

研究終了報告書

「繊毛の運動機構の原子レベルでの解明」

研究期間:2020年12月～2024年3月

研究者:市川宗巖

1. 研究のねらい

繊毛は真核生物の細胞表面から突出した細い毛のような構造体であり、一秒間に数十回波打つことで細胞の運動を駆動する他、細胞外の溶液の流れを生み出す。その内部構造は中心対複合体を9本のダブルレット微小管が取り囲んだ軸糸9+2構造を取っている。中心対複合体には多くのタンパク質が結合しているとともに、ダブルレット微小管は軸糸ダイニンやラジアルスポーク構造の結合の足場になるなど、実に600種類以上のタンパク質が形成している複雑な高次構造体である。本研究は、この動的な高次構造体である繊毛の立体構造を明らかにしてその運動機構を明らかにするとともに、繊毛の微小管構造を模倣して微小管構造を人工的に改変する新たな技術を開発することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

繊毛のダブルレット微小管内には30-40種類の微小管内タンパク質が結合している。これらの微小管内タンパク質は、ダブルレット微小管の構築に寄与していると考えられるが、この機構は十分に解明されていなかった。また、繊毛のダブルレット微小管外側に結合している外腕ダイニン複合体は、繊毛の運動を駆動する重要なモーターであるが、その活性化機構は分かっていなかった。これらを明らかにするため研究を行った。まず、クライオ電子顕微鏡観察・質量分析用に、テトラヒメナ繊毛・クラミドモナス鞭毛からの微小管画分の単離方法を最適化した(Bio-protocol, 2021, 共同責任著者)。クラミドモナス鞭毛の微小管画分を質量分析して得られたタンパク質候補のうち、PACRGタンパク質のX線結晶構造を明らかにした。クライオ電顕で得られたダブルレット微小管内でのPACRGの位置や、PACRG存在条件での微小管の電子顕微鏡観察・全反射蛍光顕微鏡観察の結果と合わせて、PACRGによるダブルレット微小管のB小管構築への機能の役割が明らかになった(Structure, 2021, 共著)。また、繊毛運動を駆動している外腕ダイニン複合体の、ダブルレット微小管上での立体構造をクライオ電顕による構造解析で得た。得られた活性状態の外腕ダイニン複合体構造を、他グループが報告した不活性な状態の外腕ダイニン複合体の立体構造と比較し、その構造変化を明らかにした。分子動力学シミュレーションの結果と合わせて、外腕ダイニン複合体の活性化機構のモデルを提示した(EMBO reports, 2021, 共同責任著者)。さらに、当初は予期していなかった新たな展開として、繊毛の微小管構造を模倣し、微小管を安定化する他、様々な微小管超構造を生み出す新たな技術を開発した(Science Advances, 2022, 共同筆頭著者)。この技術は、将来的にナノテクノロジーや、ドラッグデリバリーへと応用できる可能性がある。

(2) 詳細

(2)-1 繊毛構造の理解

(2)-1-1 繊毛ダブルレット微小管の構造解明

ダブルレット微小管内には 30-40 種類の微小管内タンパク質が結合している。これらの微小管内タンパク質は、ダブルレット微小管の構築に寄与していると考えられるが、この機構は十分に解明されていない。そこで、微小管内タンパク質によるダブルレット微小管構築機構を明らかにすることを目指した。まず、クライオ電子顕微鏡観察・質量分析用に、テトラヒメナ繊毛・クラミドモナス鞭毛からの微小管画分の単離方法を最適化した。これについてのプロトコール論文を共同責任著者として発表した(*Bio-protocol*, 2021, 共同責任著者, 業績 6)。精製した微小管画分を質量分析し、繊毛の微小管に結合しているタンパク質の候補を得た。このうち、PACRG タンパク質について、その結合タンパク質の MEIG1 との共結晶構造を得た(図1 A)。また、クラミドモナスダブルレット微小管のクライオ電子顕微鏡構造から PACRG はダブルレット微小管の B 小管の係留に関わることもわかった(図 1B)。さらに、PACRG 存在条件での微小管の電子顕微鏡観察・全反射蛍光顕微鏡観察によって PACRG がチューブリンを微小管にリクルートしていることもわかった。これらの結果から、PACRG によるダブルレット微小管の B 小管の構築への機能の役割が明らかになった。これらの内容については原著論文として発表した(*Structure*, 2021, 共著, 業績 1)。また、近年の哺乳類精子ダブルレット微小管の構造解析の結果から、哺乳類精子のダブルレット微小管の A 小管の内部には、テクチンのフィラメントが隙間なく詰まっていることが示された。これらの内容について、*Cell* に Preview 論文を発表した(*Cell*, 2023, 責任著者, 業績 4)。

