

平成 31 年 4 月 1 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 777

氏名

市川 宗厳

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： モントリオール （国名： カナダ ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。  
統合的構造解析法による軸糸ダブレット微小管の構造解明
3. 派遣期間： 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 10 日
4. 受入機関名及び部局名  
マギル大学 Department of Anatomy and Cell Biology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**  
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)  
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

次ページより記載。

真核生物の繊毛・鞭毛は、微小管を基本構造とした構造体であり、真核生物の細胞運動や、その外周の水流発生などに関わる重要な細胞小器官である。その内側は中心対微小管 9 本のダブルレット微小管が取り囲んだ軸糸 9+2 構造をとっている。同じチューブリンから構築されている細胞質微小管が一本のチューブ構造のシングレット微小管であるのに対し、ダブルレット微小管は 13 本のチューブリンのプロトフィラメント(PF)からなる A 小管と 10 本のプロトフィラメントからなる B 小管が連なった構造をとっている。B 小管の始まりのプロトフィラメントの PF-B1 はアウトージャクションと呼ばれる領域で A 小管の外側の PF-A10 と A11 の間の領域に直接結合しており、反対側のインージャクションではプロトフィラメント B10 と A1 の間にチューブリンではないタンパク質構造がある。本研究では、このダブルレット微小管に着目して研究を行ってきた。先行研究のクライオ電子線トモグラフィ法による構造解析によってダブルレット微小管の構造が 20-40 Å 程度の分解能で得られ、そのチューブリン格子構造の内腔側に微小管内タンパク質 (Microtubule Inner Proteins, MIPs) と呼ばれる構造体があることが明らかとなっていたが、そのタンパク質の実体や機能についてはほとんどわかっていなかった。そこで、本研究計画では、McGill 大学の最新鋭のクライオ電子顕微鏡設備を用いて、ダブルレット微小管の構造を高分解能で解析を行うとともに、質量分析によって MIPs タンパク質の候補を得て、MIPs タンパク質の実体の解明と機能の理解を進めるといったものであった。

ダブルレット微小管の分解能を向上するため、従来の手法から以下の点を改善した。まず、従来の繊毛・鞭毛の軸糸構造の構造解析では、繊毛・鞭毛の軸糸 9+2 構造 (直径約 250 nm) をそのまま氷包埋し、クライオ電子線トモグラフィ法で撮像し、サブトモグラムアベレーシングによる構造解析を行うことが一般的であったが、本研究では、軸糸 9+2 構造に ATP を加えて軸糸ダブルレット微小管の滑り出しを誘発することで単離した一本一本の軸糸ダブルレット微小管 (直径約 50 nm) を用い、薄い氷包埋を可能にした。これによって得られるシグナルを向上することを目指した。さらに、構造的な多様性を下げるため、高 NaCl 条件で処理することによって、軸糸ダブルレット微小管の外側に結合している軸糸ダイニンなどの外側のタンパク質を取り除き、さらに低塩濃度のバッファーに対し透析を行うことでラジアルスポークも取り除いた。また、単離した軸糸ダブルレット微小管を超音波破碎することで、クライオグリッド上でよりランダムな配向をとることを目指した。これらの条件で準備したダブルレット微小管を氷包埋し、派遣先の McGill 大学の最新鋭のクライオ電子顕微鏡 Titan Krios の自動撮像機能を用いて約 6,000 枚の電頭像を撮像し、構造解析用にダブルレット微小管の画像を大量に収集した。また、電子直接検出カメラを用いて撮像することで、これまでの CCD カメラを用いた撮像に比べて S/N 比を飛躍的に向上した。得られた電頭像を用いてクライオ電子線トモグラフィよりも高分解能で構造解析が可能な単粒子解析法による構造解析を行った。さらに Iterative helical real space reconstruction 法 (Egelman, 2007) を改良し、ダブルレット微小管に応用した。構造解析用ソフトウェア SPIDER (Frank *et al.*, 1996) と Relion (Scheres, 2012) を組み合わせて解析を行った。これらの内容については、日本語総説としても発表した(業績 3: 市川, 2019, 「生物物理」誌)。

以上の点を改善し、電頭像から切り出した粒子を 8 nm の周期構造で平均化することで、ダブルレット微小管のチューブリンの分解能を 5.7 Å で得た。これは、先行研究のダブルレット微小管の分解能が約 20-40 Å だったことに比べ、飛躍的な分解能の向上である。我々の構造は、ダブルレット微小管の構造を初めてサブナノメートルの分解能で明らかとしたものである。これだけに留まらず、A 小管・B 小管合わせて 23 本のプロトフィラメントの領域を切り出し、平均化することでテトラヒメナのチューブリンの構造を 4.6 Å で得た。これによって、テトラヒメナのチューブリンのモデル構造を得た。分解能が大幅に向上したため、ダブルレット微小管のチューブリン格子構造のマップの

