

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		機能的蛍光・発光タンパク質とダイニンを用いた細胞内カルシウム濃度定量法の開発			
研究テーマ (欧文) AZ		Estimation of intracellular Ca^{2+} concentration using dynein and Ca^{2+} -sensor proteins			
研究氏 代表 者	カタカナ CC	姓)ワカバヤシ	名)ケンイチ	研究期間 B	2017 ~ 2018 年
	漢字 CB	若林	憲一	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	Wakabayashi	Ken-ichi	研究機関名	東京工業大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		東京工業大学科学技術創成研究院・准教授			
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。) 真核生物鞭毛の運動は多様な因子で調節される。例えば Ca^{2+} は鞭毛波形を変化させ、精子走化性や藻類走光性を実現させる。レドックス(酸化還元)は鞭毛打頻度を変化させ、藻類走光性の正負を切り替える。このような調節機構の理解のためにはこれらの調節因子を生体内で定量することが必要だが、そのような研究は進んでいなかった。 我々は以前、モデル生物である緑藻クラミドモナスを用いて、鞭毛を動かすモータータンパク質ダイニンが微小管上に 24 nm 周期を作る基礎となるタンパク質複合体 ODA-DC の解析を行った。この研究を通じて、我々は調節因子の定量実験に ODA-DC を利用することを着想した。近年、多様なセンサータンパク質が開発されているが、輝度や感度の点で優秀な一方でレシオメトリック解析による定量が困難なものがある。我々はそのようなものの1つ、レドックスセンサー蛍光タンパク質 Oba-Qc を、ODA-DC と融合させてクラミドモナスに発現させた。鞭毛内 Oba-Qc 濃度を個体によらず一定にし、かつ試験管内で検量線を描くことで、「ただ観察するだけ」でレドックス電位を計測できる。この方法は本助成のサポートを得て無事に成功した (Sugiura et al., 2018 BBRC)。 しかし、この手法を Ca^{2+} センサー発光タンパク質 GeNL60 に適用したところ、正しく鞭毛内に導入されなかった。ダイニン重鎖との立体障害が問題になった可能性を考えて細胞内に発現誘導したが、これも発現が確認されなかった。大腸菌に発現させた GeNL60 は正常に機能したことから、クラミドモナス細胞内のタンパク質分解酵素に感受性が高い可能性がある。 上記のように Ca^{2+} を計測するには至らなかったが、本計画で提案した方法を実現する上で必要な改良点が明らかになった。今後はその改良点を1つずつ現実のものとし、当初計画を成功に結びつけたい。					
キーワード FA	鞭毛	カルシウム	レドックス	センサータンパク質	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Assessment of the flagellar redox potential in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> using a redox-sensitive fluorescent protein, Oba-Qc.							
	著者名 ^{GA}	Kazunori Sugiura, Yuta Nishimaki, Mikito Owa, Toru Hisabori, Ken-ichi Wakabayashi	雑誌名 ^{GC}	Biochemical and Biophysical Research Communications					
	ページ ^{GF}	2083~2088	発行年 ^{GE}	2	0	1	8	巻号 ^{GD}	803
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Motion of eukaryotic flagella are regulated by various cellular signals, such as Ca^{2+} and redox (reduction-oxidation). However, quantification of those signals in live flagella has not been carried out because of several technical difficulties. For example, some fluorescent sensor proteins for those signals are not suited for quantitative analysis, because those proteins' excitation peaks are single and ratiometric analysis is difficult.

Recently, we analyzed the function of a protein complex called the Outer Dynein Arm Docking Complex (ODA-DC) that underlies the periodic binding of dyneins to the flagellar microtubules in the green alga *Chlamydomonas*. We came up with the idea of fusion of the sensor proteins to the ODA-DC, which makes the density of the sensor proteins constant not only along the length of flagellum but also between cells.

First, we fused Oba-Qc, a recently developed redox-monitoring fluorescent protein. Fluorescence signals from flagella in live cells, calibrated against the fluorescence from the samples in buffers of known redox potentials, determined the redox potential to be ~250 mV in the light and ~-280 mV in the dark. This is the first estimation of redox potential in the live flagella.

Next, we tried to fuse GeNL60, a recently developed Ca^{2+} -monitoring luminescent protein, to the ODA-DC. However, GeN60-fused ODA-DC was not introduced into flagella, probably because of proteolysis. Currently we are trying to find a suitable Ca^{2+} sensor protein suited for expression in *Chlamydomonas* cells.