

論文内容の要旨

論文題目

Studies on the function of Bld10p in centriole assembly

(中心子構築における Bld10 蛋白質の機能)

氏名 平木まどか

中心子は 9 本の 3 連微小管が回転対称に並んだ円筒形のオルガネラで、原生生物から哺乳類まで多くの生物に広く存在する。新しい中心子が細胞分裂に先立って形成される際には、既存の中心子の側面に直交する形で形成され、しかもこの「複製」は細胞周期に 1 度だけ起こるように調節されている。この不思議な性質から、中心子は古くから多くの研究者の注目を集めてきた。中心子は微小管重合活性をもつマトリックスとともに中心体を構成し、紡錘体の形成など働く。また、細胞膜直下に移動して鞭毛・繊毛の形成基部としても機能する。このとき、軸糸の 2 連微小管は中心子の 3 連微小管を鋳型として形成される。従って、真核生物の軸糸に普遍的な、9+2 または 9+0 とよばれる構造は、中心子によって規定されている。中心子の 9 回対称性は繊毛・鞭毛をもつ真核生物のほとんどすべてに厳密に保存されているが、この特徴的な構造がどのようにして構築されるかについてはほとんど何もわかっていない。

クラミドモナスは 2 本の鞭毛をもつ単細胞緑藻で、遺伝学的解析に適したモデル生物である。その中心子は、間期には鞭毛の基部に存在するが、分裂期には紡錘体の極として機能するなど、動物細胞の中心子と相同な機能を持つ。また中心子の構造も哺乳動物など、一般的なものとほぼ同一である。そこで我々の研究室の松浦らは、中心子構築の分子メカ

ニズムを遺伝学的に解明することを目指し、中心子に異常を持つクラミドモナス突然変異株の単離を試みた。その結果、鞭毛を欠失した突然変異株のなから、中心子を完全に欠失した変異株 *bld10* を単離することに成功した。この変異株は中心子の欠失により分裂に異常を示すが、致死ではない。遺伝子解析の結果、*bld10* はほぼ全長にわたってコイルド・コイル構造をとると予想される、分子量 170 kDa の蛋白質 Bld10p の null 変異株であることがわかった。また、この蛋白質は哺乳類で同定された機能未知の中心体蛋白質、Cep135 に相同なものであった。興味深いことに、Bld10p は中心子の内腔にある cartwheel とよばれる放射状構造に局在する。Cartwheel は、中央の hub と放射状に並ぶ 9 本の spoke からなる構造で、中心子構築過程で最初に現れる 9 回対称性構造であることから、中心子微小管の形成の足場として働くのではないかと想像されている。しかしこれを否定する説もあって、実際の機能はわかっていない。

bld10 変異株は中心子を完全に欠失するため、Bld10p は中心子形成に必須な蛋白質である。しかし中心子形成過程で、cartwheel においてどのように機能するかはわかっていない。そこで、本研究では、Bld10p の中心子構築における機能を解明するため、Bld10p の生化学的な性状と Bld10p 配列の部分的な欠失が中心子形成に及ぼす影響を検討した。それぞれの検討結果を第一部と第二部で述べる。

第一部

Bld10p のアミノ酸配列を PairCoil というプログラムで解析すると、全長にわたってコイルド・コイルを形成する可能性が高いと予測される。また、MultiCoil という別のプログラムを用いると、コイルド・コイルを介して二量体を形成する可能性が高いことがわかる。しかし、Bld10p が実際に二量体を形成するかどうか、また、形成するとすれば分子の向きはどのようになっているか、さらに、二量体が重合してより大きな複合体を形成するかどうかはわからない。そこで組み換え Bld10p を用いた架橋実験と、中心子の架橋実験を行った。まず、解析に十分な量の Bld10p を得るために、*BLD10* の全長 cDNA をクローニングし、組換え蛋白質を大腸菌で発現させ、精製した。化学架橋剤 BMH で組換え Bld10p を処理したところ、見かけの分子量が二量体に相当する架橋産物が得られた。一方、細胞から単離した鞭毛・中心子の複合体 (Nucleoflagellar apparatus, NFAP) に対しても BMH で処理し、抗 Bld10p 抗体を用いたイムノブロットで架橋産物を検出した結果、二量体に相当する架橋産物が得られた。これを質量分析で解析したところ、Bld10p だけが検出されたことから、

