

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370079

研究課題名(和文) 中心子の9回対称性構造構築におけるカートホイール非依存的機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cartwheel-independent mechanisms for establishing 9-fold symmetry of the centriole structure

研究代表者

広野 雅文 (HIRONO, Masafumi)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：10212177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：中心子は9本のトリプレット微小管からなる円筒構造のオルガネラで、この形はほとんどの真核生物に共通する。我々は以前に、カートホイールという9回対称性の車輪状構造が中心子の形が決まる上で重要な働きをすることを明らかにした。本研究では、6回対称性のカートホイールを作るように改変したカートホイール蛋白質を細胞に発現させてその影響を調べた。その結果、微小管の環状配置そのものにも微小管を9本にする機構が備わっており、それがカートホイールとのダイナミックな相互作用を通して、中心子微小管の数を厳密に9本に決めていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Centrioles are organelles with a cylindrical shape consisting of nine triplet microtubules. This 9-fold symmetrical structure is highly conserved among centrioles of most eukaryotic organisms. We previously reported that the cartwheel, a subcentriolar structure with 9-fold symmetry, largely contributes to establishment of the 9-fold symmetry of the centriole. In this study, we produced a cartwheel protein that assembles in vitro into cartwheel-like structures with 6-fold symmetry, and expressed it in *Chlamydomonas* cells. Observations of the centrioles and cartwheels in the cells suggested that a cartwheel-independent mechanism exists in the circular arrangement of the centriolar microtubules, and that a dynamic interaction between the mechanism and the cartwheel precisely determines the number of the triplets in the centriole.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動 微小管 基底小体 繊毛

## 1. 研究開始当初の背景

中心子 (centriole) は、中心体の中核構造と繊毛の形成基部という2つの機能を担う、細胞内微小管構造形成の司令塔として働くオルガネラである。中心子は9本のトリプレットが回転対称に配置した円筒構造をもち、これが繊毛の内部構造(軸系)のパターン(9+2構造)を規定している。この「9」という数を基本とする中心子・軸系の構造パターンは、生物種を超えて高く保存されているが、この普遍的構造の構築機構はまだよくわかっていない (Hirono, 2014)。

この問題を解明するため、我々は中心子構造に異常をもつクラミドモナスの突然変異株を2株 (bld10, bld12) 単離し、それぞれが欠失する蛋白質 (Bld10p, SAS-6) を同定した (Hiraki et al., 2007; Matsuura et al., 2004; Nakazawa et al., 2007)。興味深いことに、これらはいずれもカートホイールという構造に関連する蛋白質であった。カートホイールは環状構造(ハブ)から9本の繊毛(スポーク)が放射状に配置した構造で、中心子構築の初期に現れる。2つの蛋白質の機能解析の結果、主に以下の2点が明らかになった。

1) Bld10p はスポーク先端と微小管をつなぐ蛋白質で、アミノ酸配列の末端を一部欠失させるとスポークが短くなり、8回対称性の中心子が形成される。

2) SAS-6 はカートホイールの中央を構成し、これを欠失した bld12 変異株ではスポークが放射状に配置されないために、中心子微小管の本数が8-11本に揺らぐ。

これらの結果から、中心子構造の構築にはカートホイール依存的な機構が働き、中心子構造の回転対称性を9回に限定していることが初めて実験的に示された。

さらに、我々は、英国 MRC のグループとの共同研究により SAS-6 の X 線結晶構造を明らかにし、カートホイールの中央部分は SAS-6 ダイマーが9個会合することにより構築されているというモデルをたて、それが正しいことを bld12 変異株を用いた解析により明らかにした (van Breugel et al., 2011)。