全てのプロトフィラメントについて、チューブリンのモデル構造を明確にフィッティングすることができた。これによって、これまで位置が同定されていなかった、微小管の「継ぎ目」( $\alpha$ チューブリンと $\beta$ チューブリンが隣り合う箇所)がプロトフィラメント A9 と A10 の間であることを初めて明らかとした。また、アウトージャクション領域において PF-B1 と PF-A10/A11 の間に全く新しいチューブリン・チューブリン結合様式が存在することを見出した。

さらに、MIPs 構造についても先行研究から分解能が向上し、48 nm 周期で平均化することで、チューブリン格子及び MIPs 構造を 8.6 Å の分解能で明らかとした。これによって、これまで知られていた MIPs の高分解能での構造・及びダブルレット微小管のチューブリン格子への結合様式が明らかとなった。さらに、ダブルレット微小管内にこれまでの分解能ではみられていなかったフィラメント状の構造が複数走っていることを初めて発見し、filamentous MIPs (fMIPs) と名付けた。これらの fMIPs はどれもチューブリンのプロトフィラメント間を走っており、A 小管内には 4 本、B 小管内では、プロトフィラメントには 7 本も存在していた。これらの fMIPs は、プロトフィラメント間の結合を補強し、ダブルレット微小管を安定化していると考えられる。

以上の内容について Nature communications に論文を投稿し、当該期間中に出版された(業績 1: [Ichikawa et al., 2017, Nature communications](#))。また、これらの内容について、カナダ内の学会で発表も行ない(業績 5)、Gérard T. Simon Award を受賞した(業績 13)。これらの我々の新たな発見と、これまでの文献の知見を議論するレビュー論文についても執筆し、BioEssays に投稿し、当該期間中に出版された(業績 2: [Ichikawa and Bui, 2018, BioEssays](#))。このレビュー論文では、単なる先行研究の知見の総説に留まらず、過去の電子線トモグラフィー法によるダブルレット微小管の構造内の MIPs 構造を比較することで、鞭毛の基部・先端部で MIPs 構造が異なっているという新たな知見も提示した。

この後、さらに研究を進め、データ量を増大するとともに、別の構造解析ソフトウェア Frealign (Grigorieff, 2007)、Relion3 (Zivanov et al., 2018) を用いて構造解析手法を改善することで、ダブルレット微小管の構造を近原子分解能で初めて明らかとすることができた。先行研究での低分解能でのダブルレット微小管の構造解析では、ダブルレット微小管のチューブリン格子内に存在している各 MIPs 構造はそれぞれ別個の独立した構造であると思われていたが、我々の結果からこれらの MIPs 構造どうしは $\alpha$ ヘリックスの分岐によって、ダブルレット微小管内で縦横に互いに繋がりがあっているということが分かった。特に A 小管内は、全ての MIPs 同士がチューブリン格子構造内で結合し、ネットワークを形成していた。A 小管は B 小管に比べて、安定であることが知られているので、これらの MIPs のネットワークは内側から微小管構造を繋ぎとめて安定化していると考えられる。また、いくつかの MIPs は、チューブリン格子の間隙を通り抜けて、外側にまで伸びている様子が観察された。このようなチューブリン格子構造を通り抜けた結合様式はこれまでに類を見ないものである。ダブルレット微小管内外のタンパク質の相互作用を介して、ダブルレット微小管内外の周期構造が同調していると考えられる。また、ダブルレット微小管のチューブリンは、プロトフィラメント間で少しずつ異なるコンフォメーションをとっていることが明らかとなった。これらの内容については第 56 回日本生物物理学会年会の口頭発表・若手招待講演で発表し(業績 9)、日本生物物理学会より若手奨励賞を授与された(業績 14)。また、アメリカでの 2018 ASCB | EMBO Meeting においても発表した(業績 11)。

当初の予定では、MIPs を欠損させた変異体株もダブルレット微小管の構造解析を行う予定であったため、実際に MIPs の変異体株を用いて実験を行ったが、MIPs を欠損した変異体株からのダブルレット微小管の精製が困難であったため方針を転換し、生化学的手法によって MIPs を取り除くこ

とを目指した。条件検討の結果、界面活性剤による処理によっていくつかの MIPs 構造を取り除いたチューブリン格子構造を得ることに成功した。クライオ電子顕微鏡法によってその構造解析を行い、MIPs を保持しているチューブリン格子構造との比較を行った。その結果、MIPs が失われたチューブリン格子構造と MIPs を保持したチューブリン格子構造間では構造に差異があることが分かった。これは、MIPs が内側からチューブリン格子の構築を微小管内腔側から制御していることを意味する。微小管の内腔側に結合するタンパク質がそのチューブリン格子構造を変化させるという報告は初めてのものである。これらの内容を現在、私がファーストオーサーとして論文としてまとめ、すでに投稿済みである ([Ichikawa et al.](#), 投稿中論文)。

