

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06749

研究課題名（和文）トリプレット微小管形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of triplet microtubule assembly

研究代表者

中澤 友紀（Nakazawa, Yuki）

沖縄科学技術大学院大学・サイエンステクノロジーグループ・サイエンス・アンド・テクノロジー・アソシエイト

研究者番号：50508851

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：形成機構の詳細な理解が進む「細胞質微小管系」に比べ、中心子・繊毛軸系に見られる安定な「トリプレット・ダブルット微小管」の形成機構は不明な点が多い。この解明を目指し、本研究では、トリプレット微小管構造に異常を示すクラミドモナスの新規・既存突然変異株を複数用い、各単独変異と多重変異による中心子構造への影響から、トリプレット形成機構における各タンパク質の機能とタンパク質間の相互作用の解析を試みた。その結果、そのうち一つについての詳細な新たな機能と、その他複数間の相互作用の有無が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いる変異株の多くが、他の生物においては見られない「部分的な」中心子・トリプレット構造の異常を持つ。この特徴を備えたクラミドモナス中心子突然変異株を用いた遺伝学的アプローチは全生物に先駆けて大きな成果を上げてきた。これまでの研究の蓄積によって安定な重要変異株が揃っていることに加え、本研究では最近単離した新規の突然変異株を複数組み合わせ合わせた解析を行っており、このようなアプローチを行うことが可能なのは本研究のみである。本研究によって得られたトリプレット関連タンパク質の機能と互いの関係の知見により、トリプレット/ダブルットという普遍的な微小管構造の構築原理の一端を詳細に明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Compared to the "cytoplasmic microtubule system," whose assembly mechanism is now well understood, the assembly mechanism of the stable "triplet/doublet microtubules" found in the centrioles and ciliary axonemes is still largely unknown. To elucidate this mechanism, I used several novel and known Chlamydomonas mutants showing defects in the triplet microtubule structure and tried to analyze the function of each protein in the triplet assembly process and the interaction between the proteins based on the effects of each single and multiple mutations on the centriole structure. The results revealed a novel function of one of them in triplet assembly and the interactions among the others.

研究分野：細胞生物学、形態学

キーワード：トリプレット微小管 中心子 中心小体 ダブルット微小管 鞭毛基部位

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の微小管系細胞骨格には、微小管重合中心(MTOC)から伸長する細胞質微小管(動的な微小管系)と、中心体の核構造である中心子(centriole)を構成するトリプレット微小管、およびそこから伸長して形成される繊毛・鞭毛軸系のダブルット微小管という安定な微小管系が存在する。これら二つの微小管系は、安定性、構造、結合タンパク質などの点で異なる。細胞質微小管動的微小管系の形成機構については $\gamma$ -tubulin環状複合体( $\gamma$ -TuRC)が重合核となって形成され(図1)、その重合核形成の調節機構や重合過程の分子動態、調節因子などが詳細に明らかにされている。一方で、ダブルット・トリプレット微小管の形成の分子機構については、そもそも $\gamma$ -TuRCが形成に関与するのか、という問題を含め、大部分が未解明である。

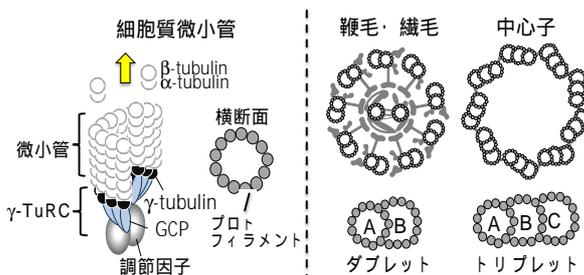


図1. 細胞質微小管、繊毛・中心子微小管構造の模式図

クラミドモナスを用いたこれまでの研究によって、トリプレット微小管の形成と維持に関与するいくつかの保存されたタンパク質が同定されている(図2)。我々のグループが同定したBld10p(ヒト中心子タンパク質Cep135のホモログ)は、トリプレット微小管全体の配置と形成に寄与する。さらに、tubulin superfamilyに属する $\delta$ -tubulinと $\epsilon$ -tubulinは、トリプレットのC小管、B小管の形成・安定化に必須なタンパク質として知られている。A小管の形成については、動的微小管系と同様に $\gamma$ -TuRCが担うことを示唆する報告があったが、それを直接示す結果はこれまで得られていなかった。