この一連の我々の研究によって、中心子をもつ普遍的構造の構築機構の一端が初めて明らかになった。しかし、ここで我々が注目している事実は、カートホイールの放射状構造を欠失する bld12 変異株でも、中心子の多くは9回対称性を保持していることである。このことはカートホイールだけが中心子の9回対称性を決定しているわけではないことを示す。従って、カートホイール依存的な「9に固定する機構」とは別に、カートホイール非依存的な「およそ9前後に限定する機構」が存在すると考えられる。このような複数の機構が存在するからこそ、中心子の9回対称性が多様な生物種の間で厳密に保持されているのかもしれない。

## 2. 研究の目的

本研究は、中心子9回対称性構造の構築において、カートホイール依存的機構と非依存機構がどのように協調し、どちらが優位なのか、非依存機構を担う実体は何か、を明らかにすることを目的とする。

このため、人為的操作によってカートホイールの回転対称性を変化させたときの中心子構造を検討することにした。これにより、カートホイールの構造が中心子構造に及ぼす影響がわかるのと同時に、カートホイール非依存機構の影響がどの程度なのか、非依存機構が中心子構造のどの部分に存在するのか、などの手がかりが得られると考えた。

## 3. 研究の方法

変異 SAS-6 の作製はスイス Paul Scherrer 研究所の Michel Steinmetz 博士らとの共同研究で行った。SAS-6 は、試験管内で会合してカートホイール様の構造を形成する。クラミドモナス SAS-6 遺伝子の会合面に相当するアミノ酸配列を改変し、大腸菌を用いて組換え変異 SAS-6 を28種類作製した。それらを試験管内で会合させ、その会合性体の構造を原子間力顕微鏡で観察した。会合体の回転対称性が様々に変化した変異 SAS-6 を得た。

会合性が変化した変異 SAS-6 を3種類 (NN2, NN15, NN24) 選択し、それらに導入した変異と同じ変異をクラミドモナス SAS-6 遺伝子 (ゲノムクローン) に導入し、さらにコード領域のC末端に hemagglutinin (HA) タグを挿入したコンストラクトを作製した。これらを SAS-6 欠失クラミドモナス突然変異株 bld12 に導入して発現させた。クラミドモナスでは遺伝子を導入したクローンの数%しかその遺伝子を発現しないため、形質転換後に得られたクローンを100-600株単離して、それらを抗-HA抗体を用いたウェスタブロットによってスクリーニングした。

Bld10p の機能抑制の影響を調べるため、N末端、またはC末端を大きく欠失した Bld10p ( $\Delta$ N3,  $\Delta$ C2) と NN24 を同時に発現する株を樹立した。まず、株の交配により BLD10 遺伝子を欠失する突然変異株 bld10 と bld12 変異株の二重変異株を作成した。これと bld12::NN24 株を交配して bld10bld12::NN24 を樹立し、これに  $\Delta$ N3 または  $\Delta$ C2 遺伝子を導入して bld10bld12::NN24 $\Delta$ N3、bld10bld12::NN24 $\Delta$ C2 を作製した。

樹立した各種の変異遺伝子発現株と、コントロールとして野生型 SAS-6 を発現する株から、中心子を含む細胞骨格複合体を単離して、中心子とカートホイールを電子顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 変異 SAS-6 の作製と会合性

SAS-6 ダイマーは球状の頭部が2つ、棒状の尾部が1つという形状の分子で、カートホ

イールでは、9個のダイマーが球状頭部を環状に会合させ、尾部を放射状に配置させている (van Breugel et al., 2011)。この頭部間の会合面に、結合を強化するような変異を導入したものを28種類作製し、それぞれを組換えタンパク質として大腸菌に発現させた。それぞれを試験管内で会合させたものを原子間力顕微鏡で観察し、実際に会合性が変化した変異 SAS-6 を3種類選んで詳しく解析した。NN2, NN15, NN24 と名付けたそれぞれの変異 SAS-6 は、以下の割合で会合体を形成した。(以下、回転対称次数 / %)

NN2: 7回 / 28%, 8回 / 40%, 9回 / 38%  
 NN15: 8回 / 47%, 9回 / 46%, 10回 / 7%  
 NN24: 5回 / 20%, 6回 / 65%, 7回 / 16%