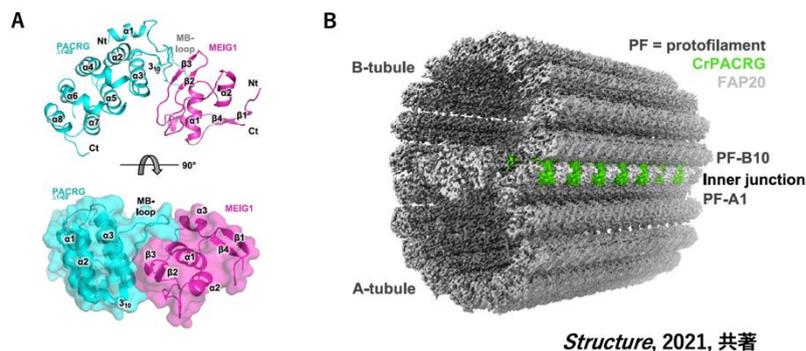


図1. 繊毛タンパク質PACRGの構造解析

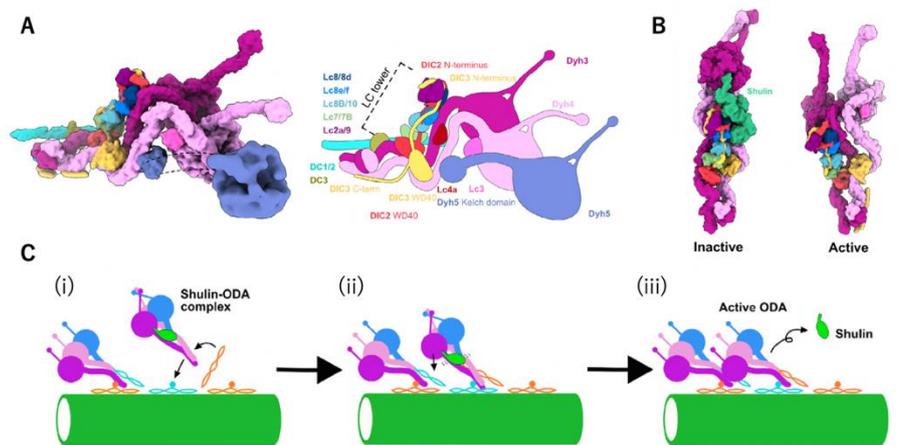
A. PACRG-MEIG1のX線結晶構造.

B. クライオ電子顕微鏡構造解析で得たダブルレット微小管構造内でのPACRGの立体構造.

(2)-1-2 繊毛のダイニンの制御機構の解明

外腕ダイニン複合体は、繊毛の波打ち運動を駆動する重要なモータータンパク質であるが、その活性化機構は明らかになっていなかった。そこで、外腕ダイニン複合体の活性化機構を明らかにすることを目指した。繊毛虫テトラヒメナ繊毛からのダブルレット微小管の単離方法を最適化し、外側に結合している外腕ダイニン複合体を保持したダブルレット微小管を精製し、クライオ電子顕微鏡法によって構造解析することでダブルレット微小管上の外腕ダイニン複合体の立体構造を5.5-7 Å分解能で得た。このクライオ電子顕微鏡構造をもとに、外腕ダイニン複合体のモデル構造を構築した(図 2A)。まず、外腕ダイニンのダブルレット微小管への結合様式を調べた。外腕ダイニンは、Docking Complex (DC)を介してダブルレット微小管上に係留されていた。ダブルレット微小管上で、コイルドコイルのDC1/2が存在しており、その上に結合している球状のDC3が結合し、24 nm周期を形成していた。外腕ダイニンのDyh3重鎖がDC3

