

## 論文内容の要旨

論文題目

**Studies on a novel *Chlamydomonas* protein  
that serves as a scaffold for centriole assembly**  
(中心子構築の足場として働く新規クラミドモナス蛋白質の研究)

氏名 白土 玄

中心子 (centriole) は、細胞内微小管構造の形成に司令塔のような役割を果たす細胞小器官である。中心体 (centrosome) の中核構造として細胞質微小管の重合と配向を調節し、鞭毛基部体 (basal body) として軸系周辺微小管の鋳型となる。3 連微小管が 9 回対称に配置した特徴的な構造をもつが、この構造パターンは原生生物から哺乳動物まで高く保存されている。また、新しい中心子は既存の中心子の側面から出芽するように形成され、しかもそれが細胞周期に 1 度だけ起こるように調節を受けている。これらのめざましい機能、特徴的な構造、自己複製という奇妙な形成様式によって、中心子は古くから細胞生物学者の注目を集めていたが、その形成機構はほとんど解明されていない。

ゾウリムシやクラミドモナスなどを用いた微細形態学的な研究により、中心子の構築過程では、まず不定形の generative disk または amorphous ring が現れ、次いでそこに近接して、9 本の繊維 (スポーク) が中央の円筒 (ハブ) から放射状に伸びる cartwheel が形成され、そして、各スポークの先端に中心子微小管が形成されることがわかっている。中澤ら (2007) は cartwheel の中央部分を欠失するクラミドモナス突然変異株 *bid12* では、中心子微小管の本数が 9 本に固定されず、7 ~ 11 本まで揺らぐことを見いだした。つまり、

cartwheel は微小管形成の足場として働き、中心子の 9 回対称性構造の確立に重要な役割を担う構造であることが明らかとなった。しかし、cartwheel をほとんど欠失していても *bld12* 中心子の多くは 9 本の微小管をもつことから、9 回対称性構造の確立には cartwheel 以外の因子も必要だと推定される。Cartwheel よりも早く出現する amorphous ring はその有力な候補だと考えられるが、中心子形成の場に cartwheel よりも先に局在する蛋白質はこれまで 1 つも同定されていない。

本研究では、クラミドモナスの未熟中心子に特異的に局在する新規蛋白質を同定し、その機能解析を行った。この蛋白質は中心子成熟に異常をもつ *uni1* 突然変異株の解析過程で着目したもののだが、*uni1* におけるこの蛋白質遺伝子のコード領域に変異は存在しない。従ってこの蛋白質と *uni1* 変異との関係は不明だが、後述するように中心子蛋白質であることが判明したため、詳細な機能解析を行った。第 I 部ではクラミドモナスを用いた解析、第 II 部ではマウス培養細胞を用いた解析の結果について述べる。

## 第 I 部

着目した蛋白質は、分子量約 200 kDa で全長の約 70% がコイルドコイルを形成すると予測された。詳細な相同性検索の結果、C 末端付近の非コイルドコイル領域にヒト中心体蛋白質 Cep70 と高い相同性を示す約 50 残基のアミノ酸配列をもつことが判明した。そこで私はこの蛋白質を CRC70 (*Chlamydomonas protein Related to Cep70*)、保存配列を Cep70 モチーフと名付けた。Cep70 は中心体のプロテオーム解析によって同定された蛋白質で、ゼブラフィッシュ胚で発現を抑制すると繊毛形成が異常になることが報告されているが、中心体における機能や詳細な局在などはわかっていない。

Cep70 モチーフを含む蛋白質は、無脊椎動物や藻類などの中心子を持つ多くの生物に保存されており、モチーフ以外の配列にも弱い相同性が見られる。これまで Cep70 のホモログは脊椎動物にしか同定されていなかったが、Cep70 モチーフを見いだしたことにより Cep70 ファミリーと呼ぶべき新たな蛋白質ファミリーが存在することが明らかになった。これらの蛋白質のアミノ酸配列の比較から、CRC70 の C 末端側約半分は多くの Cep70 ファミリー蛋白質に相同性があり、N 末端側の約半分は藻類のファミリー蛋白質に特異的であることがわかった。

CRC70 に対する抗体を調製し、間接蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法によって細胞内

