

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造  
生命科学と先端的基盤技術」  
研究課題「鞭毛・繊毛をターゲットとする細胞の構  
造生命科学」

## 研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者：吉川雅英  
(東京大学大学院医学系研究科、教  
授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

我々は、2014年に開始したCREST研究では、クライオ電子顕微鏡と遺伝学を駆使する事で、真核生物の鞭毛・繊毛(以降、両者を含めて繊毛と呼ぶ)の機能と構造の解明を進めてきた。繊毛のモデル生物として、これまでのクラミドモナスに加え、新たにマウスとゼブラフィッシュを導入し、特にゼブラフィッシュについては、精子についてのクライオ電子線トモグラフィー法を確立したことが大きな成果で、ゲノム編集と組み合わせることで今後様々な繊毛遺伝子について機能と構造を解明する手段となる。また、年森グループと KIF6(機能未知の繊毛関連キネシンモーター分子)と ODF4(外側粗大線維)のゲノム編集によるノックアウトマウスを作成し、既知のものとは全く異なる表現系のマウスを得て解析を進めている。

クライオ電顕については、2016年末に電子線直接検知型カメラを導入、2018年6月には最先端の自動化電顕をAMED 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)で導入し、単粒子解析法・トモグラフィー法の両者において解像度の飛躍的な向上が達成された。これにより、CREST 構造生命内での共同研究を推進し、新規の膜タンパク質について3-4 Åの解像度で解いている。論文として発表した成果としては、クラミドモナスを用いた繊毛構成分子の三次元位置を遺伝学による構造標識を用いて決定し、その機能を細胞生物学的に検証してきている。現在投稿準備中のプロジェクトとしては、微小管の内部に結合する新たなタンパク質 FAP45, FAP52を同定し、それらが欠けることで微小管の安定性が下がることをCREST 安藤グループと解明した。

年森グループ(千葉大)では、当初、最終目的『鞭毛・繊毛関連遺伝子のマウスにおける解析』のもとで、CRISPR/Cas9システムを用いて新規遺伝子改変マウスを作成し解析することを目標とした。遺伝子欠損マウスは予定通り、2年目にできて3年目からは安定した解析が可能となった。新規に作成した抗体や市販の全てがうまく働かなかったことが大きな問題であったが、4年目に Kif6<sup>+/+</sup>-Tg(Kif6-EGFP)と Odf4<sup>+/+</sup>-Tg(Odf4-Cherry)を作成し、それぞれの局在と発現に関する解析が可能となり、現在、トランスジェニックマウスを含めて全ての観点から解析を進めている。比較のために、Odf3KO ヘテロタイプマウス(ホモは致死性)と EqtnKO ホモマウスも解析した。その結果、ODF 関連遺伝子について、さらに多くのことが判ってきた。EqtnKO ホモマウスの解析では、臨床応用を含めた観点から解析し、診断マーカーや治療法との観点、特に特許との関係から知見が得られた。

### (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

#### 1.

概要:ゼブラフィッシュの精子のクライオ電子線トモグラフィーによる構造解析に成功し、ゲノム編集ができる脊椎生物で初めて繊毛の構造と機能の関係を研究する道を拓いた。具体的な遺伝子のターゲットとしては4つのダイニンの組み立て遺伝子をノックアウトし、それぞれの繊毛の構造解析と、精子の運動の関連を明らかにした。

#### 2.

概要:微小管の内部に結合するタンパク質を同定し、それらが繊毛の安定化に重要な役割をしていることを明らかにした。これまでの微小管結合タンパク質(MAPs)は、どれもが外側に結合するものであり、内部に結合する全く新しい種類の MAPs である。また、他の研究者により、これらの遺伝子がヒトの繊毛病の原因であることも明らかになりつつあることから、本研究が疾患の起こる仕組みの解明につながる。

#### 3.

概要:クライオ電子顕微鏡を用いて、CREST 構造生命科学内での共同を強力に推し進め、原子モデルを組むのに十分な分解能での解析を複数達成した。特に、遠藤斗志也研究室と共