#### (2) クラミドモナス細胞における変異 SAS-6 機能の検討

NN2, NN15, NN24 と同一の配列改変をした SAS-6 遺伝子をクラミドモナス突然変異株 bld12 に導入し、各変異蛋白質をクラミドモナス細胞に発現させた。対照実験として、変異を導入していない、野生型 SAS-6 の発現株も同様に樹立した。これらの発現により、bld12 の鞭毛形成能は大きく回復した。さらに、発現した蛋白質の局在を調べたところ鞭毛の根元、つまり中心子に局在した。これらのことから変異 SAS-6 は細胞内で中心子形成に機能していることがわかった。

#### (3) 変異 SAS-6 発現株における中心子とカートホイールの構造

次に、これらの発現株細胞における中心子を電子顕微鏡で観察し、変異 SAS-6 の発現が中心子構造に及ぼす影響を検討した。bld12 の中心子は、微小管数が7-11本に揺らぐが、野生型 SAS-6 を発現させると、100%の中心子が9本の微小管をもつようになる (Nakazawa et al., 2007)。しかし、NN2 または NN15 を発現させた場合は、9本微小管の中心子に加えて、8本微小管のものが数%ずつ含まれるようになり、NN24 を発現させた場合は33%含まれるようになった。この結果はカートホイールが中心子の9回対称性に大きく寄与していることを示すものの、その役割は限定的であり、カートホイールに依存しない機構の存在を改めて示すものと考えられる。

これまでの知見から、カートホイールの回転対称性構造は SAS-6 の会合性に基くと推察される。そこで主に6回対称性の会合体を形成し、中心子構造に対する影響ももっとも大きい NN24 を発現する株において、カートホイールを観察した。その結果、意外なことに、ほとんどのカートホイールのスポークが9本であった。この事実は、中心子の9回対称性構造の構築に働くカートホイールとは独立の機構が、カートホイール構造にも影響を及ぼしていることを示唆する。

#### (4) Bld10p 機能抑制の変異 SAS-6 機能発現への影響

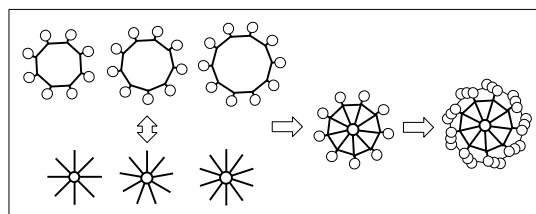
我々はカートホイール構造に影響を及ぼす要因として、最も可能性が高いのは、その周りに環状配置された微小管 (微小管壁) ではないかと推察した。その理由は、前述の通り、カートホイールを欠失する bld12 変異株においても微小管9本の中心子が高頻度で形成されるからである (Nakazawa et al., 2007)。そこで微小管とカートホイールの相互作用を弱めた時、カートホイール構造がどのようなかを検討することにした。推測が正しければ、変異 SAS-6 の会合性をより反映したカートホイールが形成されるはずである。

前述の通り、我々は以前に中心子形成に必須なタンパク質として Bld10p を同定した。この蛋白質はカートホイールと微小管の境界部分に局在し、N末端またはC末端を大きく欠損させた Bld10p ( $\Delta N3$ ,  $\Delta C2$ ) を発現させると、カートホイールと微小管の結合が一部解離する (Hiraki et al., 2007)。これらの結果から、Bld10p はカートホイールと微小管を繋ぐ役割を担っていると考えられる。そこで  $\Delta N3$  または  $\Delta C2$  を NN24 と同時に発現させ、スポークと微小管の相互作用を弱め、その時のカートホイール構造を観察した。

