解説

中心子のマジックナンバー「9」の決定機構

廣野雅文 東京大学大学院理学系研究科

Centrioles are cell organelles consisting of nine triplet microtubules arranged in rotational symmetry. This structure is highly conserved among various eukaryotic organisms and serves as the template for the “9 + 2” or “9 + 0” structures of ciliary axonemes. How this nine-fold symmetrical structure forms is a long-standing question. Recently, genetic approaches using *Chlamydomonas* revealed that the cartwheel, a sub-centriolar structure with a hub and nine spokes, plays a pivotal role in the establishment of nine-fold symmetry, and that a protein called SAS-6 is a key component of the cartwheel assembly. This review summarizes the *Chlamydomonas* studies and recent advances in the understanding of the SAS-6 function.

Centriole / basal body / ciliary axoneme / *Chlamydomonas* / SAS-6 / Bld10p

1.

はじめに

中心子 (centriole) は、真核細胞の微小管構造の形成に、まさに中心的な役割を担う細胞小器官である。微小管重合活性をもつマトリックスとともに**中心体**を構成して、紡錘体をはじめとする細胞内微小管細胞骨格の形成に機能する。また、細胞が繊毛・鞭毛を形成する場合には、細胞膜直下に移動してその形成基部としても機能する。このとき中心子は基部体または基底小体 (basal body) とよばれる。

典型的な中心子は、回転対称に配置した9本のトリプレット微小管を基本骨格とする、直径約 250 nm、長さ約 400 nm の円筒状の構造である (図 1a)。基部体として機能する際は、この9回対称の形が鋳型となって、繊毛・鞭毛の内部構造 (軸糸) の構造を規定している。多くの軸糸は2本の微小管を9本の微小管が取り囲んだ「9+2」とよばれる構造パターンをもつ。また、繊毛・鞭毛には、運動性は示さずにセンサーとして働くものもあって、それらの軸糸は中心の微小管がない「9+0」構造になっている。いずれの場合も、外周にある微小管 (周辺微小管) は9本だが、これは中心子のトリプレット微小管から伸長しているためである (図 1b)。

「9」を基本とする中心子と軸糸のこの特徴的な構造パターンは、クラミドモナスからヒトまで、ほとんどの真核生物に保存されている。なぜ「9」で、それが

進化の過程でなぜ厳密に保存されてきたのかは、まったくわかっていない。軸糸の運動能と関係があるという考えもあるが、軸糸が波動運動をする上で周辺微小管が9本でなければならない合理的な理由は見つっていない。

また、「9」に決まる機構、つまり中心子の9回対称

図 1

中心子と繊毛軸糸の構造。(a) 中心子の微小管骨格。トリプレット微小管が9回の回転対称に配置している。新しい中心子は既存の中心子の側面に形成される。(b) 中心子と軸糸の縦断面 (左) と横断面 (右)。中心子の移行帯近傍には、移行繊維がトリプレットの外側に放射状に配置する (3)。中心子底部の内腔にはカートホイールがある (5)。

Mechanism for the Establishment of Nine-ness, the Magic Number of Centrioles

Masafumi HIRONO

Graduate School of Science, University of Tokyo

※図 6 は、電子ジャーナル (<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

性構造が構築される機構も大きな謎である。ゾウリムシや気管上皮などの電子顕微鏡像を見ると、多数の中心子が、ほとんど狂いなく 9 本の微小管をもっていることがわかる。複数の微小管からなる複雑な細胞構造の形が、これほど厳密に規定される機構とはどのようなものなのか、最近までまったく手がかりがなかった。

われわれは中心子の構築機構に迫るため、数年前から、クラミドモナスの突然変異株を用いた研究を進めてきた。クラミドモナスは 2 本の鞭毛をもつ単細胞生物で、典型的な構造の中心子をもつ。遺伝学的な手法が適用できるすぐれたモデル生物であり、以前から、軸糸構造の構築や運動の機構の研究に大きく貢献してきた。われわれが新たに単離した中心子異常突然変異体の解析と、その変異株が欠失しているタンパク質の X 線結晶構造の解明により、中心子 9 回対称性構造の構築機構について、その一端がはじめて明らかになった。本稿ではこの機構に関する最近の知見を紹介したい。

2.

