

課題番号	LS027
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	新しいイメージング手法による鞭毛の分子機構
研究機関・ 部局・職名	東京大学・大学院医学系研究科・教授
氏名	吉川 雅英

1. 当該年度の研究目的

鞭毛・繊毛は細胞に於いて精子や気管表皮における運動など、様々な生命現象に於いて非常に重要な役割を果たしている。鞭毛は、数百種類の分子によって構成される非常に複雑な分子機械だが、本研究は、鞭毛を駆動するモーターである軸系ダイニンが制御される仕組みについて、機能と構造の両面で新しいイメージング手法を使ってアプローチしている。

プロジェクトの中では前半が主に新しいイメージング手法の技術開発に重きをおいたのに対し、後半にあたる平成25年度は、開発されたイメージング手法を、軸系ダイニン制御遺伝子の同定・遺伝子操作に重きを置いて研究をすすめる。これによって、細胞内において軸系ダイニンがon/off制御されるメカニズムについて構造と機能の両面から解明することを目指した。

2. 研究の実施状況

H25 年度は、「クライオ電子線トモグラフィー・遺伝子特異的構造標識」技術の開発により研究が大きく進展した。このクライオ電子線トモグラフィーのための標識技術は、雑誌論文 2 として発表した。この方法は、まず、鞭毛の生理的な機能や構造をできるだけ保つために、ターゲットとなるタンパク質に比較的短い標識となるタンパク質を付加する。この標識は、クライオ電子顕微鏡で観察するときにはストレプトアビジンを加えることで、細胞内でターゲットとなるタンパク質の三次元位置を決定することが出来る、いわば、光学顕微鏡の GFP に相当する革新的な方法である(図 1)。

昨年度、既に我々は外腕ダイニンの中間鎖である IC2 が鞭毛運動制御機構の「ハブ」として働くことを明らかにしていた。雑誌論文 2: Oda & Kikkawa, *J. Struc. Biol.* 2013 では、上記の標識法について発表すると同時に、外腕ダイニン IC2 は、まさに外腕ダイニンと内腕ダイニンをつなぐ構造的な「ハブ」に相当する位置に存在することがはっきりと示した。(図 1)

