

## 論文内容の要旨

論文題目      **Studies on the mechanism that produces 9-fold structural symmetry  
in the flagellar basal body and axoneme**

(鞭毛基部体と軸糸における 9 回対称構造構築機構の研究)

氏名            中澤 友紀

中心子(centriole)は動物や原生生物など多くの真核生物が持つオルガネラで、細胞にみられる微小管構造の形成と制御に中心的な役割を果たす。PCM という不定形構造とともに中心体を構成して微小管の重合中心となり、細胞内微小管の放射状の配置や、紡錘体構造の構築に働く。また、鞭毛・繊毛の形成基部となって軸糸微小管の鋳型となる機能もあわせ持つ(このときの中心子を鞭毛基部体(basal body)と呼ぶ)。中心子・基部体(以下、基部体)は9本のトリプレット微小管が円筒状に並んだ特徴的な構造を持つ。この9回対称構造は多様な生物に共通する普遍的なもので、10億年以上前に真核生物が鞭毛を獲得して以来変わらずに保存されてきたと考えられている。しかし基部体は200種類近くのタンパク質から構成される複雑なオルガネラであるために、構築機構の研究はほとんど進んでいない。一方、鞭毛・繊毛の軸糸は、周辺微小管と中心対微小管からなる9+2構造に、ダイニン、ラジアルスポークなどの突起が周期的に配置された緻密な構造である。この軸糸構造もやはり鞭毛・繊毛を持つほぼすべての真核生物に共通する普遍性の高いものである。周辺微小管が9回対称に配置するのは基部体の9回対称性に由来するものだが、軸糸構造内のどの部分がどのように9+2構造の構築に寄与しているか、軸糸内にどのような結合力が働いているか、などについてはこれまでほとんど知見がない。

これらの問題に対し、本研究ではクラミドモナスを用いた遺伝学的アプローチを試みた。2本の鞭毛を持つ単細胞生物クラミドモナスは遺伝学的解析が容易なモデル生物で、以前から鞭毛の形成や運動などの研究に用いられてきた。これに加えて松浦らは、基部体を完全

に欠失したクラミドモナス突然変異株 *bld10* を単離することに成功し、クラミドモナスは基部体構築機構の研究にもきわめて有用な生物であることを示した。そこで本研究では、基部体構築の分子機構の解明に向けて、まず基部体に異常を持つ新たなクラミドモナス突然変異株の単離を試みた。鞭毛欠失、分裂異常という *bld10* 変異株と共通する2つの表現型を指標としてスクリーニングを行った結果、基部体と軸糸の9回対称性がゆらぐという、すべての生物を通して初めての表現型を示す変異株 *bld12* の単離に成功した。*bld12* の解析によって基部体の9回対称性構造の構築には、cartwheel という放射状構造が重要な役割を果たしていることが初めて明らかになった。さらに、*bld12* が形成する、周辺微小管数がゆらいだ軸糸構造を解析することにより、9+2 構造の成り立ちについていくつかの重要な知見が得られた。

本論文は2部から構成され、第1部では基部体の9回対称性構造の構築機構について、第2部では9+2 構造パターンが乱れた *bld12* 軸糸の解析結果について述べる。

## 第1部

*bld12* は、*bld10* とは異なって、細胞壁の除去処理をすると約10%の細胞が鞭毛を形成するものの、核数の異常や基部体に付随する細胞骨格の異常など、基部体の異常を示唆する表現型を示す。そこで電子顕微鏡によって細胞を観察した結果、約80%の基部体ではトリプレット微小管が1個から5個の連なりに分離しており、トリプレットが環状に並んで筒状の基部体構造を形成していたのは約20%程度であった。しかもその微小管の本数は、驚いたことに7本から11本までゆらいでいた。さらに詳しく調べたところ、観察した全ての基部体が cartwheel と呼ばれる構造に異常を持っていた。Cartwheel はハブと放射状に並ぶ9本のスポークから構成され、基部体内腔の proximal 端に位置する構造である。*bld12* では、スポークの先端部分は微小管に付着して残っているものの、ハブを含めた中央部分が欠損しているために cartwheel の放射状構造が失われていた。cartwheel は基部体形成過程のごく初期に現れる構造であることから、*bld12* に見られる基部体異常の原因は cartwheel の形成異常によるものと結論した。

