

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370088

研究課題名（和文） 中心子前駆体構造の構築機構の解明

研究課題名（英文） Assembly mechanisms of the centriole precursor

研究代表者 広野 雅文（Hirono Masafumi）

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：10212177

研究成果の概要（和文）：中心子の普遍的な 9 回対称性構造は、中心子形成初期に出現する 2 つの前駆体構造、アモルファス環とカートホイールによって規定される。本研究では、クラミドモナスを用い、アモルファス環構成蛋白質の有力な候補として CRC70 を初めて同定し、それが中心子構成蛋白質を集積させる活性を持つことを示した。さらに、カートホイールの中心部分は SAS-6 という蛋白質のダイマーが 9 回対称に会合して形成されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The centriole's nine-fold symmetry is largely determined by its two precursor structures, the amorphous ring and cartwheel. However, assembly mechanisms of these structures are totally unknown. In this study, we identified a Chlamydomonas protein CRC70 as a strong candidate for an amorphous ring component, and showed that this protein induces accumulation of centriolar component when overexpressed in Chlamydomonas and mouse cells. Furthermore, by functional analysis of SAS-6 based on its X-ray crystal structure, we showed that the central part of the cartwheel is composed of radially arranged nine SAS-6 dimers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動、微小管

1. 研究開始当初の背景

中心体の中核構造である中心子は、細胞周期ごとに自己複製する。また、9 本のトリブレット微小管が回転対称に配置した構造を持ち、繊毛・鞭毛の形成基部として機能する際にはこれが軸糸の 9 + 2 構造の鋳型となる。この特徴的な 9 回対称性構造が細胞周期制御をうけて構築される機構は、細胞生物学

の大きな謎である。

これらの問題を明らかにするため、我々はクラミドモナスの突然変異株を用いた研究を行い、bld10、bld12 という 2 つの変異株の遺伝子同定とその産物の機能の解明に成功した。興味深いことに、これら 2 つの産物（Bld10p と SAS-6）はいずれもカートホイールという構造の構成蛋白質であることが

判明した。カートホイールは中心子前駆体の1つで、ハブと9本のスポークをもつ9回対称性構造である。Bld10pはスポーク先端部、SAS-6はcartwheelの中心部を構成する。これらが欠失すると中心子が形成されないかまたは9回対称性構造が乱れることから、カートホイールが中心子構造の決定に重要な役割をになうことが初めて明らかになった。

中心子前駆体構造にはもう1つ、カートホイールよりも早く現れるアモルファス環という構造がある。中心子の構築開始機構やカートホイール形成に関与すると考えられる重要な構造だが、これまでその構成蛋白質は1つも同定されていない。

2. 研究の目的

本研究は、中心子の基本構造を規定する2つの前駆体がどのように構築されるかを説明することを目的とする。具体的にはカートホイールとアモルファス環の新規構成蛋白質を同定し、その機能を検討する。さらに、試験管内でそれらの構造の再構成を試みる。

3. 研究の方法

構成蛋白質を同定するには、1) Bld10pとSAS-6をカートホイール分画の指標として用い、中心子からカートホイールを単離してその成分を質量分析により網羅する；2) SAS-6、Bld10p、Cep201の特異抗体を用いるなどの方法で結合蛋白質を同定する；3) 他の中心子変異株やbld10サプレッサー変異株の解析によって新たな構成蛋白質を同定する；などを試みる。同定した蛋白質は、大腸菌、昆虫細胞などで発現させて精製し、それらを組み合わせることで前駆体構造の試験管内再構成を試みる。

4. 研究成果

(1) CRC70の同定と機能解析

クラミドモナスは1つの細胞に成熟した中心子と未熟な中心子が2つずつ存在する。我々は未熟中心子に特異的に局在し、成熟中心子からは消失する蛋白質CRC70を同定した。CRC70は未熟中心子のアモルファス環に相当する位置に局在した。

この蛋白質はヒト中心体蛋白質Cep70と相同性の高いアミノ酸50残基ほどの短い配列をもつ。この配列をもつ蛋白質は9回対称性の中心子をもつ生物に広く存在し、蛋白質ファミリー(Cep70ファミリー)を形成していることを見出した。

