

論文の内容の要旨

Analyses on mechanisms that establish the nine-fold symmetry of the centriole using protein engineering approaches

(タンパク質改変による中心子 9 回対称性構造の確立機構の解析)

苗加 彰

Part 1 序論

中心子は、中心体の中核構造であるとともに、鞭毛・繊毛の形成基部として働くオルガネラである。9本の三連微小管が回転対称に配置した特徴ある円筒構造をもち(図1a)、この形が繊毛軸糸の9+2構造を規定する。9本の微小管を基本とするこの構造パターンは、単細胞生物から脊椎動物に至るまで、ほとんどの真核生物の中心子に共通している。この普遍的な9回対称性構造が構築される機構は、繊毛や中心子が電子顕微鏡で観察されるようになった1950年代から続く謎であったが、10年ほど前に、クラミドモナス突然変異株の解析によってその一端が初めて明らかになった。

解明されたのはカートホイールという構造に依存する機構である。カートホイールは中央のリング(ハブ)と9本の繊毛維(スポーク)から構成される9回対称性の車輪状構造で、中心子形成過程の初期に出現し、完成した中心子の内腔に位

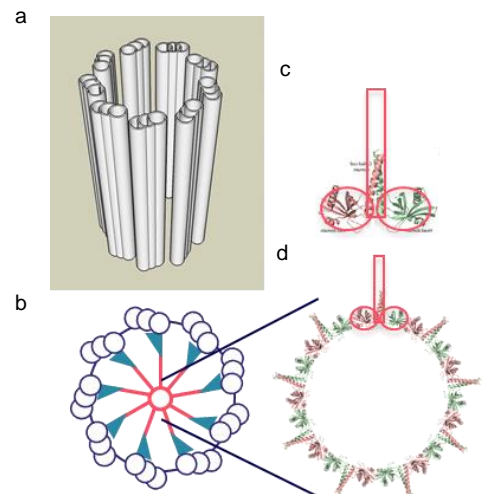


図1. カートホイールと SAS-6

(a) 中心子の微小管骨格の模式図。(b) 中心子底部の断面図。内腔にカートホイールが存在する。(c) SAS-6 ダイマー。2つの頭部と1つの尾部をもつ。(d) SAS-6 ダイマーの *in vitro* 会合体モデル図。カートホイールの中心部分に対応する。

置する (図 1b)。この構造を欠失する突然変異株 *bld12* では中心子の微小管数が 9 本に限定されず、7 ~11 本からなる中心子が形成される。さらに、*BLD12* の遺伝子産物、SAS-6 の解析により、この中心子蛋白質は 2 つの球状の頭部と 1 つの棒状の尾部からなるダイマーを形成し、そのダイマー 9 個が頭部を介して回転対称に会合することでカートホイールの中央部分を形成することが明らかになった (図 1cd)。これらの知見から、中心子の 9 回対称性構造は SAS-6 ダイマーの自己会合能が基礎となって構築されるとするモデルが提唱され、広く受け入れられるようになった。

しかし、*bld12* においても約 70% の中心子は正しく 9 本の微小管をもつ。この事実は、中心子の 9 回対称性の確立にはカートホイールに依存しない機構も存在することを示すが、その機構を担う実体や、カートホイール依存性な機構との関係は不明である。Part 1 ではこれらを探るため、会合性を人為的に変化させた改変 SAS-6 を *bld12* に発現させ、中心子とカートホイール構造に及ぼす影響について検討した。

Part 1 結果

SAS-6 会合性改変の中心子とカートホイールの構造に及ぼす影響

SAS-6 ダイマーは *in vitro* で自己会合して主に 9 回対称性のカートホイール様構造を形成する。スイスの Paul Scherrer 研究所のグループとの共同研究により、頭部ドメインのアミノ酸配列置換によって会合性の変化した改変 SAS-6 を 28 種類作製した。これらのうち、NN2、NN15、NN24、NN26 と名付けた改変 SAS-6 をそれぞれ発現する *bld12* 株を樹立し、それらが形成する中心子の構造を電子顕微鏡で観察した。NN2、NN15、NN26 は *in vitro* で主に 8 回対称性、NN24 は主に 6 を中心として 5-7 回対称性の会合体を形成する。以下に、中心子構造に最も顕著な変化が現れた NN24 発現株の解析結果を述べる。