中心子の構築過程

まず、中心子の構築過程についての形態学的な知見を概説する。この点については、いくつかの生物材料を用いて詳細な研究が行われてきた。

繊毛上皮細胞の分化過程などの特殊な場合を除き、新しい中心子が形成される場所は、既存の中心子の側面に限定されている（図 1a）。そして、その形成が細胞周期ごとに 1 度だけ起こるように制御されることにより、細胞内の中心子の数が一定に保たれている。この形成様式は鋳型依存的な自己複製とよばれることもあるが、DNA の複製過程のように既存の構造から構造的な情報が伝達されるわけではない。

最初に中心子側面に現れるのは、アモルファス環（amorphous ring）または generative disc とよばれる不定形構造で、そこにカートホイールという 9 回対称性の構造が出現する¹⁾（図 2）。カートホイールは、中央のリングから 9 本の繊維が放射状に配置した構造が重層した構造で、リングと繊維はそれぞれハブとスポークとよばれる。中心子微小管は、まず単一の管状微小管（シングレット微小管）として各スポークの先端付近に出現し、それがダブルット、トリプレットへと成長すると同時に長軸方向にも伸長して円筒構造が完成する（図 2）。

この過程を見てわかることは、中心子構造の 9 回対称性は、形成の初期過程ですでに確立されていることである。また、中心子形成過程で最初に現れる 9 回対称性構造はカートホイールであることから、これが中心子微小管形成の足場として働くのではないかと推察

図 2

中心子の構築過程。上段が縦断面、下段が横断面を示す。初期にアモルファス環、カートホイールが出現し、中心子微小管はカートホイールのスポークの先端に形成される。その後、微小管が成長して円筒状構造が完成する。

される。しかし、ゾウリムシの中心子形成過程では、カートホイールよりも微小管の方が早く出現するという観察結果をもとに、この可能性を否定する報告もある²⁾。いずれにしても、これらの形態学的な知見をもとにした議論には限界があり、カートホイールが中心子構築に寄与しているのかどうかは不明であった。

ちなみに、中心子形成の研究によく用いられる線虫では、カートホイールは観察されず、代わりにセントラルチューブという構造が中心子形成の前駆体として機能する。線虫の中心子は、成熟後でもシングレット微小管から構成されること、直径がクラミドモナスやヒトの中心子の半分程度しかないことなど、典型的な中心子とは異なる点がいくつかある。しかし、微小管の本数は 9 本であり、おそらくその構築機構は他の生物の場合と共通する点が多いと推定される。

3.

中心子構築に働く分子

このように、形態学的には古くから多くの知見が積み重ねられてきたが、中心子形成にかかわる分子が同定され始めたのは最近のことである。最初にこの同定に成功したのは、線虫を用いた研究である³⁾。網羅的な遺伝子機能阻害実験と突然変異体スクリーニングによって、SPD-2, ZYG-1, SAS-4, SAS-5, SAS-6 という 5 つのタンパク質が中心子形成の初期過程に必要であることが明らかにされた。これらのうち ZYG-1 は、線虫以外の生物にホモログが見つからないが、ヒトの Plk4、ショウジョウバエの SAK と機能的に相同なタンパク質キナーゼだと考えられている。Plk4 と SAK は過剰に発現させると中心子が過剰に形成されることから、構築機構の上流で働いて全過程を支配する機能をもつと考えられている。また、SAS-4 と SAS-6

は他の生物にも広く保存されており、ヒト細胞を用いた実験により重要性が確認されていた。しかし、これらのタンパク質の中心子構築における具体的な機能は不明であった。

4.