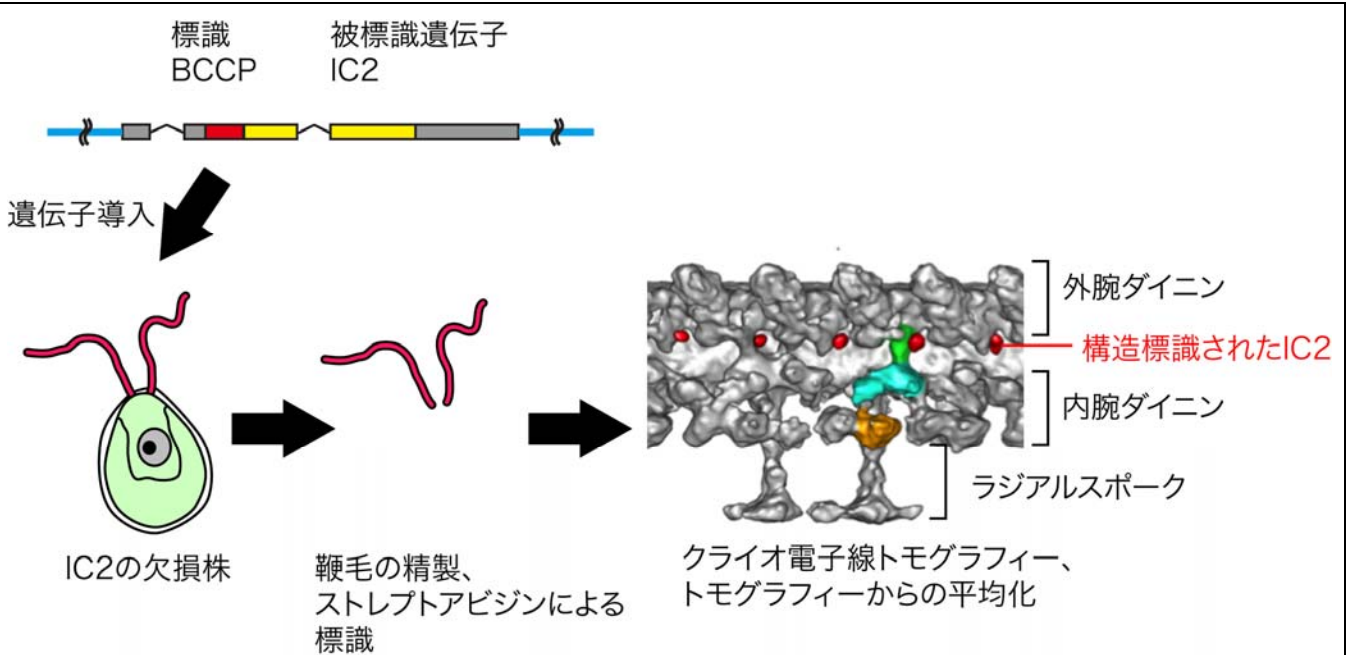


図 1 クライオ電子線トモグラフィー・遺伝子特異的構造標識法により明らかになった外腕ダイニン中間鎖 IC2 の位置 (赤)。

クライオ電子線トモグラフィー・遺伝子特異的構造標識法は、これ以降様々な鞭毛タンパク質の三次元位置を決定するのに使われている。

○論文4: Oda et al, *J. Cell Biol.* 2014

本論文では特定の位置のダイニンを「オン」にするための情報が、中心微小管対微小管からラジアルスポークを通して伝わるメカニカル(機械的)なシグナルであることを示した。これを示すために、ラジアルスポークの様々なタンパク質の位置を上記の方法で特定し、以下の様に四種類のタンパク質のN末端、C末端を決定している。(図2)

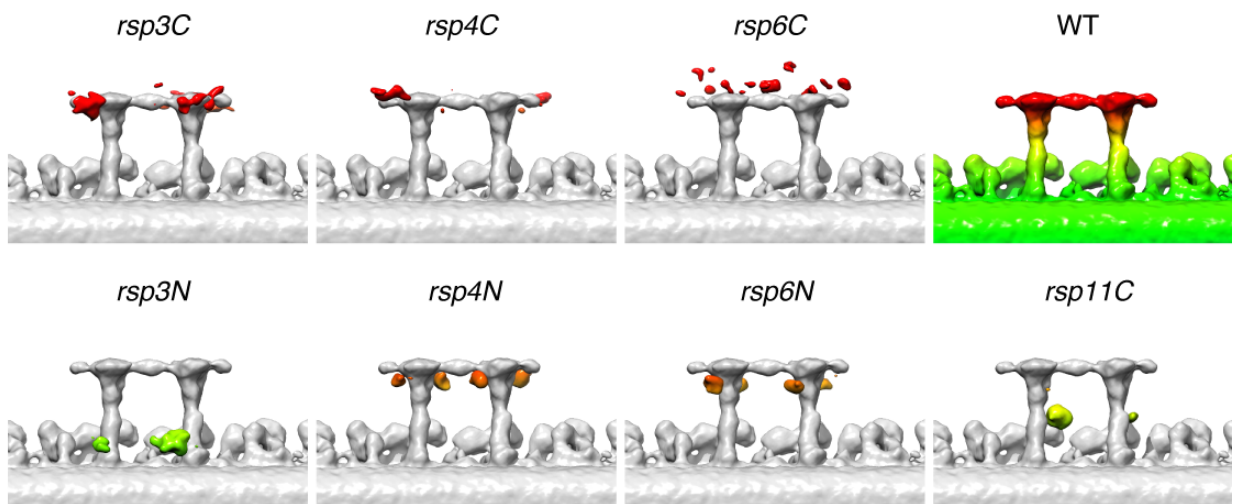


図 2 鞭毛の on/off を制御するラジアルスポークと、構成タンパク質の標識結果

○ 論文5: Yanagisawa et al, J. Cell Sci. 2014

本論文では、鞭毛運動が平面内に限定される仕組みの一つが FAP20 と呼ばれるタンパク質が担っていることを解明した(図3)