の局在を検討した。G1期のクラミドモナス細胞は、成熟した中心子と未熟な中心子を2つずつもつが、CRC70は未熟中心子に特異的に局在した。さらに、cartwheel形成の段階で中心子構築が停止する *bld10* 変異株の解析から、CRC70はcartwheel形成よりも早い時期に中心子形成サイトに局在することが明らかになった。未熟中心子に特異的に局在することは、成熟とともに中心子から消失しなければならない。この時期を探るため、細胞周期の様々な時期にある細胞のCRC70局在を観察したところ、新しい中心子が形成されるのと同じ時期に、それまで局在していた中心子から消失することが示唆された。また、CRC70の転写産物はG1期にはほとんど検出されないのに対し、中心子が複製されるM期が近づくと一過的に上昇することも判明した。これらの結果から、CRC70は中心子形成の初期に特異的に発現して機能する蛋白質であると結論された。

中心子の形成初期においてCRC70が担っている機能を探るために、RNA干渉法による発現抑制実験を試みた。amiRNA (artificial micro RNA)法を用い、CRC70の発現量が野生型の7%程度に低下した株を樹立してその表現型を検討したところ、10%の細胞しか鞭毛を形成せず、さらに細胞の増殖速度が中心子を欠失している *bld10* 変異株と同程度にまで低下していた。興味深いことに、cartwheel構成蛋白質であるSAS-6とBld10pの中心子形成サイトにおける局在量を、間接蛍光抗体法と細胞骨格分画のウェスタンブロットによって検討したところ、それぞれ15%と7%に減少していた。これらの結果はCRC70が中心子構成蛋白質を集積させる働きを持つことを示唆する。そこで、この可能性をさらに検討するために、CRC70を過剰発現する株を樹立してその細胞内局在を観察した。発現したCRC70は内在性CRC70と同様に未熟中心子に局在したが、それに加えて細胞質に凝集塊として局在する例も多く観察された。この凝集塊にはSAS-6、Bld10pが共局在し、一部からは微小管が放射状に伸長していた。これらの結果から、CRC70は中心子形成過程の初期に、他の中心子蛋白質を集積させる足場としての機能を持つ蛋白質だと考えられる。

## 第II部

第I部で、CRC70を過剰発現させると、中心子蛋白質を含む凝集塊が形成されることを示したが、そこで実際に中心子が形成されているかどうかを電子顕微鏡で確認することはできなかった。これは、導入した遺伝子を多くの細胞に安定して過剰に発現させる技術がクラミドモナスでは開発されていないため、樹立した細胞株における凝集塊の存在頻度が

低いためである。そこで、第Ⅱ部では CRC70 の中心子形成における足場としての機能を、哺乳類細胞を用いて検討した。

マウス NIH3T3 細胞に、EGFP と CRC70 の融合蛋白質を発現させたところ、CRC70 はクラミドモナスの場合と同様に未熟中心子に特異的に局在することがわかった。CRC70 のアミノ酸配列を 6 分割した各断片を EGFP 標識して発現させることにより、この局在には藻類特異的な N 末端側領域の一部、または Cep70 に相同な C 末端側領域の一部が必要であることがわかった。C 末側領域は、ゼブラフィッシュを用いて明らかになった Cep70 の中心体局在シグナル領域に対応する。従って、CRC70 は 2 重の中心子局在化機構をもち、そのうちの 1 つは Cep70 と共通することが明らかになった。

EGFP-CRC70 を過剰発現している NIH3T3 細胞では、クラミドモナスの場合と同様に、細胞質に融合蛋白質の凝集塊が観察され、そこに SAS-6、 $\gamma$ -tubulin などの中心体蛋白質が集積していた。このような細胞を電子顕微鏡によって観察したところ、中心子様構造が細胞質に異所的に多数形成されていることが判明した。この結果は、明らかに、CRC70 が中心子形成の足場として機能することを示している。

第Ⅰ部、第Ⅱ部で得られた結果を総合すると、中心体蛋白質 Cep70 と相同なクラミドモナス蛋白質 CRC70 は、中心子構築の極めて早い時期から構築の場に局在し、他の中心子蛋白質を集積させる足場としての機能を持つと考えられる。マウス細胞においても異所的な中心子形成を誘導できることから、中心子形成に関わる普遍的な蛋白質であると考えられる。CRC70 の同定によって、これまでまったく不明であった cartwheel 形成以前に働く蛋白質が初めて明らかになった。この蛋白質と相互作用する蛋白質の探索や、さらなる機能の解析などを行うことにより、中心子形成初期過程の分子機構に関する新たな知見が得られると期待される。