

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06257

研究課題名（和文）Centrioleの自己複製における鋳型の意義の解明

研究課題名（英文）Elucidating the significance of the template in centriole duplication

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：中心子は9本の微小管からなる普遍的な構造のオルガネラで、新しい中心子（娘）は既存中心子（母）から「複製」される。この形成様式は真核生物に共通するが、その意義は不明である。本研究は、中心子の微小管数がバラつくクラミドモナス突然変異株で母と娘中心子の微小管数の相関を調べ、複製が微小管の数を規定する可能性を探った。中心子微小管の数を多数計測する方法を探索した結果、単離した中心子の微小管数を膨脹顕微鏡法によって計測することが可能になった。この技術を使って、母・娘中心子ペアの微小管数を計測すれば、近い将来に中心子複製の意義の端緒をつかむことができると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中心子は進化の過程で高く保存されており、その9回対称性構造は繊毛の内部構造（9+2構造）の鋳型として重要な意味をもつ。その形が、複製という一見奇妙な形成様式を経ることは数十年前から見いだされていたが、その意義は未だに謎のままである。本研究課題は中心子の9回対称性構造の確立にこの形成様式が寄与している可能性を追求する、野心的な試みであった。残念ながら研究期間内にこの謎の解明には至らなかったが、この問題への1つのアプローチ法を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Centrioles are conserved organelles composed of nine triplet microtubules, and new centrioles (daughters) are “duplicated” from pre-existing centrioles (mothers). This manner of formation is common in eukaryotes, but its significance is unknown. This study investigated the correlation between the number of microtubules in mother and daughter centrioles in a *Chlamydomonas* mutant in which the number of triplet microtubules in the centriole varied, and explored the possibility that the duplication limits the number of microtubules. After searching for a method to measure the number of microtubules in a significant number of centrioles, we were able to measure the number of microtubules in isolated centrioles by the expansion microscopy. Measuring the microtubule numbers in mother-daughter centriole pairs by this technique may provide clues to the significance of centriole duplication in the near future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心小体 基底小体 クラミドモナス トリプレット微小管 SAS-6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中心子は真核細胞における微小管構造形成の司令塔とも呼ぶべきオルガネラで、中心体の中核構造であるとともに、鞭毛・繊毛の形成基部 (basal body) としても機能する。9本の短いトリプレット微小管が回転対称に配置した円筒状の構造を持ち、この9本の微小管を基本とする特徴的な構造パターンは、単細胞生物からヒトに至るまで、ほとんどすべての中心子に共通している。

このオルガネラは、不思議なことに自己複製によって形成される。正常な形成プロセスにおいては、母中心子の側面に娘中心子が細胞周期ごとに形成される (図1)。DNAの複製のように、構造的な情報が伝達されているように見えないのに、なぜこのような形成様式をとるのか、母中心子に鋳型としての機能はあるのかという、誰もが抱く問いに対する答えは見つかっていない。本研究課題では、中心子の9回対称性構造の確立に、鋳型依存的複製という形成様式が寄与している可能性を追求し、この問いに対する答えを見出すことを目指す。

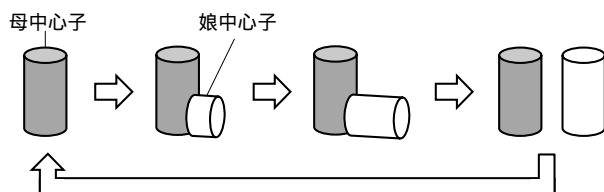


図1. 中心子の自己複製。娘中心子は、細胞周期ごとに、母中心子の側面から出芽するように形成される。

我々はこれまでに、中心子に異常を持つクラミドモナス突然変異株の単離と解析により、中心子のトリプレット微小管の数の決定にはカートホイール (以下CW) という構造が本質的に重要な役割を果たすことを明らかにした。CWは中心子形成初期に現れる9回対称性の放射状構造で、その構成タンパク質SAS-6を欠失したクラミドモナス変異株 (bld12) の中心子では微小管の数が8-10本にバラつく。しかし、SAS-6とCWを欠失したbld12変異株でも~70%の中心子は正しく9本の微小管をもつことや、in vitroで5-7回対称に会合する改変SAS-6をbld12に発現させても中心子の微小管数への影響は限定的であることから、中心子の9回対称性構造の確立には、CWとは別な複数の機構が働くと考えられる。そこで我々は、中心子形成過程で9回対称性が確立する時期に働くタンパク質Bld10p (ヒト中心体タンパク質Cep135のホモログ) に着目して解析したところ、このタンパク質が微小管の間の架橋構造を構成しており、CWを欠失した状態で短いBld10p分子を発現させると中心子の直径が小さくなってトリプレット微小管の数が減少することを見出した。これらの結果は、Bld10pが微小管間を適切な距離に保つことによって、CWとは独立に中心子の9回対称性の確立に機能することを示している。しかし、微小管間の架橋が微小管の数に影響するには、微小管形成の場を環状に配置し、その直径をおおよそ中心子の直径と同程度に制限する「場」が必要なはずである (図2)。そして、その「場」が母中心子の側面にあることと大きく関係していると推察される。

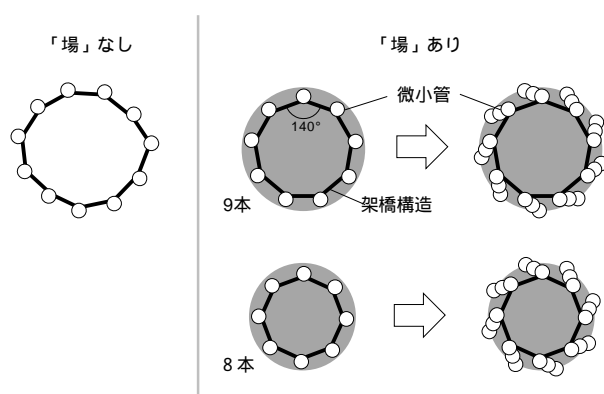


図2. 中心子形成における「場」の必要性。中心子形成の初期には、シングレット微小管がBld10p (太線) によって一定の距離に架橋される。しかし、微小管間の距離が一定でも、微小管の形成を制限する「場」がなければ微小管は9本にならない (左上図)。「場」(グレーの円)の直径が適正であれば正しく9本になり (右上図)、その直径が小さくなれば、中心子微小管の数も減少するはずである (右下図)。図中に140°と示したのは正9角形の内角 (後述)。

2. 研究の目的

本研究は、中心子複製において母中心子の直径が、微小管形成の場の直径を規定し、中心子の微小管の数の決定に寄与している可能性を明らかにすることが目的である。寄与していることを実証するには、母中心子の微小管数が変化したときに、その側面から形成される娘中心子の微小管数がそれに応じて変化することを示す必要がある。そのために、中心子の微小管数がバラつくクラミドモナス突然変異株と、遺伝子改変によって微小管数が極端に少ない中心子を形成するクラミドモナス株を用いて解析を行う。

これらの株は、我々が微小管数の決定機構の一端を解明し、理解を深めてきた過程で我々によ

って単離・樹立された株である。中心子の微小管数はほとんどすべての真核生物に保存されており、実験材料として用いられる生物の中で 9 本以外の中心子を形成するのは我々が単離したクラミドモナス突然変異株しか存在しない。また、中心子の微小管数を遺伝子改変によって変化させる実験系を持っているのは、世界でも我々のグループだけである。

前述のとおり、微小管数を単独で厳密に 9 本に決定する機構は存在しないため、我々が想定している母・娘中心子ペアの微小管数の相関も、9→9、8→8 といった厳密なものではなく、微小管数の少ないものからは少ないものが形成される「傾向」が検出されると推察される。したがって、微小管数が母娘の間で伝達されているかを知るには、母・娘中心子ペアの微小管数を多数調べて統計的に解析する必要がある。クラミドモナスは母・娘中心子と繊毛軸系を含む細胞骨格 (NFAp) を容易に単離できるため、その構造を効率よく観察することができる。また、母中心子は必ず繊毛の基部にあり、娘中心子もその近傍の決まった位置に保持されているため、母娘の関係を確認しつつ両者の構造を観察することができる。クラミドモナスは微小管数の相関を統計的に解析できる可能性をもつ唯一の生物材料であり、我々にはその中心子の解析に関する技術の蓄積がある。

3. 研究の方法

本研究は、母・娘中心子ペアの微小管数の相関の有無を明らかにするため、中心子の微小管数が主に 8 本から 10 本にバラつくクラミドモナス突然変異株 bld12 が形成する母・娘中心子ペアの微小管数を計測し、母中心子の微小管数が 8 または 10 本のペアについて、それぞれ数十の観察例を取得する。そのための方法として以下を計画している。

(1) 突然変異株 bld12 から単離した NFAp を化学固定、染色、樹脂包埋し、厚切りにした切片を電子線トモグラフィー法により観察する。400 nm 程度の厚さにすれば母・娘中心子のペアが同一切片内で観察される確率は充分高いはずである。微小管数が 8 または 10 本の中心子の出現頻度はそれぞれ~13%で、異常な微小管数の中心子からは鞭毛が形成されにくいことがわかっているが、NFAp に含まれる中心子でもそれぞれ~5%含まれることがわかっている。これまでの経験から、数十例のトモグラムを取得するには合計百時間程度の観察であろうと推測される。

(2) bld12 が形成する 8 または 10 本微小管の中心子は、正常な 9 本微小管の中心子と比べて直径が~89% (8/9) または~111% (10/9) であり、変化が小さいために相関が検出されない可能性がある。母中心子の直径をもっと大きく変化させて相関を調べるため、5-7 本微小管の中心子を形成する遺伝子改変株を用いる。しかし、この改変株細胞では微小管数を少なくするような遺伝子改変をしてあるため、その中で形成される母・娘中心子ペアを観察しても遺伝子改変の影響が排除できない。そこで、クラミドモナス有性生殖過程の接合現象を利用して、遺伝子改変株と野生型細胞を融合させた細胞で中心子複製を起こす実験系を開発する。

クラミドモナス (核相は n) は接合細胞 ($2n$) を形成した後に暗所におくと接合胞子を形成して休眠状態へ移行する。しかし、接合細胞に光を当て続けると接合胞子にならずに増殖し、細胞分裂を経てほとんどの細胞は 1 倍体に戻り、一部が 2 倍体細胞となる。接合細胞では接合後何時間で中心子複製が起こるのかなどを詳しく検討し、1 回目の複製後に NFAp を単離する。接合細胞と未接合細胞は、接合前のそれぞれの細胞にパロモマイシンとハイグロマイシンの耐性遺伝子を導入し、二重選択培地を用いて選別する。NFAp は bld12 から単離したものと同様に処理し、母・娘中心子ペアの微小管数を計測する。クラミドモナスの接合では多くの細胞が一斉に同調して融合するため、中心子複製も同調して起こる可能性があり、この実験系が確立されれば、効率よく複製過程を観察できると期待される。

4. 研究成果

前述のとおり、我々のこれまでの研究により、中心子の微小管数が 9 本に決定されるには、CW に依存する機構とそれとは独立の別な機構が働いており、その第二の機構は Bld10p が担っていることがわかっていた。この研究の申請段階ではまだ公表されていなかったが、研究期間内に、Bld10p を短縮させると CW 不在下で中心子微小管の数が減少することを報告する論文が出版された (Noga, A. Horii, M., Goto, Y., Toyooka, K., Ishikawa, T., Hirono, M. "Bld10p/Cep135 determines the number of triplets in the centriole independently of the cartwheel" EMBO J. 2022 41(20):e104582. doi: 10.15252/embj.2020104582.)

クラミドモナスの母・娘中心子ペアの微小管数を計測する試みについては、当初は単離中心子の厚切り樹脂切片を電子線トモグラフィーで解析する計画であった。しかし、学部共通機器として導入予定であった日立ハイテク社 HT7800 の設置が 2024 年 3 月にずれ込んだため、研究期間内に試みることができなかった。これに代わる方法として、厚切り切片を集束イオンビーム (FIB) 加工して SEM 観察を繰り返し、得られた画像からトモグラフィーの作製も試みた (沖縄科学技術大学院大学、中澤友紀博士の協力による)。しかし、微小管の数が判別できる解像度は得られないことと、画像を取得するまでの時間と労力が多く必要であることから多数の中心子の微小管数を計測する方法には適していないことがわかった。

そこで、最近報告された膨張顕微鏡法 (ExM 法) による観察を試みた。この方法は、生体試料をポリアクリルアミドゲルに包埋すると同時にその構成タンパク質をゲルに化学架橋し、浸透圧によって 4 倍に膨張させた後に、間接蛍光抗体法で観察するというものである。これによって資料の大きさを 4 倍に拡大することができる。さらに最近では、ゲルへの

包埋・膨張操作を2回繰り返すU-ExM法が開発され、膨張率を8倍にまで拡大できることが報告されている。この方法を単離したクラミドモナス中心子に適用したところ、図3にあるとおり、通常では電子顕微鏡でのみ観察可能な個々の中心子微小管をはっきりと識別することができた。この方法を用いれば、当初計画したとおり、母・娘中心子の微小管数の相関を計測することができると期待される。

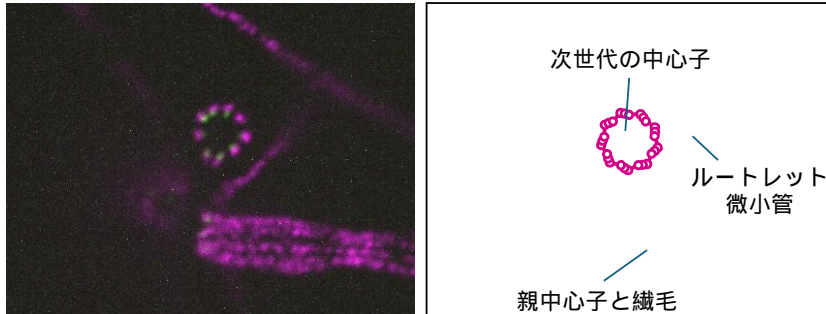


図3. 膨張顕微鏡法によるNFAPの像。マゼンタは微小管、緑が中心子構成タンパク質の1つ(Rtn1)。次世代の中心子では、これまでは電子顕微鏡でしか観察できなかった微小管1本ずつが明瞭に識別できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noga Akira, Horii Mao, Goto Yumi, Toyooka Kiminori, Ishikawa Takashi, Hirono Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Bld10p/Cep135 determines the number of triplets in the centriole independently of the cartwheel	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小池理知、植村朋広、若林憲一、豊岡博子、廣野雅文
2. 発表標題 Centrioleの普遍的9回対称性構造の構築に働くSAS-6の結合タンパク質の同定
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久保田 和音, 苗加 彰, 季 佳慧, 中澤 友紀, 豊岡 博子, 廣野 雅文
2. 発表標題 中心子微小管の数に異常をもつ新規クラミドモナス突然変異株の解析
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大野 真, 豊岡 博子, 廣野 雅文
2. 発表標題 緑藻ユードリナの精子束形成誘導の活性測定系の確立と活性因子精製の試み
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植村 朋広, 豊岡 博子, 廣野 雅文
2. 発表標題 中心子複製に必須なタンパク質STILのクラミドモナスホモログの同定
3. 学会等名 日本原生生物学会第 55 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野 真, 豊岡 博子, 廣野 雅文
2. 発表標題 多細胞緑藻ユードリナの精子束形成誘導活性のバイオアッセイ系の確立
3. 学会等名 日本原生生物学会第 55 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保田 和音, 苗加 彰, 季 佳慧, 中澤 友紀, 豊岡 博子, 廣野 雅文
2. 発表標題 中心子構造の9回対称性に異常をもつ新規クラミドモナス突然変異株の表現型
3. 学会等名 日本原生生物学会第 55 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池 理知, 廣野 雅文
2. 発表標題 中心子の9回対称性を規定するタンパク質SAS-6の結合因子の探索
3. 学会等名 日本原生生物学会第 55 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Noga, T. Ishikawa, M. Hirono
2. 発表標題 Bld10p determines the centriole structure independently of the cartwheel
3. 学会等名 19th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Ishikawa, A. Noga, M. Hirono
2. 発表標題 Outer and inner arm dynein arrangement at the proximal region of the axoneme revealed by cryo-ET with a phase plate
3. 学会等名 Dynein 2021 International Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Nakazawa, M. 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------