Bld10p は中心子内でも二量体を形成すると考えられる。

次に、二量体において、ペプチド鎖が N 末端と C 末端がそろった **parallel** な対合をするのか、そろわない **anti-parallel** な対合をするのかを検討した。Bld10p の N 末端または C 末端を欠失したものを発現した株から NFAP を単離して架橋剤で処理した結果から、Bld10p の二量体は両端をそろえた **parallel** な構造をとっていることが示唆された。

最後に、二量体を形成した Bld10p がさらに重合して多量体を形成する可能性を検討するため、組み換え Bld10p をゲルろ過クロマトグラフィーで分析したところ、分子量およそ 2,300 kDa (14 量体) に相当する位置に溶出された。また、Blue native polyacrylamide electrophoresis (BN-PAGE) で非変性状態での分子量を検討した結果、四量体から六量体に相当する 1 本のバンドが検出された。以上の結果から、Bld10p は **parallel** な二量体を形成した後、多量体へと重合する可能性が示唆された。

中心子には多くのコイルド・コイル蛋白質が含まれるが、それらがどのように集合して中心子構造を構築するかは不明である。本研究は、Bld10p がどのように **cartwheel** を構成し、機能するかを知る上で興味深い知見となった。

第二部

松浦らが単離した *bld10* 変異株は、**null allele** で、中心子を完全に欠失する。中心子形成における Bld10p の機能を探るには、異常を持った中心子が形成されるような新しい **allele** を得る必要がある。そこで、Bld10p の配列をさまざまに欠失させた 10 種類の配列を *bld10* (*BLD10* の **null** 変異株) に発現させた。全長 cDNA を発現させると鞭毛形成能はほぼ野生型と同程度に回復するが、部分配列を発現させた場合は、様々な程度の回復を示す。意外なことに、N 末 44% または C 末 23% を欠失させても、高率で鞭毛が形成され、電子顕微鏡で観察した中心子構造も正常であった。このことから、Bld10p のこれらの部分はその機能にとって必要ではないことが明らかになった。ところが、それらより少しだけ欠失範囲を拡大して、N 末 54% または C 末 35% を欠失させると、ごく一部の細胞しか鞭毛を形成できなくなった。そこでこれらの株の中心子を電子顕微鏡で詳細に観察した結果、主に以下の 4 つの異常が観察された。1) 中心子微小管が本来の位置からずれて存在するか、一部の微小管が消失する 2) 中心子のトリプレット微小管と **cartwheel spoke** の先端の結合が離れやすくなる 3) **Cartwheel spoke** 長が野生型にくらべて短くなる 4) **Cartwheel spoke** 先端部が野生型に比べて細くなる。特に注目すべき点は、C 末を 35% 欠失した細胞では、8 本の

3 連微小管が環状に配置した、直径の小さな異常な中心子がしばしば観察されることであるが、この細胞の **cartwheel spoke** の長さは、野生型の約 76%にまで短くなっていた。従って、この株で 8 回対称性の中心子が多く形成されるのは、**cartwheel** の円周が小さくなったため、そこに 3 連微小管が 9 本配置することができないためであると推察される。また、**cartwheel spoke** 先端部の形態異常から、**Bld10p** が **spoke** 先端部のふくらみ (**pinhead**) を構成する蛋白質ではないかと考え、**Bld10p** 配列の異なる部分を認識する 2 種類の抗体を用いた免疫電子顕微鏡法を行ったところ、いずれの抗体を用いても **spoke** の先端側に偏って局在するという結果が得られた。以上の結果から、**Bld10p** は **cartwheel spoke** の先端を構成し、**cartwheel** の直径を適正に維持するとともに、3 連微小管を **cartwheel** に結合させる働きがある結論される。また、**cartwheel spoke** が短くなると 8 回対称性の中心子が形成されるのは、**cartwheel** が中心子微小管の配列のための足場となっているためだと考えられる。本研究は、中心子の 9 回対称性構築に **cartwheel** が重要な働きをしていることをはじめて実験的に示したものである。

以上の結果から、**Bld10p** はそれ自身で複合体を形成して **cartwheel spoke** の先端を構成し、**cartwheel** と 3 連微小管の結合に関与することが明らかになった。これまでも線虫などで、中心子の構築に関与する蛋白質はいくつか同定されている。しかし、それらの研究はいずれも蛋白質の発現を抑制すると中心子が形成されなくなる、というだけで、どのように機能するかについては明らかにしていない。本研究は、**Bld10p** の中心子形成における機能を解明し、中心子の 9 回対称性構造構築のメカニズムの一端を初めて明らかにしたと言える。