*bld12* の変異遺伝子について、ポジショナルクローニング法による同定を試みた。配列多型を持つ S1D2 株と *bld12* を交配して得られた約500組の四分子に対し、いくつかのPCR多型マーカーを用いて変異をマッピングした。これによって限定されたゲノム領域に、線虫で同定された中心子タンパク質、SAS-6 のホモログ (CrSAS-6) をコードする遺伝子があることがわかった。この遺伝子を導入すると *bld12* の表現型はほぼ完全に野生型に戻ることから、*bld12* は CrSAS-6 の全欠失変異株であることがわかった。基部体における CrSAS-6 の詳細な局在を免疫電子顕微鏡法によって検討した結果、cartwheel 中央のハブの周辺に存在することが明らかとなった。この局在は、*bld12* の cartwheel で欠失している部分とよく一致することから、CrSAS-6 はおそらく cartwheel 中央部分の構成成分としてスポークの放射

状配置に働くと考えられる。Cartwheel にはもう 1 つの構成タンパク質として Bld10p が知られている。このタンパク質はスポーク先端部を構成し、微小管の形成に関与する。そこで CrSAS-6 と Bld10p の関係を調べるため、*bld12* 株における Bld10p の局在を間接蛍光抗体法で調べたところ、野生型と比べて蛍光は弱いものの、基部体への局在が観察された。このことは Bld10p が CrSAS-6 とは独立に基部体に局在することを示している。

以上の結果から、クラミドモナス基部体の構築における CrSAS-6 の役割は以下のように考えられる。まず、形成過程の初期に amorphous disk とよばれる構造が現れ、そこに cartwheel が形成されて微小管形成の足場として働く。CrSAS-6 存在下では、cartwheel の放射状構造が正しく形成され、各スポークの先端で Bld10p が機能することで 9 本の微小管が形成される。しかし CrSAS-6 を欠失すると cartwheel の放射状構造が失われるが、それでも Bld10p は独立にそこに局在して微小管を形成する。しかしその場合、微小管形成の場数が 9 に固定されずにゆらいでしまうため、基部体の 9 回対称性もゆらぐのだと考えられる。

以上のように、本研究は SAS-6 が cartwheel の形成を通して、基部体の 9 回対称性構造を安定化することを初めて示した。Cartwheel は哺乳類、ゾウリムシ、クラミドモナスなどの多くの生物の基部体（中心子）において観察される構造なので、本研究で提唱した基部体構築モデルは、多くの生物に共通すると考えられる。しかし、一方で cartwheel を欠く *bld12* においても、筒状構造を維持する基部体の約 70% が 9 本の微小管から構成されていた。従って、基部体の 9 回対称性は複数の要因によって確立されると考えられる。このことは基部体の 9 回対称性が進化の過程で保存されてきたことと関係するのかもしれない。

## 第 2 部

*bld12* が形成する鞭毛は、周辺微小管の本数が 8 本から 11 本までゆらいでいる。軸糸の 9+2 構造はほとんど例外がないほど高く保存されており、その構造が乱れたこのような軸糸が得られたのは初めてである。そこでこの軸糸を利用して、周辺微小管数の異常が軸糸構造にどのような影響を及ぼすかを調べ、軸糸構造の成立に関する知見が得られると考え、解析を行った。

まず、*bld12* 軸糸のうち 8 本の周辺微小管からなる軸糸を電子顕微鏡で観察すると、そのほとんどが中心微小管を失っていた。これは周辺微小管とラジアルスポークが囲む軸糸中央部のスペースが、中心微小管の形成に不十分である可能性が考えられた。そこでラジアルスポークを欠損した変異株 *pf14* との二重変異株を作製して調べたところ、周辺微小管が 8 本であっても、ほとんどが中心微小管を含んでいた。そのうえ、9 本以上の周辺微小管からなる軸糸では 3 本以上の中心微小管を含んでいるものも観察された。この結果から、中心微小管の形成は軸糸中央部のスペースの広さに依存すると結論された。

10本以上の微小管からなる軸糸の横断面では、ラジアルスポークの一部が中心微小管から離れて環状構造が歪んでいた。しかもその解離はC1とC2の2本ある中心微小管のうちのC2側で頻繁に起っていた。この観察像は、中心微小管とスポーク頭部はC1側でより強く結合し、周辺微小管を中央方向へ引っ張っていることを示している。これまでも中心対とスポーク頭部が相互作用することは示唆されていたが、このような結合力が働いているのを視覚的に示したのはこれが初めてである。

2本の中心微小管の表面は大小あわせて7個の突起があつて、これらを欠失する突然変異株が3株単離されている。今後はこれらの変異株と *bld12* の二重変異株において、ラジアルスポークと中心微小管の結合がどうなるかを調べることによって、これら2つの軸糸構造の間の結合についてより詳細な知見が得られると期待できる。