に結合していた。これは、外腕ダイニンの中鎖・軽鎖がダブルレット微小管に結合しているだろうという先行研究の推定とは異なるものであった。得られた構造を、近年他グループから報告された繊毛に組み込まれる前の不活性な状態の Shulin-外腕ダイニン複合体の立体構造 (Mali, G. R. *et al.*, *Science*, 2021)と比較することで、その構造変化を明らかにした(図 2B)。不活性な状態の Shulin-外腕ダイニン複合体は、三頭がスタックした構造をとっているのに対し、ダブルレット微小管上では、三頭が並行に並んでいた。また、尾部ドメインにも構造変化が起きていた。構造変化が起きていた位置は、外腕ダイニンが Docking Complex 上に結合している領域と一致していた。そのため、不活性の状態の Shulin-外腕ダイニン複合体がダブルレット上の Docking Complex に結合することが、尾部の構造変化を誘起し、制御タンパク質 Shulin の解離を引き起こすと推定された。そこで、この仮説を検証するため、不活性な Shulin-外腕ダイニン複合体の構造をもとに、分子動力学シミュレーションによる解析を行った。Docking Complex への結合を模倣して、Shulin-外腕ダイニンの Dyh3 重鎖に対して力を加え、その状態での Shulin の結合を調べた。力を加えない場合に比べて、力を加えた場合は Shulin の解離が有意に観測された。このため、Shulin-外腕ダイニンがダブルレット微小管に結合すること自体が、Shulin の解離を引き起こすということが示唆された。これらの結果から、不活性な状態の Shulin-外腕ダイニンが、Docking complex に結合し、それによって誘引された尾部の構造変化が Shulin の結合を不安定化し、Shulin が解離した後、リンカー・頭部ドメインへと構造変化が伝播していき、最終的にダブルレット微小管上で働いている際の外腕ダイニンの構造へと変化していくという活性化機構のモデルを提示することができた。



EMBO reports, 2021, 共同責任著者

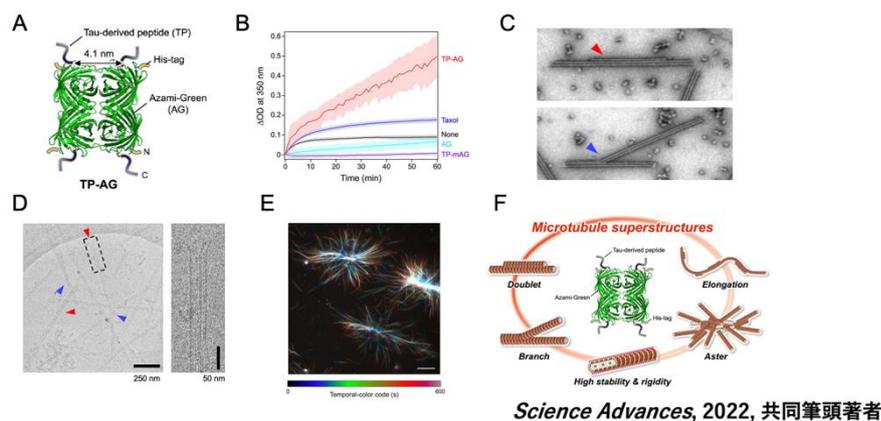
図2. 外腕ダイニンの立体構造とその活性化機構

- A. ダブルレット微小管上での外腕ダイニンの立体構造とモデル.
- B. 不活性なShulin-外腕ダイニン複合体と活性状態の比較.
- C. 外腕ダイニンの活性化機構のモデル.