その結果、NN24 単独で発現させた時とは異なる中心子・カートホイール像が観察された。 $\Delta C2$  と NN24 を発現させた株の中心子を観察した時、中心子の微小管数とカートホイールのスポーク数の両方が識別できる像が13例観察された。それらの微小管数は7-9本で、スポーク数は6-8本であった。つまり、想定したとおり、微小管とカートホイールの結合性が弱まった結果、微小管とスポークの数にずれが生じた。そして、カートホイールのスポーク数は、NN24 の会合性をより反映したものとなった。この結果より、カートホイールの回転対称性に影響を及ぼすのは周り微小管壁であることが強く示唆された。

#### (5) 中心子の9回対称性確立機構の新しいモデル

以上の結果は、現在広まっている考え、すなわち「中心子の構築過程では、SAS-6 が会合して先にカートホイールが形成され、それが足場となって微小管数が決定される」という考えとは矛盾する。我々は中心子の9回対称性構造の構築機構について、これまでとは異なる以下のモデルを提唱する (図)。



図・中心子9回対称性の確立機構モデル。中心子

形成過程の初期に、微小管壁（上段）とカートホイール（下段）が独立に形成・消失を繰り返す。それぞれの9回対称性にはある程度の揺らぎがあるが、微小管数とスポーク数、微小管壁の内径とカートホイールの直径が一致したものが成熟した中心子へと構築される。

このモデルでは、中心子の構築過程で、微小管壁とカートホイールは、それぞれが独立に形成と消失を繰り返しつつ、両者の間ではダイナミックな相互作用が行われていると考える。その結果、微小管壁の微小管数とカートホイールのスポーク数、および微小管壁の内径とカートホイールの外径などが一致した場合のみ安定化されて、中心子へと構築される。従って、NN24 変異をもつ SAS-6 がスポーク6本のカートホイールを形成しても、微小管壁と形が合致しないため安定化されないが、わずかに形成されるスポーク9本のカートホイールは安定化されるため、そのようなカートホイールを内包する中心子が高頻度で形成されると推察される。

このモデルは、中心子の普遍的な9回対称性構造が蛋白質集合の過程が順に起こって決定されるのではなく、カートホイールと微小管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いう、まったく新しい考え方に基づく（Hilbert et al., 2016）

#### <引用文献>

Hirono, M. "Cartwheel assembly" *Philosophical Transactions B* **369** (1650). 20130458 (2014).

Hiraki, M., Nakazawa, Y., Kamiya, R., and Hirono, M. "Bld10p constitutes the cartwheel-spoke tip and stabilizes the 9-fold symmetry of the centriole" *Curr. Biol.* **17**, 1778-1783 (2007).

Matsuura, K., Lefebvre, P.A., Kamiya, R., and Hirono, M. "Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first nine-fold symmetrical structure appearing during assembly" *J. Cell Biol.* **165**, 663-671 (2004).

Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R., and Hirono, M. "SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole" *Curr. Biol.* **17**, 2169-2174 (2007).

van Breugel, M., Hirono, M., Andreeva, A., Yanagisawa, H. A., Yamaguchi, S., Nakazawa, Y., Morgner, N., Petrovich, M., Ebong, I.

O., Robinson, C. V., Johnson, C. M., Vepintsev, D., Zuber, B. "Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles" *Science*. **331**, 1196-1199 (2011).

Hilbert M, Noga A, Frey D, Hamel V, Guichard P, Kraatz SH, Pfreundschuh M, Hosner S, Flückiger I, Jaussi R, Wieser MM, Thieltges KM, Deupi X, Müller DJ, Kammerer RA, Gönczy P, Hirono M, Steinmetz MO. "SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriole architecture." *Nat. Cell Biol.* **18**, 393-403 (2016).