しかし最近我々は、クラミドモナスに唯一存在する $\gamma$ -tubulin遺伝子に変異を持つ新規突然変異株***bld13-1***と***bld13-2***を単離し、それらのトリプレットA小管の構造に異常が生じていることを明らかにした。このことから、 $\gamma$ -tubulinがトリプレット形成にも関与することが示唆された。この変異株に加え、申請者はBld10pと結合し、トリプレット形成に働くと考えられるSAS-4の新規クラミドモナス突然変異株***bld14***の単離にも成功した。つまり我々のグループには上記の一連のタンパク質の変異株がすべて揃うこととなり、これらの変異遺伝子の遺伝学的相互作用と、タンパク質間の相互作用、細胞内局在などを網羅的に解析することによって、トリプレット微小管の構築メカニズムについてアプローチできるという極めて有利な状況が生まれている。

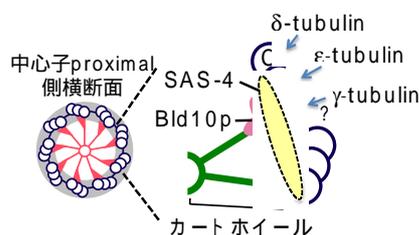


図2. トリプレット微小管近傍模式図と関連タンパク質

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の解析により、これらのタンパク質が、いつどのように機能してトリプレット微小管構造が形成されるのか、 $\gamma$ -tubulinはトリプレット形成にどのように働くのか、環状複合体形成は必要か、という問題を明らかにすることを目的とする。これまで変異型 $\gamma$ -tubulinを用いた遺伝学的解析はコウジカビ、酵母、線虫などで行われているが、これらの生物は一般的構造の中心子を持たない。一方、クラミドモナスは高等動物などが持つ典型的な中心子構造を持つ、遺伝学的解析に適している、中心子を欠失しても致死とならない、中心子と鞭毛の微細構造を極めて効率良く観察できる、など多くの利点を備えており、中心子の構築機構を研究するには、最適のモデル生物である。本研究では我々が単離したクラミドモナス $\gamma$ -tubulin突然変異株***bld13***を用いるが、このように中心子構造に異常を生じる $\gamma$ -tubulin変異株はほとんど報告されていない。また重要なことに、中心子構成タンパク質は多くの生物で保存されており、クラミドモナスを用いた遺伝学的アプローチは全生物に先駆けて大きな成果を上げてきた。これまでの研究の蓄積によって $\delta$ -tubulinと $\epsilon$ -tubulinの変異株である***uni3***、***bld2***など、安定な重要変異株が揃っていることに加え、我々のグループは過去単離した***bld10***、最近単離した***bld14***を組み合わせた解析が可能であり、このようなアプローチを行うことができるのは我々のみである。そのため、本研究によってトリプレット関連タンパク質の機能の詳細と互いの関係が初めて明らかになれば、トリプレット/ダブルットという普遍的な微小管構造の構築原理の理解が大きく進むはずである。

### 3. 研究の方法

#### 各突然変異株における、トリプレット微小管関連タンパク質の局在観察

上述の各突然変異株（新規：*bld13*, *bld14*, 既存：*bld10*, *bld12*, *bld2*, *uni3*）また追加で単離された新規トリプレット関連突然変異株 *poc1* において、他のトリプレット関連タンパク質の局在に異常が生じるかを調べることで、両タンパク質間、また変異によるトリプレット構造異常-各タンパク質の関係についての手がかりを得る。具体的には、以下の突然変異株の細胞体及び細胞体から単離した中心子-鞭毛を含む細胞骨格構造（Nucleoflagellar apparatus; NFAp）を用いた間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法による局在観察を行い、野生型細胞における局在と比較する。タンパク質の検出には各タンパク質に対する特異的抗体（一部要調整）もしくは抗-HA タグ抗体を用いる。

#### 各突然変異株の多重変異株におけるトリプレット微小管の微細構造観察

2つのタンパク質変異株から作製した二重変異株において、その表現型が加算的な表現型なのか、それともいずれかの単一変異株の表現型に近い（エピスタティックな表現型）のかを調べれば、両タンパク質のトリプレット形成における相互作用がどのようなものか、手がかりが得られる。まずは新規変異株 *bld13*, *bld14*, *poc1* については各単独の変異株におけるトリプレット微小管の構造異常を、中心子マーカー抗体を用いた間接蛍光抗体法、および電子顕微鏡法により詳細に観察、評価する。この結果から各タンパク質のトリプレット形成機構における機能を考察する。次に、各二重変異株において、既存の中心子変異株が示す表現型である 1) 鞭毛形成異常、2) 細胞分裂異常によって評価し、この結果相互作用が予想された株については、同様に中心子マーカー抗体を用いた間接蛍光抗体法および電子顕微鏡法による観察により、トリプレット構造を詳細に検討する。またその表現型から、各タンパク質の機能と関係を考察する。