これらの外腕ダイニン複合体の活性化機構の内容について、原著論文として報告した (EMBO reports, 2021, 共同責任著者, 業績 2) (図 2C)。また、外腕ダイニン複合体に関連する総説論文を発表した(Biophysics and Physicobiology, 2023, 共著, 業績 5)。

(2)-2 繊毛の微小管構造を模倣した微小管超構造の構築

繊毛の微小管内には、微小管内タンパク質が結合しており、安定化されている。また、細胞質の微小管や、*in vitro* で重合した微小管がシングレット微小管であるのに対し、繊毛内にはダブルット微小管が存在する他、ヒトの精子鞭毛ではダブルット微小管が分岐して2本のシングレット微小管に分岐していくような現象も知られている(Zabeo, D *et al.*, *FEBS Lett.*, 2019)。そこで、**繊毛内の微小管構造を模倣し、*in vitro* で微小管内にタンパク質を封入することで微小管構造を安定化したり、ダブルットや分岐を形成することのできる新たな技術の開発を目指した。**このため、四量体の蛍光タンパク質 Azami Green (AG)を足場として用い、His-tag 及び Tau-peptide (TP)配列を付加した(図 3A)。Azami Green は微小管とは関係のないタンパク質であり、それ単独では微小管とは相互作用をしない。His-tag は、負電荷に帯電した微小管外側へと結合することを期待した。また、TP 配列は、Tau タンパク質の微小管内腔に結合すると考えられている領域の配列である(Inaba, T. and Matsuura, K, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2021)。TP-AG は、四量体であるため、一分子につき His-tag または TP 配列が各4つ存在することになり、大きな効果が生まれることを期待した。構築された His-tag, TP 配列を有する AG (以下、TP-AG と呼称)は、強い微小管重合促進能を示した(図 3B)。これは、よく知られている微小管安定化剤 taxol を上回る強い効果であった。また、TP-AG 存在条件下で重合した微小管は、TP-AG 非存在条件下で重合した微小管よりも長さが長いことも電子顕微鏡観察・蛍光観察の結果明らかになった。さらに、重合条件によって、TP-AG の結合を微小管内・外へとある程度コントロールすることもできた。TP-AG 存在の各条件下で重合した微小管を電子顕微鏡で観察を行ったところ、TP-AG 存在条件下で重合した微小管は、TP-AG 非存在条件下と比べて、真っ直ぐな構造を取っていることがわかった。このように微小管構造そのものを真っ直ぐにするタンパク質はこれまで知られておらず、さらに、このような効果を外来タンパク質で引き起こすことができたのは大きな成果である。**TP-AG 存在条件下で重合させた場合、シングレット微小管だけではなく、ダブルット微小管や、分岐を形成している微小管も観察された(図 3C, D)。**分岐を形成するダブルット微小管というのは非常に稀な現象であり、特に *in vitro* でこのような構造体を作ることができた報告は今までない。さらに、TP-AG とチューブリンの重合条件を調整することで、アスター状構造を構築することもできた(図 3E)。



Science Advances, 2022, 共同筆頭著者

図3. 繊毛の微小管構造を模倣した微小管超構造の構築

- TP-AGのデザイン。
- TP-AGによる微小管重合の促進。
- ネガティブ染色によるTP-AG存在下でのダブルットまたは分岐形成の確認。
- クライオ電顕法によるTP-AG存在下でのダブルットまたは分岐形成の確認。
- TP-AGの存在下で形成された微小管のアスター状構造。
- TP-AGによる様々な微小管超構造の形成。

以上のように、一種類の外来タンパク質で多彩な微小管超構造を構築することができる新たな技術を、世界に先駆け開発した(図 3F)。本内容は、*Science Advances* 誌に発表した(*Science Advances*, 2022, 共同筆頭著者)。本内容についてはプレスリリースも行き、日本経済新聞電子版や、科学新聞でも報道されるなど、社会からの注目も集めた。