カートホイールの足場機能

中心子構築の機構に迫るため、われわれは中心子構築に異常をもつクラミドモナス突然変異株を用いた解析を行ってきた。クラミドモナスでは鞭毛の構造や運動性などに異常のあるさまざまな突然変異株が多数得られている。われわれは、鞭毛の形成に異常をもつ変異株の中には、中心子に異常をもつものが含まれると考え、鞭毛の欠失により遊泳能を示さなくなった変異株を多数単離して解析した。その結果、予想通りに、中心子に異常をもつ変異株を複数単離することに成功した。

4.1 *bld10* の解析

そのうちの1つ *bld10* は、中心子を完全に欠失する変異株である⁴⁾。中心体の機能から予想されるとおり、紡錘体形成にも異常があって増殖速度も低下しているが、なんとか細胞株として維持することができる。この変異株が単離されたことによって、クラミドモナスでは中心子は生存に必須ではないことが明らかになった。細胞分裂の異常が発生途中の致死につながる多細胞生物に対して、クラミドモナスのこの性質は中心子構築を遺伝学的に研究する上で大きな利点である。

bld10 変異株は、アミノ酸配列の大部分がコイルドコイルを形成すると予測される分子量 175 k のタンパク質を欠失していた。このタンパク質 (Bld10p) は哺乳動物の中心体タンパク質として同定されていた Cep135 のホモログで、他の多くの真核生物にも保存されている。Bld10p は、中心子構築に必須であることに加え、カートホイールに局在するという点で、たいへん興味深いタンパク質である。

われわれはその機能を探るため、構造の一部を削ったさまざまな Bld10p を *bld10* 変異株に発現させ、それらの表現型を検討した⁵⁾ (図 3a)。意外なことに、N 末端側の 44%、または C 末端側の 23% を欠失した Bld10p でも、*bld10* 変異株の鞭毛形成能の回復と正常な中心子の形成に十分機能できることがわかった。欠失させたこれらの部分は Bld10p の機能にとって必要ではないらしい。ところが、少し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。これらの株の中心子では、カートホイールスポークの先端部の

図 3

Bld10p 断片の発現実験。(a) *bld10* に発現させた Bld10p の全長 (Full) と各種の断片 (ΔN2, ΔN3, ΔC2)。 *bld10* の鞭毛形成能は Full と ΔN2 ではほぼ完全に回復するが、ΔN3 と ΔC2 では部分的にしか回復しない。(b) ΔN3 または ΔC2 発現株に見られる中心子の構造。スポークの先端が細くなり、トリプレットと解離しているものが多数観察される。特に ΔC2 発現株では 8 回対称の中心子が高頻度で観察される。(c) Bld10p 断片発現株のカートホイール・スポークの長さ。スポークが短くなるにつれて 8 回対称中心子の出現頻度が増加する。文献 5 の図を改変。

ふくらみ (pinhead) が細くなって、トリプレット微小管から解離している例が多く観察された (図 3b)。これらの観察から、Bld10p は pinhead の構成タンパク質としてカートホイールとトリプレットとの結合に働くと考えられる。

さらに、C 末 35% を欠失させた Bld10p を発現する細胞では、8 本の 3 連微小管が環状に配置した、直径の小さな中心子が高頻度で観察された (図 3b)。このとき、ハブから伸長するスポークは 9 本のままで、その長さが野生型の約 76% にまで短くなっていた (図 3c)。おそらく、カートホイールの円周が小さくなったため、そこに 3 連微小管が 8 本しか配置することができなくなったものと推察される。

それまで、カートホイールは形態学的に存在が知られているだけだったが、この *bld10* の解析によって、中心子の 9 回対称性構築に重要な働きをしていることがはじめて実験的に示された。

4.2 *bld12* の解析

もう 1 つの変異体 *bld12* では、大部分の中心子が数本のトリプレット微小管の連なりに分離しており、一部の中心子だけが微小管が環状に配置した構造を維持していた⁶⁾。もっとも興味深い点は、それらの環状構

造を構成する微小管の数が 7 本から 11 本までゆらいているということである。 *bld12* は培養条件によって一部の細胞が鞭毛を形成するが、それらは周辺微小管の本数が 9 本のものばかりでなく、8 本、10 本、まれに 11 本のものが含まれていた (図 4a)。この軸糸構造の異常は、中心子の微小管の本数異常を反映しているものと考えられる。中心子の 9 回対称性に異常をもつこのような変異体が単離されたのは、すべての生物を通してはじめてのことである。