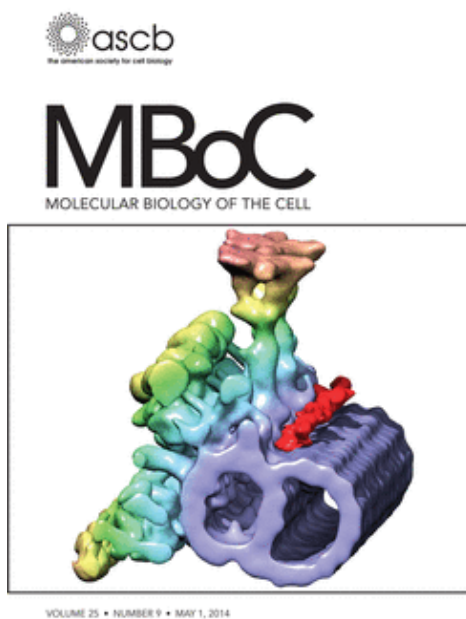


図 3 FAP20 タンパク質 (赤で示す) が、鞭毛内の微小管と微小管のつなぎ目にあることを示したクライオ電子線トモグラフィーによる結果。雑誌 Mol. Biol. Cell の表紙に採用された。

### 3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 7 件
計 8 件	<p>1. <b>Kikkawa M.</b> (レビュー) Big steps toward understanding dynein. <i>Journal of Cell Biology</i>, 202:15-23, 2013</p> <p>2. Oda T. and <b>M. Kikkawa</b> Novel structural labeling method using cryo-electron tomography and biotin-streptavidin system. <i>Journal of Structural Biology</i>, 183:305-11, 2013</p> <p>3. Takarada, O., N. Nishida, <b>M. Kikkawa</b>, and I. Shimada Backbone and side-chain 1H, 15N and 13C resonance assignments of the microtubule-binding domain of yeast cytoplasmic dynein in the high and low-affinity states. <i>Biomol NMR Assign.</i>, epub ahead of print, 2013</p>

	<p>4. Oda T., H. Yanagisawa, T. Yagi, and <b>M. Kikkawa</b>          Mechano-signaling between Central Apparatus and Radial Spokes Controls Axonemal Dynein Activity  <i>Journal of Cell Biology</i>, 204:807-819, 2014</p> <p>5. Yanagisawa H. A., G. Mathis, T. Oda, M. Hirono, E. A. Richey, H. Ishikawa, W. F. Marshall, <b>M. Kikkawa</b>, and H. Qin.          FAP20 is an inner junction protein of doublet microtubules essential for both the planar asymmetrical waveform and stability of flagella in Chlamydomonas  <i>Molecular Biology of Cell</i>, 25:1472-1483, 2014</p> <p>6. 荒井 祐介, 若林 憲一, 吉川 雅英, 奥 寛雅, 石川 正俊          「暗視野顕微鏡法におけるクラミドモナスの三次元トラッキング」          日本ロボット学会誌, 31:1028-35, 2013</p> <p>7. 小田賢幸、吉川雅英          「クラミドモナスを用いた鞭毛運動の多角的解析—電子顕微鏡から細胞生物学まで—」          顕微鏡, 48:94-99, 2013</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件</p> <p>1. Fujita S., T. Matsuo, M. Ishiura, and M. Kikkawa          “High-throughput phenotyping of Chlamydomonas swimming mutants based on nanoscale video analysis”  <i>Biophysical Journal</i>, in press, 2014</p>
<p>会議発表 計 15 件</p>	<p>専門家向け 計 15 件</p> <p>(1) 吉川雅英、第4回回折構造生物国際シンポジウム 2013 “Cryo-electron microscopic studies of eukaryotic flagella motors”, 名古屋、2013年5月26~29日、日本学術振興会産学協力研究委員会回折構造生物第169委員会</p> <p>(2) 藤田翔平 吉川雅英 “High spatiotemporal resolution analysis of flagella-driven swimming cells”, Sheraton At The Falls, 2013年6月23日~28日、“Biology of Cilia and Flagella” Federation of American Societies For Experimental Biology (FASEB)</p> <p>(3) 小田賢幸、柳澤春明、八木俊樹、吉川雅英 “Mechano-signaling between central pair and radial spoke”, Sheraton At The Falls, 2013年6月23日~28日、“Biology of Cilia and Flagella” Federation of American Societies For Experimental Biology (FASEB)</p> <p>(4) Sen T., Nishida T., Takarada O., Kikkawa M., Shimada I. “Cryo-EM analysis of dynein microtubule binding domain-microtubule complex”, 2013年7月3日~5日、Kolkata, EMSI 2013, Electron Microscopy Society of India (EMSI)</p> <p>(5) 小田賢幸、柳澤春明、八木俊樹、吉川雅英 “Mechano-signaling between central pair and radial spoke”, 2013年9月6日~7日、東京大学理学部大講義室、織毛研究会</p> <p>(6) 谷侑磨、八木俊樹、小田賢幸、吉川雅英 “クラミドモナス鞭毛中心対微小管を構成する新規タンパク質の同定”、2013年9月6日~7日、東京大学理学部大講義室、織毛研究会</p> <p>(7) 小田賢幸、吉川雅英 「クライオ電子 トモグラフィによる織毛運動制御機構の解析」、東京大学・薬学総合研究棟、2013年10月5日、分子・細胞動態イメージング研究部会、日本顕微鏡学会</p> <p>(8) 西田紀貴、宝田理、吉川雅英、嶋田一夫 “Affinity regulation mechanism of microtubule-binding domain of cytoplasmic dynein”, 神戸オルビスホール、2013年10月31日~11月3日、Dynein 2013、Organization Committee of Dynein 2013</p> <p>(9) 吉川雅英 “Functional and structural approaches to flagellar dynein-regulatory system, 神戸オルビスホール、2013年10月31日~11月3日、Dynein 2013、Organization Committee of Dynein 2013</p> <p>(10) 小田賢幸、柳澤春明、八木俊樹、吉川雅英 “Mechano-signaling between Central Pair and Radial Spoke in Eukaryotic Flagella”, 神戸オルビスホール、2013年10月31日~11月3日、Dynein 2013、Organization Committee of Dynein 2013</p> <p>(11) 柳澤春明、小田賢幸、吉川雅英 “FAP20/BUG22p is an inner junction protein of doublet microtubules and essential for the planar asymmetrical waveform in Chlamydomonas flagella”, 神戸オルビスホール、2013年10月31日~11月3日、Dynein 2013、Organization Committee of Dynein 2013</p> <p>(12) 小田 賢幸、吉川雅英 日本顕微鏡学会第57回シンポジウム:「クライオ電子顕微鏡で迫る織毛運動の</p>