CRC70の発現が抑制されたクラミドモナス株では、中心子複製が阻害され、鞭毛を欠失する。一方、CRC70を過剰発現する株では、細胞質に中心子蛋白質(Bld10p、SAS-6)が異所的に集積することが明らかになった。さらに、CRC70をマウス細胞に発現させたところ、

クラミドモナス細胞の場合と同様に、中心子蛋白質が細胞質に異所的に集積し、新たな中心子が形成された。この結果は明らかに、CRC70が中心子の新規形成を誘導できることを示す。CRC70の哺乳類ホモログであるCep70中心子形成における機能は、これまでほとんど研究されてこなかったが、CRC70の結果から、これらの蛋白質は中心子の形成、特に初期過程に重要な働きを持つ保存された蛋白質グループである可能性が強く示唆された。

(2) SAS-6の結晶構造とカートホイールにおける分子配置

我々は以前に、中心子タンパク質SAS-6がカートホイールの構成タンパク質として、中心子構築に重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究では、英国MRCのグループとの共同研究でSAS-6分子の結晶構造を明らかにし、その情報をもとにクラミドモナスbld12変異株を用いた機能解析を行った。その結果、1) SAS-6は2つの球状の頭部と棒状の尾部からなる、ミオシン分子のような形状のダイマーを形成する、2) 頭部を介してダイマーが9回対称に結合し、会合したその形がカートホイールの中央部分と良く一致する、3) 変異を導入してダイマー間の結合を阻害したSAS-6は中心子形成に機能できない、4) ダイマー尾部はスポーク先端に局在する、という結果を得た。これらのことから、9個のSAS-6会合してカートホイールを形成していることが明らかになった。この成果は、中心子の9回対称性構造の構築機構の理解を飛躍的に進めるものであり、大きな反響を呼んだ。成果はScience誌に掲載された。

(3) SAS-6とBld10pの結合

カートホイールにおけるSAS-6の機能をさらに追求するため、我々が以前に同定したカートホイール構成蛋白質、Bld10pとの相互作用を検討したところ、SAS-6のコイルドコイル領域を一部含む、C末端領域がBld10pと直接結合することを見出した。この結果は、SAS-6がカートホイール周辺部分にC末端を向けて配置し、Bld10pがその領域に局在すること、というこれまでの知見と良く一致する。この結合を阻害する変異を導入したSAS-6は中心子形成に機能できないことから、SAS-6とBld10pの直接結合が中心子形成に極めて重要であることが初めて明らかになった。

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3件)

(1) Shiratsuchi, G., Kamiya, R., and Hirono, M. "Scaffolding function of the

Chlamydomonas procentriole protein CRC70, a member of the conserved Cep70 family" J. Cell Sci. 124, 2964-2975 (2011).
査読有
DOI: 10.1242/jcs.084715

(2) 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., Veprintsev, D., Zuber, B. "Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles" Science. 331, 1196-1199 (2011).
査読有
DOI: 10.1126/science.1199325

(3) Yamamoto, R., Hirono, M., and Kamiya, R. "Discrete PIH proteins function in the cytoplasmic preassembly of different subsets of axonemal dyneins." J. Cell Biol. 190, 65-71 (2010). 査読有
DOI: 10.1083/jcb.201002081

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) Yamamoto, R., Yanagisawa, H., Yagi, T., Hirono, M., Kamiya, R. "Two novel coiled-coil axonemal proteins, Mia1 and Mia2, are required for phototaxis and normal flagellar motility in *Chlamydomonas reinhardtii*" ASCB Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA Dec. 11-15, 2010.

(2) Viswanadha, R., Wirschell, M., Fox, L., Kramer, T., Kamiya, R., Hirono, M., Sale, W.S. "The *Chlamydomonas* flagellar I1 dynein assembles a 20S complex in the wild-type and *ida3* cytoplasm, but the I1 complex fails to enter the flagellum in the *ida3* mutant" ASCB Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA Dec. 11-15, 2010.

(3) Engel, B.D., Wakabayashi, K., Engel, K.B., Geimer, S., Hirono, M., Kamiya, R., and Marshall, W.F. "A temperature-sensitive mutant in retrograde intraflagellar transport (IFT) reveals that retrograde IFT carries a distinct set of cargo proteins and is required for the maintenance of flagellar function but not flagellar length." ASCB Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA Dec. 11-15, 2010.