変異遺伝子の探索により、*bld12* は、線虫で同定されていた中心子タンパク質、SAS-6 のホモログ (Bld12p) を欠失していることが判明した。SAS-6 も、中心子をもつ多くの生物に広く保存されているタンパク質である。中心子における SAS-6 の局在を免疫電子顕微鏡法によって調べたところ、Bld10p と同様にカートホイールに局在することが明らかになった (図 4b)。ただし、Bld10p はスポークの先端にあるが、SAS-6 はハブを含む中央付近に強く局在する。一方、*bld12* の中心子構造を詳しく観察したところ、スポーク先端の pinhead

を残し、カートホイールの中央部分が欠落していた。つまり、SAS-6 の局在と一致する部分が欠失していたのである (図 4b)。このことから、SAS-6 はカートホイールの中央部分の構成タンパク質として、中心子の 9 回対称性の確立に働くことが明らかになった⁶⁾。

ところで、線虫や哺乳動物細胞では SAS-6 が欠失すると中心子が形成されなくなるのに対し³⁾、クラミドモナスやゾウリムシでは対称性の異常な中心子が形成される^{6),7)}。なぜ生物種によってこのような違いが生じるのかは不明だが、いずれにせよ、SAS-6 の機能が明らかになったのは、正常な中心子が欠失しても生存できるクラミドモナス変異株のおかげである。

4.3 カートホイール依存的な中心子 9 回対称性の確立機構

それではなぜ SAS-6 が欠失すると中心子の 9 回対称性がゆらぐのであろうか。 *bld12* 細胞における Bld10p の局在解析の結果などを考慮して、われわれは以下のようなモデルを提唱した⁶⁾ (図 5)。

クラミドモナス突然変異株の解析と以前からの形態学的な観察から、カートホイールは中心子形成の初期に現れて、微小管形成の足場として働くと考えられる。SAS-6 はカートホイールの中央部を構成して 9 本のスポークが放射状に配置するのに必要で、Bld10p はスポークの先端部分を構成して微小管の形成に働く。SAS-6 が機能して正常なカートホイールが形成されれば Bld10p の働きにより 9 本の各スポークの先端で微小管が形成される。SAS-6 が欠失した場合はカートホイールの放射状構造が失われるが、それでも Bld10p は一部が中心子形成サイトに局在化して微小管形成に機能することができる。しかしその場合、微小管形成サイトは環状に配置できないか、または、配置できたとしても 9 カ所に限定されないため、断片化

図 4 *bld12* 変異株の中心子と軸糸の構造異常。(a) *bld12* の軸糸の横断面。中心子の微小管数の異常により、周辺微小管の数が 8-11 本にゆらぐ。観察された軸糸横断面画像に占める各パターンの割合を写真下に示す。(b) SAS-6 の局在と *bld12* におけるカートホイールの欠落部位の一致。左は野生型中心子における SAS-6 の局在を免疫電子顕微鏡法により観察したもの。局在を示す金コロイドはカートホイールの中央部分に観察される。右は *bld12* 中心子。Pinhead は見えるがカートホイールの中央部分が欠失している。Bar, 100 nm。文献 6 の図を改変。

図 5 中心子の 9 回対称性構造構築における SAS-6 の機能モデル。上段は野生型、下段は *bld12* における中心子構築を示す。文献 6 の図を改変。

した中心子，または微小管が9本ではない中心子が形成されるのであろう。

5. SAS-6 の結晶構造

bld12 変異株の解析により，SAS-6 はカートホイールのハブとそこから放射状に配置するスポークの構築に機能することが明らかとなった。次の課題は，SAS-6 分子がどのような分子構造をもち，カートホイール構造とどのような関係にあるのかを明らかにすることである。

2011 年に，SAS-6 の X 線結晶構造が 2 つのグループによって同時に発表された。1 つはわれわれの参加した英国 MRC のグループ⁸⁾，もう 1 つは現国立遺伝学研究所の北川大樹博士が在籍していたスイス連邦工科大学のグループ⁹⁾ である。

