

博士論文審査報告書

氏名	桐間 惇也
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博理第106号
学位授与報告番号	甲第324号
学位授与年月日	平成30年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	Survey of regulatory factors involved in the waveform changes coupled with Ca^{2+} of <i>Chlamydomonas</i> flagella 「クラミドモナス鞭毛のカルシウムイオン依存的な波形変化に関わる制御因子の探索」
論文審査委員	(主査) 教授 峰雪 芳宣 (副査) 教授 樋口 芳樹 (副査) 教授 吉田 秀郎 (副査) 教授 大岩 和弘 (副査) 教授 八木 俊樹 (県立広島大学生命環境学部) (副査) Winfield S. Sale (Professor, Department of Cell Biology, Emory University)

※ Sale 委員の審査結果については別紙(英文)として添付する。

1. 論文内容の要旨

本論文は、*Chlamydomonas* 鞭毛が示す細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇による鞭毛波形変化のメカニズムの解明に向けて、この反応に関わる制御因子の探索を、鞭毛運動再構築系を使って進めたものである。 Ca^{2+} 濃度上昇に伴って鞭毛波形を繊毛型から鞭毛型に切り替える能力を失った外腕ダイニン欠損株 *oda1* に、野生株鞭毛の高塩濃度抽出分画を順次加えた。鞭毛の Ca^{2+} 依存的波形変化の回復を指標として制御因子の絞り込みを進めた結果、低分子量分画に因子が存在する可能性が示唆された。そこで、この分画を SDS-PAGE で分離した後、ペプチドフィンガープリンティングによって同定を試みた。EF-hand モチーフを有する *Chlamydomonas* 特有の鞭毛タンパク質 FAP85 が候補の一つとなったので、このタンパク質の特性評価を進めた。FAP85 の遺伝子をクローン化して、その発現系を構築、生化学的解析を行い、等温滴定型熱量測定によって1分子当たり1つの Ca^{2+} 結合能を確認した。再構築実験によって FAP85 の効果を調べた結果、このタンパク質は直接波形変化を制御する因子ではなかったが、FAP85 に対する抗体を調製して鞭毛内での局在を免疫蛍光染色法や免疫電子顕微鏡法を用いて調べたところ、FAP85 は周辺微小管の A 小管内に存在する微小管内タンパク質 MIPs の一つであることが明らかになった。申請者は *in vitro* 実験によって、FAP85 が微小管と共重合することで微小管の構造を安定化することを明らかにした。この成果は、軸糸

内構造として記載されていた MIPs の実体を明らかにし、その機能を示したものである。

2. 論文審査結果

当該申請者は、*Chlamydomonas*の鞭毛波形が Ca^{2+} 濃度依存的に変化するメカニズムに着目して、その因子の探索を行った。 Ca^{2+} 濃度に対する波形変化を示さない外腕ダイニン欠損株の軸系に、粗抽出外腕ダイニン分画を添加した。このように再構築した軸系に高塩抽出分画を順次添加するbottom-up手法を用いて、鞭毛内部に存在するきわめて多数の構成タンパク質の中から波形変換に関わる制御因子の候補を絞り込んだ。この結果、FAP85を見出し、その鞭毛波（対称波）形成能や Ca^{2+} 結合能等を調べた。さらに鞭毛軸系内のFAP85の局在を免疫電顕によって詳細に調べあげ、FAP85が周辺微小管のA小管内に存在する微小管内タンパク質MIPsの一つであることを明らかにした。また、*in vitro*実験によってFAP85はチューブリンと共重合することで微小管を安定化する能力を持つことを明らかにした。これらの成果は、これまで報告がなかったFAP85の機能と構造について詳細な解析を行い、これがMIPsの一つであることを明らかにし、その機能を示したものとして高く評価できる。また、微小管の安定化という機能には、鞭毛軸系の構造維持や波形形成と伝播のメカニズムの解明につながる新規かつ重要な知見が含まれており、鞭毛運動メカニズムの理解に向けた重要な手掛かりを与えている。審査委員会では、これらの研究成果の新規性・妥当性ととも、本申請者の本研究に関する理解と知識を厳密に審査した。その結果、本研究は博士論文の内容として適格であり、申請者の本研究及びその背景に関する理解も十分であると本委員会は判断した。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成30年1月25日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