同で推進したプロジェクトでは、ミトコンドリアへのタンパク質搬入口 TOM 複合体の精密構造解析に貢献し、様々なタンパク質が複数の経路で、TOM 複合体を透過する仕組みを解明した。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要: クライオ電子顕微鏡と単粒子解析法のワークフローを確立し、結晶化の困難なタンパク質、特に膜タンパク質の構造解析を可能とした。本技術は我々の研究室固有ではないが、多くのノウハウの蓄積を必要とし、今後の構造生物学と、その結果得られる構造に基づく創薬には必須の技術で、実際に製薬会社による構造解析が東京大学で進行中である。

< 代表的な論文 >

● Docking-complex-independent alignment of Chlamydomonas outer dynein arms with 24-nm periodicity in vitro.

Oda, T., Abe, T., Yanagisawa, H., Kikkawa, M.  
J Cell Sci 2016 129:1547-1551

● Inner lumen proteins stabilize doublet microtubules in cilia and flagella.

Owa, M., Uchihashi, T., Yanagisawa, H. A., Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H., Wakabayashi, K. I., Ando, T., Kikkawa, M.  
Nat Commun 2019 10:1143

● Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly.

Yamaguchi, H., Oda, T., Kikkawa, M.\*, Takeda, H.\*  
Elife 2018 7: e36979 (\* co-corresponding author)

● Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths.

Araiso, Y., Tsutsumi, A., Qiu, J., Imai, K., Shiota, T., Song, J., Lindau, C., Wenz, L. S., Sakaue, H., Yunoki, K., Kawano, S., Suzuki, J., Wischniewski, M., Schutze, C., Ariyama, H., Ando, T., Becker, T., Lithgow, T., Wiedemann, N., Pfanner, N., Kikkawa, M., Endo, T.  
Nature 575:395-401 2019

## § 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 吉川グループ

- ・研究代表者: 吉川雅英 (東京大学・大学院・医学系研究科、教授)
- ・研究項目: 鞭毛・繊毛の細胞生物学、およびクライオ電子顕微鏡による観察

② 年森グループ

- ・主たる共同研究者: 年森 清隆 (千葉大学大学院医学研究院・特任教授)
- ・研究項目: 鞭毛・繊毛関連遺伝子のマウスにおける解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

① 遠藤斗志也グループ (CREST 構造生命)

- ・共同研究者: 遠藤斗志也 (京都産業大学・総合生命科学部・生命システム学科・教授)
- ・研究項目: ミトコンドリアの膜透過装置 TOM 複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析

- ② 野田展生グループ (CREST 構造生命)
  - ・共同研究者:野田展生 (微生物化学研究会 微生物化学研究所・主任研究員)
  - ・研究項目: オートファジー関連分子のクライオ電子顕微鏡による構造解析
- ③ 武田洋幸グループ (CREST 生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出)
  - ・共同研究者:武田洋幸 (東京大学・理学系研究科・生物科学専攻・生物学科)
  - ・研究項目: ゼブラフィッシュのゲノム編集、ダイニン組み立て因子
- ④ 稲葉謙次グループ (CREST 構造生命)
  - ・共同研究者:稲葉謙次 (東北大学 多元物質科学研究所)
  - ・研究項目: 小胞体カルシウムポンプ SERCA2b の構造解析
- ⑤ 濡木理グループ
  - ・共同研究者:濡木理 (東京大学・大学院・理学系研究科・教授 )
  - ・研究項目: 哺乳類の機械刺激チャネルを含むタンパク質のクライオ電子顕微鏡による構造解析
- ⑥ 小田賢幸グループ
  - ・共同研究者:小田賢幸 (山梨大学・大学院・解剖学講座構造生物学教室・教授)
  - ・研究項目: 繊毛・鞭毛のクライオ電子線トモグラフィーによる構造解析
- ⑦ 中村栄一グループ
  - ・共同研究者:中村栄一、原野 幸治 (東京大学・大学院・理学系研究科・特任教授、特任准教授)
  - ・研究項目: microED による有機分子の構造解析