083/jcb.119.6.1605.

5) Piperno G, Mead K, and Henderson S. (1996). Inner dynein arms but not outer dynein arms require the activity of kinesin homologue protein KHP1 (FLA10) to reach the distal part of flagella in Chlamydomonas. J Cell Biol. 133, 371-379. PMID: 8609169. doi: 10.1083/jcb.133.2.371.

6) Marshall WF, and Rosenbaum JL. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. J Cell Biol. 29:, 405-414. PMID: 11684707. doi: 10.1083/jcb.200106141. Epub 2001 Oct 29.

7) Lefebvre PA, Nordstrom SA, Moulder JE, and Rosenbaum JL. (1978). Flagellar elongation and shortening in Chlamydomonas. IV. Effects of flagellar detachment, regeneration, and resorption on the induction of flagellar protein synthesis. J Cell Biol. 78, 8-27. PMID: 149796. doi: 10.1083/jcb.78.1.8.

8) Kubo T, Kanou N, and Oda T. (2022). Puromycin is incorporated into regenerating flagella of Chlamydomonas reinhardtii as an indicator of nascent flagellar proteins. bioRxiv 2022.01.27.478094; doi: https://doi.org/10.1101/2022.01.27.478094.