#### $\gamma$ -TuRC 構成タンパク質 GCP の局在観察

トリプレット形成に $\gamma$ -TuRC 形成は必要なのかを検討するため、 $\gamma$ -TuRC 構成タンパク質 GCP2, 3, 4 のトリプレット近傍における局在と、 $\gamma$ -tubulin 変異によるその局在への影響を調べる。具体的には、1) と同様に、野生型および *bld13* 細胞から単離した NFAp と特異的抗-GCP 抗体（調整予定）を用いた局在観察を行う。

### 4. 研究成果

各トリプレット微小管関連タンパク質のうち、クラミドモナスにおけるそれらのタンパク質に特異的に反応する抗体が存在しないもの（ $\gamma$ -tubulin, SAS-4, GCPs）については、それらタンパク質のペプチドを精製、抗原とし、ウサギに免疫を試みたものの、いずれも期間内に置いて特異的な抗体を得ることができなかった。また、コロナ禍の発生と所属機関の変更に伴い、研究遂行、再開に当初予定していた以上の時間を要した。そのため期間内は主に各突然変異株の中心子構造の観察に集中した。

#### $\gamma$ -tubulin のトリプレット形成機構における機能

*bld13-1*, *bld13-2* はそれぞれ、 $\gamma$ -tubulin 遺伝子内に一アミノ酸置換を起こす点変異を持つ。この変異株のトリプレット微小管の異常を電子顕微鏡により詳細に観察を行った結果、1) *bld13-1*, *bld13-2* 共にトリプレット微小管のうち、A 小管と C 小管にプロトフィラメントの部分的欠失が生じていること（図 3）、2) このプロトフィラメントの部分的な欠失はトリプレット構造のうち不安定な部位と予想される場所で起きていること（図 4）、3) A 小管のこの部分的な欠失は proximal 側へ向かうほど頻繁に生じ、Transition zone 以降軸系側では見られないことがわかった。つまりこの株では $\gamma$ -tubulin の変異により、トリプレット微小管のうち構造的に不安定な場所が、一旦形成伸長した後に proximal 側から脱重合していついていっていると考えられる。これらのことから、これまで $\gamma$ -tubulin が A 小管の proximal 端で働くことが広く示唆されてきたが、トリプレット微小管形成や安定化に関与することが初めて実験的に示唆された。さらに、A 小管だけでなく C 小管の形成や安定化にも寄与することが示唆された。また、*bld13-1* と *bld13-2* の変異がドミナントネガティブ効果を持つこと、これらの変異が置換を起こすアミノ酸が、 $\gamma$ -tubulin 分子内に置いて $\gamma$ -TuRC 形成時に隣接する $\gamma$ -tubulin との境界面に位置すると予想されることから、 $\gamma$ -tubulin がトリプレット微小管形成・安定化に機能する際、 $\gamma$ -TuRC を形成することが示唆された。*bld13-1*, *bld13-2* において置換が生じるアミノ酸残基はいずれもヒトを含む多くの真核生物に保存されており、本研究で示唆された $\gamma$ -tubulin のトリプレット形成機構における機能は広く保存されたものであると考えられる。これらの成果をまとめた学会発表は 2022 年に一件発表済み、2024 年に一件発表予定であり、現在論文投稿準備中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Nakazawa, Madoka Hiraki, and Masafumi Hirono
2. 発表標題 A suppressor mutation of a Chlamydomonas cilia-less mutant suggests a novel role of Bld10p, an essential protein for centriole assembly
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Nakazawa, Mao Horii, Saki Watanabe, Moeko Otsuki, Akira Noga, Ken-ichi Wakabayashi, Masafumi Hirono
2. 発表標題 -tubulin functions in assembling centriolar triplet microtubules
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mikito Owa, Yuki Nakazawa, Toshiyuki Oda, Haru-aki Yanagisawa, Akira Noga, Takashi Yamano, Hiro Iguchi, Hideya Fukuzawa, Masahide Kikkawa and Masafumi Hirono
2. 発表標題 Poc1 scaffolds the projections on the luminal side of centriolar microtubules and stabilizes inter-triplets and triplet-cartwheel connections
3. 学会等名 5th International Volvox Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://groups.oist.jp/stg/yuki-nakazawa>  
<https://groups.oist.jp/stg/yuki-nakazawa>  
法政大学生命科学部 廣野雅文研究室  
<https://sites.google.com/view/hirono-lab>  
<https://scholar.google.com/citations?hl=en&user=wLKZTkAAAAJ>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------