結晶構造と生化学的な解析によって明らかになったことは，SAS-6 が球状の 2 つの頭部と棒状の尾部をもつダイマーを形成するということである (図 6b)。SAS-6 のアミノ酸配列は，N 末端，コイルドコイル，C 末端の 3 つのドメインに分けられるが (図 6a)，双頭ダイマーの頭部は N 末端ドメイン，尾部はコイルドコイルドメインによって構成されることがわかった。C 末端ドメインはおそらく特定の構造をとらないと予測される。頭部は先端部分の疎水性結合を介して別なダイマーと相互作用することから，双頭ダイマーは会合してオリゴマー化する性質をもつと予測される (図 6b)。これらの結果から，カートホイールの中央部分は環状に会

合した 9 個の双頭ダイマーによって構成されているという，SAS-6 の機能モデルが提唱された (図 6b)。

実際に，双頭ダイマーの結晶をクライオ電子顕微鏡によって観察すると，ハブの直径に近い環状構造が形成されていた⁸⁾。また，溶液中の SAS-6 を回転蒸着法によって電顕観察すると，双頭ダイマーが会合したと考えられる環状構造とそこから棒状構造が放射状に配置しているようすが観察された⁹⁾。これらは SAS-6 の機能モデルを支持する結果である。ところが，結晶中の環状構造は 8 個の双頭ダイマーから構成されており，9 回対称ではない。溶液中の会合体も，その直径や棒状構造のなす角度が大きく変動することから，多くは 9 個よりも少ない双頭ダイマーによって構成されていると考えられる。つまり，双頭ダイマーは必ず 9 回対称に会合するわけではないらしい。したがって，実際のカートホイールの中で SAS-6 が機能モデル通りに配置しているか否かを検証する必要があった。

6. 結晶構造モデルの検証

そこで，モデルから予測される SAS-6 の機能部位に変異を導入し，それらを *bld12* 変異株に発現させて細胞内で機能するかどうかを検討した⁸⁾。変異 SAS-6 は，頭部間の疎水性結合を阻害することによってダイマーが会合できなくなると期待されるもの (F145D) と，頭部近傍のコイルドコイル構造を不安定化することによって，ダイマー自身が不安定化すると期待されるもの (L167W) を作製した (図 6b)。これらが細胞内で機能するか否かの指標として，発現株における鞭毛形成細胞の割合を計測した。クラミドモナスでは SAS-6 が機能してカートホイールと中心子が形成されれば，ほぼ必ずそこから鞭毛が形成されるからである。その結果，いずれの変異 SAS-6 も，野生型とほとんど変わ

図 6 結晶構造に基づく SAS-6 の機能モデル。(a) SAS-6 のドメイン構成。N 末端，コイルドコイル，C 末端の 3 つのドメインをもつ。(b) N 末端ドメインとコイルドコイル領域の一部を含む断片 (a) の両向き矢印で示した部分) の結晶構造。N 末端ドメインは球状構造をとり，コイルドコイル領域を介してダイマーを形成する (ここでは 2 つのダイマーを示す)。この双頭ダイマーが隣り合うダイマーと疎水性の結合を介して会合し，カートホイールのハブとスポークの一部を構成する。したがって，頭部間の結合を阻害 (F145D) するか，頭部付近のダイマー状態を不安定化する (L167W) 変異によって，SAS-6 の機能は大きく阻害されると予測される。

表 1 変異 SAS-6 発現株における鞭毛形成細胞の割合。

Flagella per cell	0	1	2	
Wild type	6%	3%	91%	(n = 1026)
<i>bld12</i>	92%	6%	2%	(n = 1120)
<i>bld12::SAS-6</i>	34%	28%	38%	(n = 1024)
<i>bld12::SAS-6</i> (F145D)	91%	7%	2%	(n = 1024)
<i>bld12::SAS-6</i> (L167W)	79%	16%	5%	(n = 1071)

bld12 を形質転換することにより，変異 SAS-6 を発現する株 (*bld12::SAS-6* (F145D)，*bld12::SAS-6* (L167W)) を樹立した。変異 SAS-6 の中心子形成における機能の指標として，細胞あたり 1 本または 2 本の鞭毛を形成する細胞の割合を計測した。いずれの変異 SAS-6 発現株においても，*bld12* の鞭毛形成能と同程度であった。

らない量が発現し、中心子または中心子形成サイトに局在したにもかかわらず、カートホイール形成には機能できないことが判明した(表 1)。したがって、推定していたとおりに、これらの変異によって SAS-6 の機能は阻害されたと考えられる。