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Ueki, N., Ide, T., Mochiji, S., Kobayashi, Y., Tokutsu, R., Ohnishi, N., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Tanaka, K., Minagawa, J., Hisabori, T., Hirono, M., Wakabayashi, K. "Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in *Chlamydomonas reinhardtii*" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **113**, 5299-5304 (2016). doi: 10.1073/pnas.1525538113. 査読有

Hilbert M, Noga A, Frey D, Hamel V, Guichard P, Kraatz SH, Pfreundschuh M, Hosner S, Flückiger I, Jaussi R, Wieser MM, Thieltges KM, Deupi X, Müller DJ, Kammerer RA, Gönczy P, Hirono M., Steinmetz MO. "SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriole architecture." *Nat. Cell Biol.* **18**, 393-403 (2016). doi: 10.1038/ncb3329. 査読有

Kubo T, Hirono M., Aikawa T, Kamiya R, Witman G.B. "Reduced tubulin polyglutamylaton suppresses flagellar shortness in *Chlamydomonas*" *Mol. Biol. Cell.* **26**, 2810-2822 (2015). doi: 10.1091/mbc.E15-03-0182. 査読有

Kajikawa M, Sawaragi Y, Shinkawa H, Yamano T, Ando A, Kato M, Hirono M., Sato N, Fukuzawa H. "Algal dual-specificity tyrosine

phosphorylation-regulated kinase, triacylglycerol accumulation regulator1, regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen or sulfur deficiency" *Plant Physiol.* **168**, 752-764 (2015). doi: 10.1104/pp.15.00319. 査読有

Hirono, M. "Cartwheel assembly" *Philosophical Transactions B* **369** (1650). 20130458 (2014). (Issue of "Centrosome Renaissance") doi: 10.1098/rstb.2013.0458. 査読有

Ishikawa, H., Ide, T., Yagi, T., Jiang, X., Hirono, M., Sasaki, H., Yanagisawa, H., Wemmer, K.A., Stainier, D.Y., Qin, H., Kamiya, R., Marshall, W.F. "TTC26/DYF13 is an intraflagellar transport protein required for transport of motility-related proteins into flagella" *eLife* **3**, e01566 (2014). doi: 10.7554/eLife.01566. 査読有

Kubo, T., Yanagisawa, H.A., Liu, Z., Shibuya, R., Hirono, M., Kamiya, R. "A conserved flagella-associated protein in *Chlamydomonas*, FAP234, is essential for axonemal localization of tubulin polyglutamylase TTL9" *Mol. Biol. Cell* **25**, 107-117 (2014). doi: 10.1091/mbc.E13-07-0424. 査読有

Yanagisawa, H.A., Mathis, G., Oda, T., Hirono, M., Richey, E.A., Ishikawa, H., Marshall, W.F., Kikkawa, M., Qin, H. "FAP20 is an inner junction protein of doublet microtubules essential for both the planar asymmetrical waveform and stability of flagella in *Chlamydomonas*" *Mol. Biol. Cell* **25**, 1472-1483 (2014). doi: 10.1091/mbc.E13-08-0464. 査読有

Wang, L., Yamano, T., Kajikawa, M., Hirono, M., Fukuzawa, H. "Isolation and characterization of novel high-CO<sub>2</sub>-requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*" *Photosynth. Res.* **121**, 175-184 (2014). doi: 10.1007/s11120-014-9983-x. 査読有

Nakazawa, Y., Ariyoshi, T., Noga, A., Kamiya, R., and Hirono, M. "Space-dependent formation of central pair microtubules and their interactions with radial spokes" *PLoS One* **9** (10) e110513 (2014). doi:

10.1371/journal.pone.0110513. 査読有

Arakaki, Y., Kawai-Toyooka, H., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Noga, A., Hirono, M., Olson, B.J., Nozaki, H. "The simplest integrated multicellular organism unveiled" *PLoS One* **8** (12), e81641 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0081641. 査読有

Yamamoto, R., Song, K., Yanagisawa, H., Fox, L., Yagi, T., Wirschell, M., Hirono, M., Kamiya, R., Nicastro, D., and Sale, W. S. "The MIA complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility" *J. Cell Biol.* **201**, 263-278 (2013). doi: 10.1083/jcb.201211048. 査読有