3. 今後の展開

繊毛という細胞の極小モーターの構造・運動を理解することで、今後(5-10 年後程度)で、新たなナノマシンの開発へと役立てることができると考えている。具体的には、本研究で明らかになった、ダブルレット微小管に結合した活性状態の外腕ダイニン複合体の構造情報をもとに、新たなナノデバイスをデザインする。繊毛ダブルレット微小管上で、外腕ダイニン複合体は一列に並んでいるが、本研究の結果、隣り合う外腕ダイニン複合体がどのように相互作用しているかも明らかになった。また、外腕ダイニン複合体の活性化機構についても明らかになった。そのため、外腕ダイニン複合体を遺伝的に改変し、隣り合う外腕ダイニンどうしを導入したタグで繋ぎつつ、活性化状態に固定する。こうして活性状態の外腕ダイニンを一列で繋がった状態で単離し、*in vitro* での微小管グライディングアッセイに用いることで、モーターとレールの機能を同時に果たす画期的なナノデバイスを発現する可能性が考えられる。これによって、目的の位置に効率的に物質を輸送できることが可能となる。

また、繊毛の微小管を模倣した微小管の安定化・微小管超構造の生成については、今後、多くの応用の可能性がある。本来微小管とは関係のないタンパク質を微小管内外にリクルートすることができたということは、今後、微小管をレールに用いたり、薬剤を微小管内に封入してドラッグデリバリーに応用するための新たな指針を示したものである。また、本研究で開発された TP-AG は、微小管を強く安定化することが明らかになった。ヒトでも繊毛の微小管が不安定化することで、全身の多岐に渡る症状を示す繊毛病の病態が引き起こされることが知られている。微小管を安定化する外来タンパク質を用いてこのような病態を治療する新たな治療法の確立に役立つ可能性がある。微小管安定化剤の Taxol は、細胞分裂を阻害するため、抗癌剤としても用いられる。TP-AG は、taxol を上回る微小管安定化を示した。そのため、新たな抗癌剤の治療法の開発に利用できる可能性もある。TP-AG は微小管全体を真っ直ぐにすることも明らかになった。このような性質は、微小管のまっすぐな領域のみ、あるいは曲がった領域のみに結合する微小管結合タンパク質の研究をする上でも利用できる可能性がある。また、*in vitro* で微小管を安定化したり、ダブルレット・分岐などを形成することで、ナノマテリアルとしての応用も可能である。現状のこの系では、分岐形成の位置などを厳密にコントロールすることはできないが、今後、数年以内に、分岐形成の位置などについてもコントロールできるように改善を進めていきたい。

4. 自己評価

繊毛という動的な高次構造体の構築を明らかにするという当初の目標通り、ダブルレット微小管の構成タンパク質の結晶構造を報告した(*Structure*, 共著)。また、ダブルレット微小管上の外腕ダイニンの構造を明らかにすることができた(*EMBO reports*, 共同責任著者)。これらの分野にとって重要ではあるが想定範囲内の結果に留まらず、研究開始当初は予期し得なかった微小管構造の改変技術の開発という先駆的で極めてインパクトのある結果を出すことができた(*Science Advances*, 2022, 共同筆頭著者)。本研究内容は、関連分野だけでなく、日本経済新聞電子版や、科学新聞

でも報道され、社会にとっても注目を集める内容となった。今後、これらの研究結果は、新たなナノデバイスや、ドラッグデリバリーの開発へも応用できるものであり、今後の科学技術、ひいては社会の発展に対しても重要な基礎となると考える。

成果としても、期間中に *Cell* (Preview 論文, 責任著者), *Nature Communications* (共著), *Science Advances* (共同筆頭著者), *EMBO reports* (共同責任著者), *Structure* (共著), *eLife* (共著), *Biophysics and Physicobiology* (総説, 共著), *Bio-protocol* (共同責任著者)を發表することができ、予想を上回る生産性を示すことができた。

以上のことから、本研究は、当初期待した以上の大きなインパクト・成果を上げることができたと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