また、カートホイール内に SAS-6 がモデルどおりに配置しているとすると、双頭ダイマーの頭部はハブに、尾部の C 末端はハブから離れたスポーク上に位置するはずである。そこで、SAS-6 の C 末端に標識した HA タグの局在を免疫電子顕微鏡法により調べたところ、予測通りに、スポーク上にあることが確認された。これらの結果から、カートホイール中央部は 9 回対称に会合した SAS-6 で構成されていることが確定的になった。

7. おわりに

ここに紹介した一連の研究によって、中心子の普遍的な構造パターンの形成にとって、SAS-6 の自己組織化がきわめて重要な役割を果たすことが示された。しかし、前述のように、SAS-6 の頭部間の結合は比較的弱く、低濃度の溶液中ではダイマー 9 個の会合体はほとんど見られない。細胞内で SAS-6 が安定した 9 回対称性の会合体を作るには、おそらく他の因子も関与しているのであろう。線虫で同定されている SAS-5 は SAS-6 と複合体を作ることが知られている。このタンパク質は他の生物には保存されていないが、ショウジョウバエの Ana2、哺乳動物の STIL タンパク質はその機能的なホモログであり、中心子形成に必須であることが報告されている^{10), 11)}。これらのタンパク質が SAS-6 と協調してカートホイールの中央部分を構築する可能性がこれから検討されることであろう。

中心子の 9 回対称性の確立構築を考える上で着目すべきもう 1 つの点は、カートホイールを欠失した *bld12* 変異株においても、9 本の微小管から構成される中心子をもつ場合が最も多く、本数が変動する範囲も 7 本から 11 本の間収まっていることである⁶⁾。

この事実は、中心子構造の 9 回対称性が、カートホイールだけではなく、複数の要因によって決定されていることを示す。カートホイール依存的な「9 に固定する機構」とは別に、カートホイール非依存的な「およそ 9 前後に限定する機構」が存在すると考えられる。このような複数の機構が存在するからこそ、中心子の 9 回対称性が多様な生物種の間で高く保持されているのかもしれない。どのような因子がカートホイール非依存的な機構に働くのかについては今のところまったくわかっていないが、カートホイールよりも早い時期に形成されるアモルファス環が中心子の直径と微小管数を限定している可能性、中心子微小管間を架橋する構造が微小管の配置を固定することによって本数を限定している可能性などが考えられる。今後、これらの可能性を含めて検討が行われ、中心子の 9 回対称性構築機構の全貌が明らかになることが期待される。

文 献

- 1) Dutcher, S. K. (2007) *Bioessays* **29**, 630-634.
- 2) Dippel, R. V. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 461-468.
- 3) Strnad, P., Gönczy, P. (2008) *Trends Cell Biol.* **18**, 389-396.
- 4) Matsuura, K. *et al.* (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 663-671.
- 5) Hiraki, M. *et al.* (2007) *Curr. Biol.* **17**, 1778-1783.
- 6) Nakazawa, Y. *et al.* *Curr. Biol.* **17**, 2169-2174.
- 7) Jerka-Dziadosz, M. *et al.* (2010) *Cytoskeleton* **67**, 161-171.
- 8) van Breugel, M. *et al.* (2011) *Science* **331**, 1196-1199.
- 9) Kitagawa, D. *et al.* (2011) *Cell* **144**, 364-375.
- 10) Stevens, N.R. *et al.* (2010) *Dev. Cell* **19**, 913-919.
- 11) Arquint, C. *et al.* (2012) *J. Cell Sci.* **125**, 1342-1352.

廣野雅文

廣野雅文 (ひろの まさふみ)

東京大学大学院理学系研究科准教授

1987 年筑波大学大学院博士課程生物科学研究科修了、理学博士。日本学術振興会特別研究員、理化学研究所基礎科学特別研究員、東京大学理学部助手などを経て、98 年より現職。

研究内容: 中心子、鞭毛軸糸の構築機構

連絡先: 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

東京大学理学系研究科生物科学専攻

E-mail: hirono@biol.s.u-tokyo.ac.jp

URL: <http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seiri/lab.html>