

様式 F-7-1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（令和元年度）

所属研究機関名称	奈良先端科学技術大学院大学		機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	助教		
	氏名	市川 宗巣		

1. 研究種目名 研究活動スタート支援

2. 課題番号 19K23726

3. 研究課題名 微小管内タンパク質のチューブリン格子構造構築への影響の解明

4. 補助事業期間 令和元年度～令和2年度

5. 研究実績の概要

これまでの研究から引き続き、織毛虫テトラヒメナ織毛から微小管内タンパク質構造を保持したダブレット微小管を単離して氷包埋し、クライオ電子顕微鏡で撮像した。画像数の増大・構造解析手法の改善を行って、得られた電顕像を用いて構造解析を行った結果、チューブリン格子・微小管内タンパク質の立体構造を、これまで我々が報告していた分解能(8.6 nm)からさらに向上し、4.3 nmという近原子分解能で得た。これにより、ダブレット微小管のチューブリン格子構造が、一様ではなく、領域によって多彩な構造を取っていることが分かった。これは、多様な微小管内タンパク質の結合が、チューブリン格子構造の構築に内側から影響していることを示唆した。

さらに、これまで用いてきたテトラヒメナ由来ダブレット微小管だけではなく、緑藻クラミドモナス鞭毛から単離したダブレット微小管についても同様にクライオ電子顕微鏡法で構造解析し、4.5 nm分解能で立体構造を得た。インナージャンクションと呼ばれるダブレット微小管のA小管とB小管の境界領域に注目してさらに解析することで、テトラヒメナダブレット微小管・クラミドモナスダブレット微小管のインナージャンクション構造をそれぞれ、3.9 nm, 3.6 nm分解能で得た。これにより、異なる種における微小管内タンパク質の構造の差異も明らかになった。これらの微小管内タンパク質構造の違いが、織毛鞭毛における異なる波形の制御機構に繋がっていると考えられる。微小管内タンパク質を保持したダブレット微小管を質量分析法によって解析することで得た微小管内タンパク質の候補と、クライオ電子顕微鏡法で得た構造を比較することで、いくつかの微小管内タンパク質の同定も行った。

6. キーワード

織毛 微小管 X線結晶構造解析 クライオ電子顕微鏡

7. 現在までの進捗状況

区分 (1) 当初の計画以上に進展している。

理由

申請した研究計画は、微小管内タンパク質のチューブリン格子構造構築への影響を調べるというものであった。テトラヒメナ由来ダブレット微小管の立体構造をクライオ電子顕微鏡法を用いて高分解能で得ることで、微小管内タンパク質の内側への結合が、チューブリン格子構造を均一ではなく、多様かつ複雑な構造へと固定することを明らかにすことができた。この内容については、申請者が筆頭著者として期間中に論文としてPNASに発表した(Ichikawa et al., 2019)。研究計画では、微小管内タンパク質の同定とダブレット微小管構造内の位置同定も行う予定であったが、クラミドモナスのダブレット微小管を用いて質量分析・クライオ電子顕微鏡による構造解析を行うことで、いくつかの微小管内タンパク質について同定・位置決定も行うことができた。これらの結果については、共同筆頭著者としてeLifeに論文を投稿し、当該年度内に受理された(Khalifa, Ichikawa et al., 2020)。これらのことから、本予算の支援を受けて大きな成果を上げたと言える。

8. 今後の研究の推進方策

今後はさらに、同定した個々の微小管内タンパク質に着目してその性質・立体構造について調べていく予定である。個々の微小管内タンパク質を大腸菌において発現し、精製した後、*in vitro*でチューブリンと共に重合させ、その微小管重合への影響を調べる予定である。また、収量良くかつ高純度で精製することができれば、結晶化・X線結晶構造解析も試み、その立体構造を原子分解能で得ていく予定である。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

次年度に、各微小管内タンパク質の結晶化を行うこととなった。また、次年度に所属研究室でも電子顕微鏡によるタンパク質の構造解析の系を立ち上げることとした。これらの理由により、より多くの予算が次年度に必要となつたため、初年度に使用する額を抑えた。

10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

[雑誌論文] 計2件 (うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件)

1. 著者名 Ichikawa Muneyoshi、Khalifa Ahmad Abdelzaher Zaki、Kubo Shintaroh、Dai Daniel、Basu Kaustuv、Maghrebi Mohammad Amin Faghfor、Vargas Javier、Bui Khanh Huy	4. 卷 116
2. 論文標題 Tubulin lattice in cilia is in a stressed form regulated by microtubule inner proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 19930 ~ 19938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1073/pnas.1911119116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Khalifa Ahmad Abdelzaher Zaki、Ichikawa Muneyoshi、Dai Daniel、Kubo Shintaroh、Black Corbin Steven、Peri Katya、McAlear Thomas S、Veyron Simon、Yang Shun Kai、Vargas Javier、Bechstedt Susanne、Trempe Jean-Francois、Bui Khanh Huy	4. 卷 9
2. 論文標題 The inner junction complex of the cilia is an interaction hub that involves tubulin post-translational modifications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.7554/eLife.52760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名

市川宗巖 , Khalifa Ahmad Abdelzaher Zaki , 久保 進太郎 , Basu Kaustuv, Daniel Dai , Amin Maghrebi , Javier Vargas , Bui Khanh Huy

2. 発表標題

微小管内タンパク質によるチューブリン格子構造の内側からの制御

3. 学会等名

第57回日本生物物理学会年会

4. 発表年

2019年

1. 発表者名

Ichikawa Muneyoshi、Khalifa Ahmad Abdelzaher Zaki、Kubo Shintaroh、Dai Daniel、Basu Kaustuv、Maghrebi Mohammad Amin Faghfor、Vargas Javier、Bui Khanh Huy

2. 発表標題

Microtubule Inner Proteins Weave Into The Doublet Microtubule Tubulin Lattice

3. 学会等名

2019 ASCB|EMBO Meeting (国際学会)

4. 発表年

2019年

1. 発表者名

Dai Daniel , Ichikawa Muneyoshi , Peri Katya, Rebinsky Reid, Bui Khanh Huy

2. 発表標題

Identifying and Mapping the Protein Composition of the Central Pair Apparatus through Proteomics

3. 学会等名

2019 ASCB|EMBO Meeting (国際学会)

4. 発表年

2019年

1. 発表者名

Khalifa Ahmad Abdelzaher Zaki、Ichikawa Muneyoshi、Dai Daniel、Kubo Shintaroh、Black Corbin Steven、Peri Katya、McAlear Thomas S、Veyron Simon、Yang Shun Kai、Vargas Javier、Bechstedt Susanne、Trempe Jean-Francois、Bui Khanh Huy

2. 発表標題

The inner junction complex of the cilia is an interaction hub that involves tubulin post-translational modifications.

3. 学会等名

64th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)

4. 発表年

2020年

〔図書〕 計0件

1 1 . 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

1 2 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	McGill大学	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

1 4 . 備考

プレスリリース

<http://www.naist.jp/pressrelease/2019/09/006167.html>

所属機関を通じて、Ichikawa et al., PNAS (2019)の日本語プレスリリース「細胞表面で波打つ纖毛の微小管の超微細な立体構造の観察に 世界で初めて成功、その内側からの補強機構を解明 ~不妊など纖毛病の病態解明にも期待~」を出すことにより、原著論文の内容を一般大衆にも分かりやすく解説した。