(4) Kubo, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., Hirono, M., Kamiya, R. "Tubulin

Polyglutamylation Regulates Flagellar Motility by Affecting Functions of Inner-Arm Dyneins" 日本生物物理学会第 48 回年会, 仙台(2010 年 9 月 20 日~ 22 日)

(5) Kubo, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., Hirono, M., Kamiya, R. "Possible involvement of dynein regulatory complex in the regulation of inner arm dynein function by tubulin polyglutamylation" FASEB Summer Research Conferences Biology of Cilia and Flagella, Saxtons River, Vermont, USA, July 5-10, 2010.

(6) Yamamoto, R., Hirono, M., Kamiya, R. "A novel *Chlamydomonas* inner-arm-dynein-deficient mutant, *ida10*, harbors a mutation in a conserved protein with a PIH domain" 14th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. Wheaton College, Norton, MA, USA, June 6-10, 2010.

(7) Kosugi, W., Kamiya, R. and Hirono, M. "Biochemical characterization of the cartwheel using *Chlamydomonas* centrioles isolated by a new method" 第 62 回日本細胞生物学会, 大阪(2010 年 5 月 19 日~ 21 日)

(8) Shiratsuchi, G., Kamiya, R., Hirono, M. "Ccp201, a *Chlamydomonas* protein related to a mammalian centrosomal protein Cep70, functions in an early phase of centriole assembly" 第 62 回日本細胞生物学会, 大阪(2010 年 5 月 19 日~ 21 日)

(9) Kubo, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., Hirono, M., Kamiya, R. "Tubulin Polyglutamylation Regulates Flagellar Motility through Modulation of Axonemal Inner-Arm Dynein Activity" 第 62 回日本細胞生物学会, 大阪(2010 年 5 月 19 日~ 21 日)

(10) 廣野雅文 "中心子複製の謎 クラミトⅡ モナスカⅡ もたらしたフⅡ レークスルー" 日本農芸化学会 2010 年度大会、東京(2010 年 3 月 27 日~30 日)

(11) 廣野雅文、中澤友紀、平木まどⅡか、白土玄、神谷律 "Assembly mechanisms of the 9+2 structure of the flagellar axoneme" 日本分子生物学会 第 32 回年会、横浜(2009 年 12 月 9 日~12 日)

(12) Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R., and Hirono, M. “Novel features in formation and function of the “9+2” axoneme revealed by a basal-body-deficient mutant with variable numbers of triplet microtubules” American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting. San Diego, U.S.A., December 5-9, 2009

(13) Kubo, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., Hirono, M. and Kamiya, R. “Importance of tubulin polyglutamylolation for axonemal dynein function as revealed by a novel *Chlamydomonas* mutant” International Workshop Dynein. Kobe, Japan, November 1-5, 2009

(14) Kubo, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., Hirono, M. and Kamiya, R. “Regulation of axonemal dyneins by tubulin polyglutamylolation” International Workshop Dynein 2009. Kobe, Japan, November 1-5, 2009

(15) Yamamoto, R., Hirono, M. and Kamiya R. “A novel *Chlamydomonas* inner-arm-dynein-deficient mutant, ida10, harbors a mutation in a conserved protein with a PIH domain” International Workshop Dynein 2009. Kobe, Japan, November 1-5, 2009

(16) 白土玄、神谷律、廣野雅文 “中心子構築の足場として機能する新規クラミトモナス蛋白質 Ccp201” 日本動物学会 第80回大会、静岡(2009年9月17日~19日)

(17) Tomohiro Kubo, Haru-aki Yanagisawa, Toshiki Yagi, Masafumi Hirono, and Ritsu Kamiya “Importance of tubulin polyglutamylolation for cilia/flagella motility as revealed by a novel *Chlamydomonas* mutant” 第61回日本細胞生物学会大会、名古屋(2009年6月)

(18) Yuki Nakazawa, Madoka Hiraki, Ritsu Kamiya, and Masafumi Hirono “Novel features in formation and function of the “9+2” axoneme revealed by a *Chlamydomonas* mutant that produces basal bodies with variable numbers of triplet microtubules” 第61回日本細胞生物学会大会、名古屋(2009年6月2~4日)

[その他]
ホームページ等
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seiri/chlamy/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広野 雅文 (HIRONO MASAFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：10212177