様式19 別紙1

	<p>制御機構」、愛知県産業労働センター、2013年11月15日～16日、日本顕微鏡学会                  (13) 吉川雅英 “鞭毛の構造遺伝学” ルブラ王山(名古屋)、2013年11月28日～29日、新学術領域会議、                  新学術研究領域「シリア・中心体による生体情報フローの制御」                  (14) 小田賢幸、柳澤春明、八木俊樹、吉川雅英 “Mechano-signaling between central pair and radial spoke in                  eukaryotic flagella”、2014年3月27日～29日、自治医科大学、日本解剖学会                  (15) 谷侑磨、八木俊樹、小田賢幸、吉川雅英 “クラミドモナス鞭毛中心対微小管を構成する新規タンパク質                  の同定”、2014年3月27日～29日、自治医科大学、日本解剖学会</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>Kikkawa Lab home page: <a href="http://structure.m.u-tokyo.ac.jp">http://structure.m.u-tokyo.ac.jp</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	114,000,000	95,350,000	18,650,000	0	0
間接経費	34,200,000	28,605,000	5,595,000	0	0
合計	148,200,000	123,955,000	24,245,000	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	476,912	18,650,000	0	19,126,912	19,126,912	0	0
間接経費	2,730,000	5,595,000	0	8,325,000	8,325,000	0	0
合計	3,206,912	24,245,000	0	27,451,912	27,451,912	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	11,492,080	顕微鏡、フィルム、付属カメラアップグレード費等
旅費	774,815	学会参加旅費(大阪、神戸、ニューヨーク)等
謝金・人件費等	5,135,900	特任研究員、技術補佐員人件費
その他	1,724,117	抗体作製、分析・解析費等
直接経費計	19,126,912	
間接経費計	8,325,000	
合計	27,451,912	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
落射型蛍光顕微鏡	オリンパス・BX- 60 S N:7L05754	1	525,000	525,000	2013/5/2	東京大学
顕微鏡用イメージ フィルム		1	689,430	689,430	2013/9/20	東京大学
生体分子精製用液 体クロマトグラフ	GEヘルスケア・A KTA explorer	1	997,500	997,500	2013/4/8	東京大学
JEM-3100FEF型電 子顕微鏡付属Tiez	日本電子・CCD アップグレード	1	1,118,250	1,118,250	2014/3/10	東京大学
JEM-3100FEF型電 子顕微鏡付属Tiez	日本電子・F416 CCD用CMOS	1	3,385,200	3,385,200	2014/3/10	東京大学