<p>1. Nimra Khan[†], Dylan Pelletier[†], Thomas S. McAlear, Nathalie Croteau, Simon Veyron, Andrew N. Bayne, Corbin Black, Muneyoshi Ichikawa, Ahmad Abdelzaher Zaki Khalifa, Sami Chaaban, Igor Kurinov, Gary Brouhard, Susanne Bechstedt, Khanh Huy Bui, Jean-François Trempe*. “Crystal structure of human PACRG in complex with MEIG1 reveals roles in axoneme formation and tubulin binding”, <i>Structure</i>, 2021, vol. 29, No. 6, 572-586, 共著</p>
<p>繊毛タンパク質の PACRG は、ダブルレット微小管のインナージャンクションと呼ばれる領域に結合している。本研究では、ヒト PACRG とアダプタータンパク質 MEIG1 との複合体の結晶構造を得た。クラミドモナスダブルレット微小管のクライオ電顕構造との比較や、PACRG が微小管表面にチューブリンをリクルートする結果と合わせて、繊毛のダブルレット微小管構築における PACRG の機能を示した。</p>
<p>2. Shintaroh Kubo, Shun Kai Yang, Corbin S Black, Daniel Dai, Melissa Valente-Paterno, Jacek Gaertig, Muneyoshi Ichikawa*, Khanh Huy Bui*. “Remodeling and activation mechanisms of outer arm dyneins revealed by cryo-EM”, <i>EMBO reports</i>, 2021, vol. 22, No. 7, e52911, 共同責任著者</p>
<p>外腕ダイニン、繊毛の運動を駆動するモータータンパク質である。繊毛に組み込まれる前の外腕ダイニンは、制御タンパク質が結合した不活性な状態を取っているということが近年明らかになった。しかしながら、外腕ダイニンがどのように活性化するかは分かっていなかった。そこで、ダブルレット微小管上に結合した外腕ダイニンの立体構造をクライオ電顕で明らかにし、不活性な外腕ダイニン構造と比較し、外腕ダイニンの活性化機構のモデルを提唱した。</p>
<p>3. Hiroshi Inaba[†], Yurina Sueki[†], Muneyoshi Ichikawa[†], Arif Md Rashedul Kabir, Takashi Iwasaki, Hideki Shigematsu, Akira Kakugo, Kazuki Sada, Tomoya Tsukazaki, Kazunori Matsuura. “Generation of stable microtubule superstructures by binding of peptide-fused tetrameric proteins to inside and outside”, <i>Science Advances</i>, 2022, vol. 8, No. 36, eabq3817, 共同筆頭著者</p>

in vitro で微小管構造を操作するため、His タグと Tau 由来ペプチド(TP)を融合した四量体蛍光タンパク質 Azami Green、TP-AG を設計した。TP-AG は、微小管内外に結合し、TP-AG の結合は微小管の形成を促進し、安定した微小管を生成した。また、TP-AG は、チューブリンを微小管外側にリクルートすることによって、ダブルレットや分岐構造などの形成を誘導した。本研究は、微小管ベースのナノマテリアルを構築する新たな枠組みである。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のもは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yuzhong Gu, Yimeng Zhao, **Munevoshi Ichikawa***.

“Tektin makes a microtubule a ‘micropillar’”,

Cell, 2023, vol. 186, No.13, 2725-2727, **Preview 論文, 責任著者**

クライオ電子顕微鏡法による構造解析の結果、哺乳類の精子鞭毛のダブルレット微小管の A 小管内は、単細胞真核生物の繊毛・鞭毛のダブルレット微小管 A 小管と異なり、テクチンタンパク質の束が内部をほぼ完全に塞いでいるということが近年の研究結果から分かってきた。これらの近年の研究内容をプレビュー論文としてまとめた。