さらに、質量分析による MIPs タンパク質の同定についても進めた。初期の研究計画ではテトラヒメナを用いて実験を進める予定であったが、実際に実験を進めていくうちに、テトラヒメナから精製したダブレット微小管を質量分析に用いた場合、ムコシスト(粘液嚢胞)由来のタンパク質のコンタミネーションが多くみられるという問題が生じた。テトラヒメナ繊毛の精製法の検討も行ったが、ムコシスト由来のタンパク質のコンタミネーションを克服することはできなかった。そこで、緑藻クラミドモナスの軸系ダブレット微小管を用いるように方針を変更し、派遣先の Bui 研究室においてクラミドモナスの培養のセットアップを行い、クラミドモナスの培養を可能とした。クラミドモナスからのダブレット微小管の精製法についても最適化を行い、精製したクラミドモナスダブレット微小管のサンプルを用いて質量分析を行った。その結果、約 500 種類のタンパク質が検出された。このうち、豊富に存在していた約 200 種類のタンパク質に着目した。この中には中心対微小管由来の既知のタンパク質が複数含まれていた。ダブレット微小管・中心対微小管はどちらも微小管構造であるため、同じ画分に入ってきたためである。そこで、中心対微小管をもたないクラミドモナス変異株 *pf15* から精製したダブレット微小管についても質量分析を行った。この結果を野生株の質量分析の結果と比較することで、中心対微小管由来のタンパク質について取り除くことができた。また、ダブレット微小管を高塩濃度処理した画分についても質量分析を行うことで、軸系ダイニン関連タンパク質などダブレット微小管の外側に結合しているタンパク質についても除外することができた。最終的に残った候補約 100 種類は MIPs タンパク質に対応するものと考えられた。これらの MIPs タンパク質の候補には、例えば PACRG, FAP20, FAP52 などすでに既知の MIPs タンパク質候補も含まれていた ([Yanagisawa et al.](#), 2014; [Owa et al.](#), 2019)。また、副次的な結果として、野生株と中心対微小管欠損株の質量分析の結果の比較から逆にこれまで同定されていなかった中心対微小管タンパク質の候補についても同定することができた。これらの新規中心対微小管の内容については、ブイ研究室の修士課程の学生のテーマとして研究が派生しており、中心対微小管の新規タンパク質の同定の内容を 2018 ASCB|EMBO Meeting において発表する(業績 10)とともに、現在論文としてもまとめているところである ([Dai, Ichikawa et al.](#), 投稿準備中論文)。さらに、私が立ち上げたクラミドモナスの培養の系は、他のクラミドモナスを用いたプロジェクトにも使用されている(業績 6 及び 7)。

また、精製したクラミドモナス由来ダブレット微小管についてもクライオ電子顕微鏡法によって構造解析を行い、近原子分解能でのクラミドモナス由来のダブレット微小管の構造を得た。クラミドモナスのダブレット微小管では、インナージャンクション側で B 小管を A 小管上に係留するタンパク質構造があることが知られていたが、この構造は FAP20, PACRG に対応すると考えられていた ([Yanagisawa et al.](#), 2014)。我々の高分解能の構造解析の結果、このインナージャンクションの構造は、二種類のタンパク質構造から構成されていることが明らかとなった。このうち一種の構造は、PACRG のホモロジーモデル構造と非常に類似した構造をとっていることが分かった。そのため、もう一方の構造が FAP20 と考えられた。つまり、インナージャンクション構造に対応するタンパク質の位置同定に成功した。また、Owa らの結果から、MIP3 という MIP 構造の領域が、

FAP52 タンパク質に対応すると考えられた(Owa *et al.*, 2019)ため、FAP52についてもホモロジーモデル構造を得たところ、我々の高分解能のマップの MIP3 領域に明確にフィッティングすることができた。これらの結果から、我々の質量分析の結果及び高分解能の電顕マップを用いることでダブルレット微小管内の MIPs の位置同定を行うことが可能であることが示された。これらの内容については、国際シンポジウム **Dynein 2017 International Workshop** で発表した(業績 4)。また、私の研究結果により、近原子分解能でダブルレット微小管の構造を得ることができたため、元々の研究計画のように各 MIPs の X 線結晶構造解析を行う必要がなくなり、電顕のマップを用いて直接タンパク質のモデリングを行うことも可能となった。この内容については、**63rd Annual Meeting of the Biophysical Society** において共著のポスターとして発表した(業績 12)。派遣終了後の現在も、ブイ研究室と協力しつつ研究を進めており、共著の論文として投稿を目指している。

派遣先のブイ研究室は、2015 年に立ち上げたばかりの新しい研究室であり、その中で私は最初で唯一の博士研究員であった。そのため、これらの研究内容は、私が新たに系を立ち上げつつ、得てきた内容である。それにも関わらず、ダブルレット微小管の近原子分解能での構造を世界に先駆けて得るとともに、いくつかの MIPs についてそのタンパク質実体を同定して位置決定も行う他、MIPs の結合がチューブリン格子構造の構築に影響することを初めて示すなど MIPs の機能についての新たな知見も複数得ることができた。また、これまで得た構造情報の中で、まだ論文として発表していない内容も複数あり、今後もこの構造情報を基に論文化を行っていく予定である。さらに、上記のように、私の研究内容から派生した研究テーマも複数あり、更に多くの研究が発展していく礎を作ったものでもある。以上のことから、私の派遣先での研究は、当初の期待を上回る成果を上げたものと考えられる。