Engel, B. D., Ishikawa, H., Wemmer, K. A., Geimer, S., Wakabayashi, K., Hirono, M., Craige, B., Pazour, G. j., Witman, G. B., Kamiya, R., Marshall, W. F. "The role of retrograde intraflagellar transport in flagellar assembly, maintenance and function" *J. Cell Biol.* **199**, 151-167 (2012). doi: 10.1083/jcb.201206068. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

苗加彰、Manuel Hilbert, Michel O. Steimetz, 広野雅文: 中心子の 9 回対称性構造構築における SAS-6 の自己会合性の役割、日本動物学会、新潟コンベンションセンター、新潟県新潟市、2015.9.17-19.

広野雅文: 中心子の 9 回対称性構造構築における SAS-6 会合性の役割、日本細胞生物学会、タワーホール船堀、東京都江戸川区、2015.6.30-7.2

Hirono, M.: *Chlamydomonas*, a powerful model organism for studying centriole assembly. 第 37 回日本分子生物学会年会 (招待講演) パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2014.11.25-27.

苗加彰, Michel Steinmetz, Manuel Hilbert, 広野雅文: 中心子構造の構築におけるカートホイール蛋白質 SAS-6 の自己会合性の役割, 第 47 回日本原生生物学会大会, 宮城教育大学, 宮城県仙台市, 2014.10.30-11.2.

藤美潮, 広野雅文: 鞭毛の構造維持に異常を持つクラミドモナス突然変異株

*lpp1*, 第 85 回日本動物学会大会, 東北大学、宮城県仙台市, 2014.9.10-13.

阿部耕太, 柳澤春明, 和田卓巳, 小田賢幸, 中村拓司, 吉川雅英, 武田洋幸, 広野雅文: 鞭毛中心対微小管の普遍的構成蛋白質 Pf32p のゼブラフィッシュにおける機能解析, 第 85 回日本動物学会大会, 東北大学、宮城県仙台市, 2014.9.10-13.

T. Wada, K. Abe, H. Yanagisawa, T. Oda, T. Nakamura, M. Kikkawa, and M. Hirono: Pf32p, a novel central-pair-projection protein required for flagellar beating with a regular periodicity, 16th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Asilomar, CA, USA, June 8-13, 2014.

Wada, T., Abe, K., Nakamura, T., Yanagisawa, H., and Hirono, M.: Regulation of synchronous flagellar beating by the central pair microtubules in *Chlamydomonas*. 第 84 回日本動物学会大会、岡山大学、岡山県岡山市、2013.9.26-28.

広野雅文: 有性生殖過程の細胞骨格基盤—クラミドモナスがもたらす中心子構築機構研究のブレークスルー、日本植物学会第 77 回大会 (招待講演) 北海道大学、北海道札幌市、2013.9.13-15.

Hirono, M.: Novel features in formation and function of the "9+2" axoneme revealed by a basal body-deficient mutant of *Chlamydomonas*. The 25th CDB Meeting "Centrosome and Cilia from Fertilization to Cancer". RIKEN CDB, Kobe, Hyogo, Japan. 2013.6.17-18.

Hirono, M. "Novel features in the formation and function of the "9+2" axoneme revealed by a basal-body-deficient mutant of *Chlamydomonas*" Symposium "Structural biology of flagella/cilia/centriole" (招待講演) Paul Scherrer Institute, PSI Villigen, Switzerland. 2012.6.20.

Noga, A., Yamaguchi, S., Kamiya, R. and Hirono, M. "Direct interaction between SAS-6 and Bld10p, the two known cartwheel components that establish the ninefold symmetry of the centriole" 第 64 回日本細胞生物学

会大会、神戸国際会議場、兵庫県神戸市、2012.5.28-31.

〔図書〕(計 1 件)

広野雅文 他、化学同人、原生生物フロンティア、2014、165. pp43-56.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

広野 雅文 (HIRONO, Masafumi)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号 : 10212177

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :