

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657046

研究課題名（和文） 繊毛・鞭毛の軸糸が持つ 9+2 構造の必然性

研究課題名（英文） Perturbation analysis of the 9+2 pattern of the ciliary/flagellar axoneme

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）：繊毛・鞭毛は 9+2 と呼ばれる普遍的パターンの軸糸構造を持つが、波動運動を発生させる上でこの形であることに合理的な理由を見つけることはできない。本研究は、クラミドモナス突然変異株 *bld12* を用いて繊毛・鞭毛の 9+2 構造を攪乱し、その構造と運動性を調べ、9+2 構造が種を超えて高く保存される理由を探ることを目指した。その結果、運動性の検討には至らなかったが、9+2 構造の構築と機能を理解する上で重要な内部構造間の相互作用に関する知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Almost all motile cilia and flagella have a characteristic structure called the “9+2”. However, it has not been rationally explained why the 9+2 pattern is necessary for the ciliary or flagellar motility. The aim of this study is to examine motilities of axonemes with variable numbers of the outer doublet microtubules produced by a *Chlamydomonas* mutant, *bld12*. We found several interesting features about interactions between projections in the axonemal structures. These findings are important to understand mechanisms of the assembly and function of the 9+2 structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：微細構造、微小管

1. 研究開始当初の背景

繊毛は真核生物に広く存在し、運動の発生、感覚の受容などに働く細胞器官である。近年、繊毛の形成や運動能の障害が多発性腎嚢胞症、水頭症などの疾病 (ciliopathy) の原因であることが明らかになり、生体における重要性が再認識されつつある。

繊毛の内部構造 (軸糸) は、9 本の周辺微小管を基本とする 9+2 または 9+0 と呼ばれる構造になっている。根元には 9 本の 3 連微小管からなる 9 回対称性構造の基部体があつて、周辺微小管形成の鋳型となっている。基部体・軸糸の基本パターンは種を超えて高く保

存されているが、9+2 構造がなぜこれほど厳密に保存されているのかは、繊毛・鞭毛の運動発生機構や、基部体の形成機構から考えても全く説明できない。

最近、我々は基部体の形成機構に異常を持つために周辺微小管の数が 8-11 本に揺らぐクラミドモナス突然変異株 (*bld12*) を単離することに成功した (Nakazawa et al., 2007)。この株の鞭毛は正常な軸糸が約 90% を占めるが、8 本 (以下、軸糸-8) または 10 本 (軸糸-10) のものがそれぞれ 5% ずつ、11 本 (軸糸-11) のものがわずかに含まれる (図 1)。この異常な構造の鞭毛を詳しく解析し、運動性発

現のどこに不都合が生じるかを調べれば、9+2 でなければならない理由の理解につながるはずである。しかし、*bld12* が形成する鞭毛は内部構造が正常なもの (9+2) と異常なもの (8+0, 10+2 など) が混在しているため、運動性を解析する際にこれらを区別できないという問題がある。

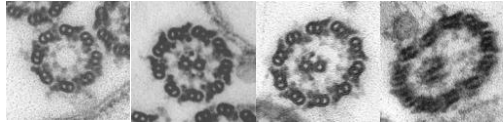


図 1. *bld12* 軸糸の横断面図。左から軸糸-8、軸糸-10、軸糸-11。

2. 研究の目的

本研究計画では、軸糸-8 または軸糸-10 の構造を詳細に検討し、周辺微小管の本数の異常が軸糸の突起構造などに及ぼす影響などを検討すること、さらに、軸糸-8 または軸糸-10 のみを形成する株を樹立してそれらの運動性を解析することを目的として開始した。

3. 研究の方法

軸糸-8、軸糸-10 では、周辺微小管の本数が変化しているために、内部構造に様々なひずみが生じているはずである。それを電子顕微鏡で詳細に観察する。また、クラミドモナスには軸糸内の特定の突起構造を欠失した突然変異株が多数単離されている。これらと *bld12* 変異株の多重変異株を作製して、その軸糸構造を電子顕微鏡で観察することにより、軸糸-8、軸糸-10 で生じた異常が、軸糸内の突起間相互作用に及ぼす影響を検討する。

軸糸-8 または軸糸-10 のみを形成する株については、遺伝子を改変した組換えクラミドモナス株を作製する。我々はこれまでの研究で、クラミドモナス変異株 *bld12* は、SAS-6 という蛋白質を欠失し、そのためにカートホイールという、中心子内腔に存在する 9 回対称性の構造を欠失することを明らかにした。さらに、英国 MRC のグループとの共同研究により SAS-6 の結晶構造を決定した (図 2)。これらの解析から、9 個の SAS-6 ダイマーが疎水性結合を介して回転対称に会合してカートホイールを形成し、カートホイールが中心子微小管形成の足場として機能することにより微小管の本数が 9 本に固定されることを明らかにした (図 2)。そこで、本研究では、SAS-6 ダイマーの会合面のアミノ酸配列を改変して、会合の回転対称性を変化させた SAS-6 遺伝子を *bld12* 変異株に導入して発現させ、軸糸-8 またはのみを形成する株の樹立を試みる。これらの株の軸糸構造を電子顕微鏡で詳細に観察し、さらにそれらの鞭毛の運動波形、打頻度、生じる推進力などを詳細に

検討する。

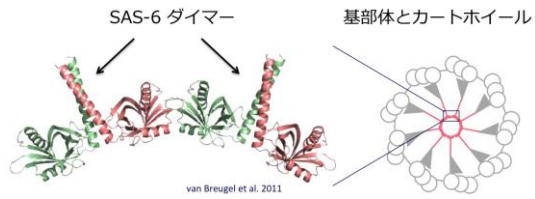


図 2. SAS-6 ダイマーとカートホイール。ここでは 2 つのダイマーを示している。右は基部体横断面の模式図。9 本のトリプレット微小管に囲まれた内腔にあるのがカートホイール。

4. 研究成果

軸糸-8 を観察したところ、ほとんどの場合、中心対が形成されないことが明らかになった。これは軸糸中央部分のスペースが中心子が形成されるには小さすぎるためではないかと考え、軸糸内部のスペースを大きくするため、ラジアルスポークを欠失する *pf14* 変異株との二重変異株 (*bld12pf14*) を作製してその軸糸を観察した。その結果、軸糸-8 または軸糸-7 でも中心対が形成されることがわかった (図 3)。従って、中心対の形成は、ラジアルスポークと周辺微小管によって規定される軸糸内部の空間の大きさに依存することが明らかになった。

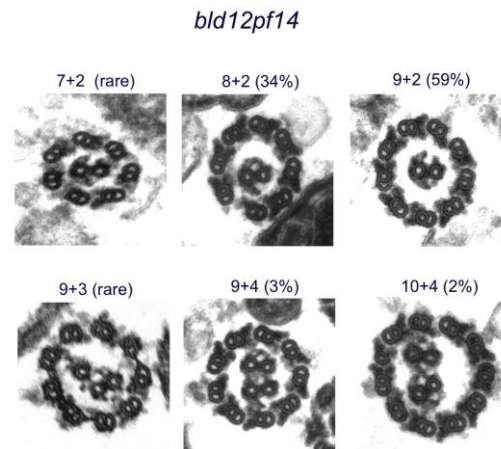


図 3. 二重変異株 *bld12pf14* の軸糸横断面を示す電子顕微鏡像。軸糸-7、軸糸-8 でも中心対が存在する。さらに、軸糸-9、軸糸-10 では 3 本または 4 本の中心微小管が存在する例が高頻度で観察された。

軸糸-10 では、軸糸の直径が大きくなるため、中心対と一部のラジアルスポークヘッドの間に隙間ができ、周辺微小管の環状配置がゆがむことを見いだした。このゆがみは、*bld12pf14* の軸糸-10 ではみられないことから、一部のラジアルスポークが中心対と結合することによって生じることが示された (図 4)。これまでの研究から、クラミドモナス

鞭毛の軸系では、中心対が鞭毛打1回につき1回転し、その回転の情報が周辺微小管上の内腕ダイニンに伝えられて、活性を調節すると考えられている。しかし、ラジアルスポークが周辺微小管を押しているのか、引っ張っているのかはこれまで全くわかっていなかった。今回の観察により初めて、ラジアルスポークは中心対に結合して、周辺微小管を引っ張っていることが示された。

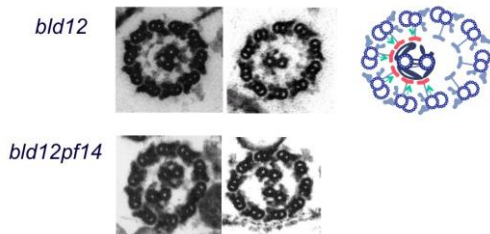


図4. 軸系-10における周辺微小管の環状配置の歪み。bld12 軸系ではラジアルスポークの一部が中心対から離れて、周辺微小管の配置が歪んでいる。この歪みはラジアルスポークを欠失する bld12pf14 変異株軸系ではみられない。右図は bld12 における軸系-10 の模式図。ラジアルスポークが中心対に結合して周辺微小管を中央方向に引っ張っていることを示す。

さらに、中心対とラジアルスポークヘッドの結合が、中心対表面の特定の場所で起こっているのかどうかを調べるため、中心対表面を12分割し、軸系-10においてどの分画がラジアルスポークと結合しているのかを検討した。その結果、中心対突起 C1a と C1b の近傍の2カ所がより結合しやすいことがわかった(図5)。しかし、この傾向は、各種の突起を欠失する変異株 pf6, cpc1, pf16 などとの多重変異株の軸系では大きく変化したことから、すべての分画がラジアルスポークと結合することができることもわかった(図5)。おそらく、中心対は回転しながら、異なる程度でラジアルスポークを引っ張っており、それによって異なる微小管上のダイニンの活性を制御していると考えられる。

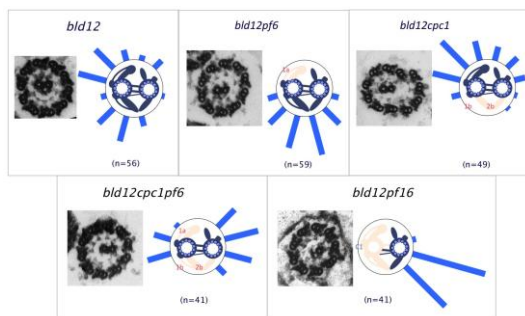


図5. 中心対微小管表面におけるラジアルスポーク相互作用領域と中心対突起の欠失の

影響。電子顕微鏡により軸系-10の横断面を多数観察し、ラジアルスポークと結合している領域をカウントした。各枠内の右が中心対上の結合領域の分布を示すヒストグラム、左が典型的な電子顕微鏡像。bld12 では左上、左下方向の2カ所により結合しやすい領域がある。bld12pf6、bld12cpc1 は中心対突起の C1a、C1b-C2b を欠失する。bld12pf6cpc1 はそれらの多重変異株で3つの突起を欠失する。pf16 は C1 微小管を欠失する。多重変異株や pf16 では bld12 ではほとんど結合がみられない領域に結合が検出された。

周辺微小管数が8本または10本のみの軸系を形成させるため、SAS-6の会合面にあるアミノ酸配列を改変し、これらを bld12 に発現させることを試みた。スイスのポールシェラー研究所のスタインメッツ博士との共同研究により、in vitro で30%が7回対称、40%が8回対称、30%が9回対称に会合する変異 SAS-6 (NN2、図6) を得て、それを bld12 に発現させたところ、鞭毛の形成率は大きくなったものの、微小管を8本、9本、または10本もつ軸系の分布は bld12 と変わらなかった。従って、SAS-6 分子の9+2構造確立への寄与は限定的であることが示された。これは当初の目的とは異なるが、9+2構造が進化的に保存されてきた理由の一端を説明する重要な発見である。

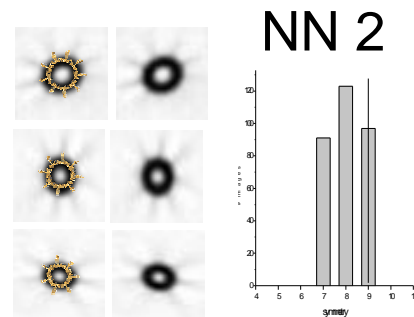


図6. 変異 SAS-6 (NN2) の in vitro assembly. 左は会合した SAS-6 ダイマーの原子力間顕微鏡像。上から9回、8回、7回対称性に会合したものを示す。右は会合した SAS-6 の対称性の分布を示すヒストグラム。もっとも多いのが8回対称の会合体。

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 procentreole 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) 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 and function" *J. Cell Biol.* 199, 151-167 (2012). 査読有

DOI: 10.1083/jcb.201206068

〔学会発表〕 (計 5 件)

(1) Fujita, A., Yanagisawa, H., Kamiya, R., and Hirono, M. "Afm1, a conserved component of the flagellar outer doublet microtubule, is required for generation of the proper asymmetrical waveforms" 第 63 回日本細胞生物学会、札幌 (2011 年 6 月)

(2) Kubo, T., Yanagisawa, H., Liu, Z., Hirono, M., and Kamiya, R. "A novel *Chlamydomonas* mutant, *tpg2*, reveals a conserved 177-kDa protein associated with TTLL9, an enzyme that catalyzes tubulin polyglutamylation in the axoneme" 第 63 回日本細胞生物学会、札幌 (2011 年 6 月)

(3) Hirono, M. "Mechanism for establishing the "nine-ness" of the centriole structure" Symposium "Biomimetics focused on the life style of Protista". 第 49 回日本生物物理学会年会、姫路 (2011 年 9 月)

(4) Hirono, M. "A self-organizing mechanism for assembly of the conserved 9-fold symmetrical structure of the centriole. Symposium "Challenges for innovation on the basis of protozoan principles". 第 84 回日本生化学会大会、京都 (2011 年 9 月)

(5) Noga, A., Yamaguchi, S., Kamiya, R., and Hirono, M. "Interaction between SAS-6 and Bld10p, 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 (2012 年 5 月)

〔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 (HIRNO MASAFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：10212177