2. Toshiki Yagi*, Akiyuki Toda, **Munevoshi Ichikawa**, Genji Kurisu.

“Regulation of motor activity of ciliary outer-arm dynein by the light chain 1; Implications from the structure of the light chain bound to the microtubule-binding domain of the heavy chain”,
Biophysics and Physicobiology, 2023, vol. 20, No. 1, e200008, **総説, 共著**

繊毛の運動を駆動する重要なモーターである外腕ダイニン複合体は、多くのサブユニットから構成されている。最も重要なのはモーター活性を持つ重鎖である。近年の研究結果から、軽鎖 LC1 が、 γ 重鎖の微小管結合ドメインに結合し、その活性を調整していることが明らかになってきた。これらの軽鎖 LC1 についての近年の研究内容を総説としてまとめた。

3. Corbin Black†, Daniel Dai†, Katya Peri, **Munevoshi Ichikawa***, Khanh Huy Bui*.

“Preparation of Doublet Microtubule Fraction for Single Particle Cryo-electron

Microscopy”, *Bio-protocol*, 2021, vol. 11, No. 11, e4041, **プロトコル論文, 共同責任著者**

本プロトコル論文では、テトラヒメナ繊毛・クラミドモナス鞭毛から、クライオ電子顕微鏡法による単粒子解析や、質量分析に適したダブルレット微小管の調整方法を詳細に解説している。繊毛を脱膜して軸系 9+2 構造を得た後、ATP によって軸系ダイニンによる滑り出しで一本一本のダブルレット微小管を単離して厚みの少ないサンプルを作るとともに、超音波破碎で、ダブルレット微小管を断片とすることで、氷包埋内でランダムな配向を得ることができる。

4. Cheng Shen†, Yuqing Zhang†, Wenwen Cui†, Yimeng Zhao, Danqi Sheng, Xinyu Teng, Miaoqing Shao, **Munevoshi Ichikawa**, Jin Wang*, Motoyuki Hattori*.

“Structural insights into the allosteric inhibition of P2X4 receptors”,

Nature Communications, 2023, vol. 14, 6437, **共著**

ATP 活性化陽イオンチャネルである P2X4 は、免疫系や中枢神経系、特に神経因性疼痛に関わる。ゼブラフィッシュ P2X4 受容体と、その 2 種類の特異的拮抗剤との複合体構造を、

クライオ電子顕微鏡法で明らかにした。得られた構造をもとに、電気生理学的手法による変異体解析を行い、ゼブラフィッシュおよびヒト P2X4 受容体のアロステリック阻害に重要な残基についても同定した。これらの結果から、P2X4 のアロステリック阻害機構を明らかにした。

5. Danqi Sheng, Chenqian Yue, Fei Jin, Yao Wang, Muneyoshi Ichikawa, Ye Yu, Chang-Run Guo*, Motoyuki Hattori*.

“Structural insights into the orthosteric inhibition of P2X receptors by non-ATP-analog antagonists”, *eLife*, 2023, vol. 12, RP92829, 共著

※reviewed preprint として *eLife* 上で既に発表 (アクセプトに相当)

哺乳類 P2X7 受容体と、その 2 種類の競合的拮抗剤である PPNDs および PPADS との複合体のクライオ電子顕微鏡構造を、それぞれ 3.3 Å および 3.6 Å の分解能で決定し、パッチクランプ法および MD シミュレーションによって、構造情報に基づく変異体解析についても行った。これらの結果から、PPADS/PPNDs の結合部位・作用機序が明らかとなった。

6. “【プレスリリース】ペプチド融合タンパク質を用いた微小管「超」構造体の構築に初めて成功～分子ロボットなどのナノ材料への応用や繊毛・鞭毛の形成原理の解明に期待～”，

プレスリリース, 2022, <http://www.naist.jp/pressrelease/2022/09/009218.html>

-日本経済新聞電子版, 『鳥取大・奈良先端科技大・北大、ペプチド融合タンパク質を用いた微小管「超」構造体の構築に成功』, 2022/09/08 報道.

-科学新聞, 『ペプチド融合タンパク質利用 微小管の超構造体を構築』, 2022/09/16 報道.