野生型 SAS-6 を発現させた *bld12* 細胞では、観察された全ての中心子が 9 本の三連微小管から構成されていたが、NN24 発現株では約 33% が微小管 8 本の中心子、残りが微小管 9 本の中心子であった (図 2ab)。この結果は、中心子の構造が SAS-6 の会合性に影響されることを示す。しかし、NN24 の会合性が忠実に反映されれば 5-7 本の微小管をもつ中心子が形成されるはずだが、そのような中心子は観察されなかった。そこで、NN24 の会合性に基づいて形成されるはずのカートホイールを観察したところ、意外なことに、6 回対称性のカートホイールは観察されず、スポーク 9 本のカートホイールが高頻度で観察された (図 2b)。この結果は、*in vitro* では 5-7 回対称に会合する NN24 が、*in vivo* においては何らかの因子の影響を受けて 9 回対称に会合することを示す。

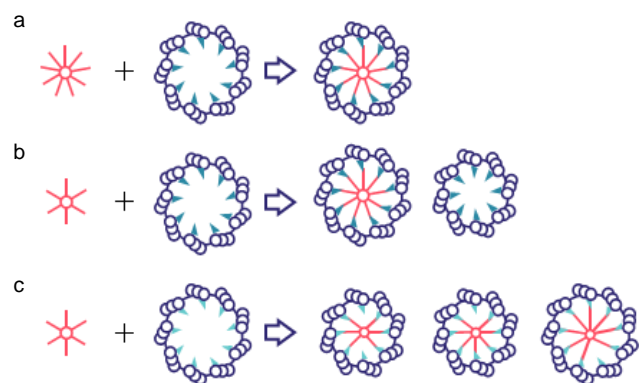


図 2. 変異 SAS-6 の中心子構造への影響

(a) 野生型 SAS-6 発現株の中心子。すべての中心子とカートホイールは 9 回対称になる。(b) NN24 発現株の中心子。67% が 9 回対称、33% が 8 回対称の中心子であった。9 回対称性中心子にはスポーク 9 本のカートホイールが観察され、8 回対称性中心子の多くにはカートホイールが観察されない。(c) NN24 と Bld10p 断片発現株の中心子。7-9 回対称性中心子と、スポーク 6-8 本のカートホイールが形成された。

中心子構築における微小管壁とカートホイールの相互作用

この因子の候補の1つに、カートホイールの周囲に存在する、環状に配置した三連微小管（以下、微小管壁）からの構造的な影響が考えられる。その理由は、*bld12* 変異株においては、カートホイールが無くても中心子微小管が9回対称性に集合することが多いからである。この推察が正しければ、集合した微小管とカートホイールとの結合を弱めたとき、NN24の会合性を反映したカートホイールが形成されると期待される。

カートホイールと三連微小管の接続部には、クラミドモナス変異株 *bld10* の解析から同定されたタンパク質 Bld10p が局在する。平木らは、N 末端または C 末端を大きく欠失した Bld10p 断片を、このタンパク質の null 変異株である *bld10* に発現させると、カートホイールのスポークが三連微小管から高頻度で外れることを明らかにした。そこで、二重変異株 *bld10bld12* に NN24 と Bld10p 断片を同時に発現させ、そのカートホイール構造を観察した。その結果、期待通り、スポーク 6-8 本からなるカートホイールが観察され、スポーク 9 本のカートホイールは観察されなかった (図 2c)。従って、*in vivo* においてカートホイールの構造に影響を及ぼす因子は、中心子微小管が架橋されて環状に配置した構造にあり、中心子の 9 回対称性の確立には微小管とカートホイールの相互作用が重要であると結論された。

Part 1 の結果から考えられる新しい構築モデル

この結果は、SAS-6 の自己会合によりカートホイールが形成され、それが微小管形成の足場となるという現在優勢の構築モデルとは明らかに矛盾する (図 3a)。本研究の結果から、微小管壁とカートホイールは独立に形成され、それらの間でサイズと回転対称性が一致したものだけが安定化し、中心子へと構築されるというモデルが考えられる (図 3b)。中心子の普遍的な形は、独立したタンパク質の集合過程が順に起こって決定されるのではなく、それらの間の相互作用というダイナミックな過程を経て決定されると考えられる。