Evaluation Report for Doctoral Thesis

Title: Survey of regulatory factors involved in the waveform changes coupled with Ca²⁺ of *Chlamydomonas* flagella

Applicant: Junya Kirima

1. Abstract of the thesis

The *Chlamydomonas* flagella usually show ciliary-type beating, but at a high intracellular Ca²⁺ level the waveform changes to flagellar-type beating. Although Ca²⁺ was proven to be the key to this waveform change, the molecular mechanisms are still unknown. In this paper, the applicant carried out an *in vitro* reconstitution of outer dynein arms in *odal* mutant axonemes in a bottom-up manner and surveyed regulatory factors involved in the waveform changes. The fractions of the high-salt extract of wild-type axonemes were added to the *odal* axonemes which lost the ability to respond to Ca²⁺ changes. The applicant examined the fractions by using the recovery of the Ca²⁺ respond of the *odal* axonemes as the index of regulatory factors. As the result of the peptide fingerprinting of some bands from the crude dynein extract, the applicant identified the FAP85 protein, which was predicted to have an EF-hand motif that binds Ca²⁺ ions. Then, he focused on the FAP85, which is specific to *Chlamydomonas* and its relatives in order to find components responsible for *Chlamydomonas*-specific waveform changes coupled with intracellular Ca²⁺ concentrations. The applicant cloned the cDNA encoding FAP85, expressed it in *Escherichia coli* cells, and generated a polyclonal antibody against the expressed protein. The isothermal calorimetry showed the presence of one Ca²⁺ binding site in the protein. Immunoblotting showed that FAP85 was present in every axoneme of several flagellar mutants lacking major axonemal components. Immuno-electron microscopy revealed that anti-FAP85 antibodies were found only on the inner wall of A-tubules of the doublets exposed by *N*-lauroylsarcosine treatment. Further characterization of FAP85 and its effects on microtubule dynamics showed that FAP85 binds to tubulin and stabilized microtubules. According to these results, the applicant concludes that FAP85 is a novel member of microtubule-binding proteins, localizing on the inner wall of the A-tubule and stabilizing microtubules. These results clarify a component of the MIPs and show its function.

2. Evaluation of the thesis and final examination

The applicant focused on the mechanism by which *Chlamydomonas* flagellar waveform changes in Ca²⁺ concentration-dependent manner and he searched for the regulatory factors. He used the reconstitution of axonemes in which the crude dynein extract was added to the axonemes of the outer-arm dynein lacking mutant. By using this bottom-up method that the high salt extracts were sequentially added to the reconstituted axonemes, candidates of regulatory factors related to waveform change coupled with Ca²⁺ concentrations were narrowed down from among many constituent proteins existing within an axoneme. As a result, the applicant found FAP85, and examined its effects on flagellar waveform, Ca²⁺ binding ability and so on. Furthermore, he investigated the localization of FAP85 in the flagellar axoneme by immunoelectron microscopy and revealed that FAP85 is one of the microtubule inner protein MIPs existing on the inner wall of the A tubule of the peripheral doublet microtubule. *In vitro* experiments also revealed that FAP 85 stabilizes microtubules through co-polymerization with tubulin. These results are highly evaluated because of the detail description of

the function and localization of FAP 85, which has not been reported so far. Moreover, from the function of microtubule stabilization of FAP85, we will obtain new and important knowledge leading to elucidation of the structure of flagellar axoneme structure and the mechanism of waveform formation and propagation, which is an important clue for understanding the flagellar bending mechanism. The Review Committee examined the novelty and relevance of these research results. Also, the committee strictly examined to what extent the applicant understands this research and knowledge. As a result, the Committee concluded that this research is qualified as the doctoral thesis and understanding of the applicant's research and its background is sufficient.

Thus, the Review Committee members listed below hereby state our full approval of the thesis completed by the applicant in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science in the Graduate School of Life Science.

The Committee also certifies that the applicant passed the final oral examination on his thesis and related issues held on January 25 in 2018.

The chief examiner : Yoshinobu Mineyuki _____

The second readers : Yoshiki Higuchi _____

Hidero Yoshida _____

Kazuhiro Oiwa _____

Toshiki Yagi _____

(Professor, Department of Life Sciences, Prefectural University of Hiroshima)

Winfield S. Sale 

(Professor, Department of Cell Biology, Emory University, Atlanta, USA)