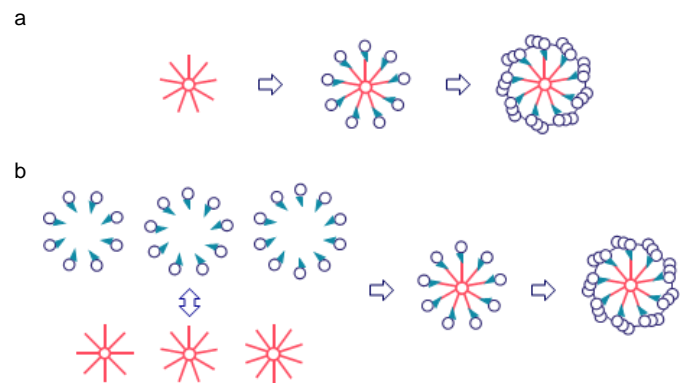


図 3. 中心子構築モデル
(a) 旧モデル (b) 新モデル

Part 2 序論

Part 1 の結果からカートホイールに依存しない機構はカートホイールと独立に集合した微小管壁にあることが明らかになった。カートホイールと独立に微小管が環状に配置するには、微小管間を架橋する構造が、その間隔と配置を一定範囲に固定する必要がある。さらに、中心子形成初期では、中心子微小は A 小管のみであるため、微小管の配置を決定する架橋構造は A 小管同士をつなぐものでなければならないが、そのような構造はこれまで見つかっていない。

Bld10p は微小管とカートホイールつなぐ役割を担っている。Bld10p の局在は、カートホイールのスポーク先端と微小管の A 小管が接するところにある pinhead という膨らみの付近に主なシグナルが

観察されることが、先行研究により報告されている。しかし、不思議なことに、pinhead と pinhead の間、すなわち微細構造が何も観察されないところにも、シグナルが検出される場合がある。この結果は、Bld10p を含む何らかの構造が微小管間を架橋している可能性を示唆しているが、そのような構造はこれまで報告されていない。そこで、Part 2 では、Bld10p が pinhead の間を架橋することによって、中心子微小管の間隔と配置を決定している可能性を追求した。

Part 2 結果

Bld10p の pinhead 間における局在

Bld10p の局在を詳細に検討するため、HA タグを N 末端、中央部、C 末端に付加した Bld10p を null 変異株である *bld10* に発現させ、その株を用いて HA を抗原として免疫電子顕微鏡法を行った。その結果、3 種はいずれも中心子微小管の A 小管上にあるピンヘッドをつなぐ位置に直線上に局在していることが明らかになった。この結果は、その部分には観察されない何かしらの構造があつて、Bld10p がその構成タンパク質であることを示唆する。

pinhead 間の架橋構造の探索

ピンヘッド間に微細構造が観察されない原因として、試料調製の際になんらかの変化が起こった可能性を考え、調製にかかる時間を短縮するなどの改良を加えた方法で中心子を単離し、電子顕微鏡でその proximal 端を観察した。その結果、これまで何も観察されていなかった pinhead の間には実は繊維状の架橋構造が 2 種存在することが明らかになった。これらの架橋構造が観察された位置は、Bld10p の局在が観察された位置と一致しており、これらの架橋構造の構成タンパク質の 1 つが Bld10p であることを示唆している。

カートホイール非存在下における Bld10p の機能

Bld10p が微小管間の架橋構造を構成し、それによりカートホイールに依存しない微小管集合に寄与しているのなら、Bld10p を改変して架橋を短くしたときに、中心子の 9 回対称性に影響を及ぼすはずである。そこで、カートホイールと Bld10p を両方欠失する二重変異株 *bld10bld12* に短い Bld10p を発現させ、中心子構造に影響が出るかを検討した。その結果、中心子の微小管数は 8 本を中心とする分布を示し、このときの新規架橋構造は *bld12* における架橋よりも約 10% 短くなっていた

(図 4)。これらの結果から、Bld10p は中心子微小管間の架橋構造の形成し、微小管間を一定の距離に保つことによって、カートホイールとは独立に中心子微小管数を 9 本前後に限定しているのではないかと考えられる。

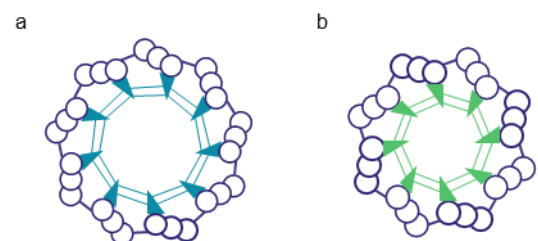


図 4. Bld10p 部分配列発現株の中心子構造
野生型 Bld10p (青) は、微小管間を適切な距離に保つ (a) が、Bld10p の部分配列 (緑) では、その距離が短くなり、微小管数も小さい方にシフトしたと考えられる。