

鞭毛軸糸の維持機構に異常を持つ新規クラミドモナス突然変異株lpp2の解析

古賀, 大貴 / KOGA, Hiroki

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

60

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2019-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022104>

鞭毛軸系の維持機構に異常を持つ 新規クラミドモナス突然変異株 *lpp2* の解析

Analyses of a novel *Chlamydomonas* mutant, *lpp2*,
that has defects in maintaining structural integrity of flagellar axonemes

古賀大貴

Hiroki KOGA

指導教員 廣野雅文

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

The axoneme, the inner structure of cilia and flagella, must be flexible enough to allow sliding between the microtubules during flagellar beating, and rigid enough to maintain itself protruded from the cell body under the tension of membrane. However, little is known about how the axoneme equips these apparently inconsistent properties. In this study, I isolated and analyzed a novel *Chlamydomonas* mutant, named *lpp2*, whose flagellar axonemes spontaneously deform. The *lpp2* flagella once protrude from cell bodies and beat normally, but axonemes in a part of the flagella were circularized within the flagellar membrane, after IFT particles were abnormally accumulated in the flagella. These observations suggest that this mutant has defects in maintaining structural integrity of the axoneme. Genetic mapping of the mutation and DNA sequencing of four genes in the mapped area revealed that the *lpp2* has a mutation in MOT30, a gene common to organisms having motile cilia.

Key Words : cilia, axoneme, microtubule, IFT, membrane

1. 緒言

鞭毛の内部構造（軸系）は、膜の張力に抗って細胞外へ突き出る強度と、屈曲運動に伴う微小管間のずれに耐えうる柔軟性という相反する性質を備える必要があるが、その構築と維持の機構はまだわかっていない。

分子細胞生物学研究室の藤らは、以前に、軸系が鞭毛膜内で環状化して細胞体から脱落するという表現型の新規クラミドモナス突然変異株 *lpp1* を単離した[1]。解析の結果、*lpp1* は鞭毛軸系の維持機構に異常をもつ変異株だと結論した。しかし、遺伝解析と全ゲノム解析を行っても、変異の原因遺伝子を同定することはできなかった。

本研究では、鞭毛軸系が自発的に環状化して鞭毛が細胞体から脱落するという、*lpp1* と良く似た表現型の新規突然変異株 *lpp2* を単離して、その表現型と遺伝解析を行った。

2. 実験方法

(1) 電子顕微鏡法

細胞または軸系を遠心分離により沈殿させ、前固定液を加えて 1 時間静置した。その後後固定液を加えて 1 時間固定した。固定されたサンプルの外液を 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% エタノールに順次置き換えて脱水し、エポン樹脂に包埋した。ウルトラミクロトーム

によって超薄切片を作製し、7%酢酸ウラン、Reynold's 溶液で染色した。観察は透過型電子顕微鏡 JEM-1011 を用いた。

(2) *lpp2* 変異のマッピング

AFLP 法を用いて変異のマッピングを行った[2]。ゲノム配列多型を持つ S1-D2 株と *lpp2* 変異株を交配した。得られた接合子から四分子を分離し、それぞれを培養して表現型を観察した。子孫株に対して、いくつかの遺伝子マーカーを用いて PCR 解析を行い、変異型表現型と連鎖するマーカーゲノム上の位置から、変異が存在する領域を同定した。

3. 結果と考察

(1) *lpp2* の表現型

lpp2 細胞では、形成された鞭毛を継続して観察すると、一部の鞭毛にコブ状の構造が出現し(図 1a)、そのコブが鞭毛の先端まで移動した(図 1b)。コブが先端に到達すると、鞭毛が先端から環状化し始め(図 1c)、環状化が細胞体まで達すると(図 1d)、細胞体から脱離した(図 1e)。培地中には先端のみが環状化した鞭毛(ロリポップ、図 1f)と、完全に環状化した鞭毛が多数観察された。

次に培地中に蓄積するリング状の鞭毛を電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、楕円状の膜と、その楕円長

軸の両端に軸糸の横断面が複数存在する切片像が高頻度で観察された (図 1g)。これは鞭毛膜の中で軸糸が環状化し (図 1h)、それによってディスク状に変形した鞭毛膜の断面が観察されているものと考えられる。

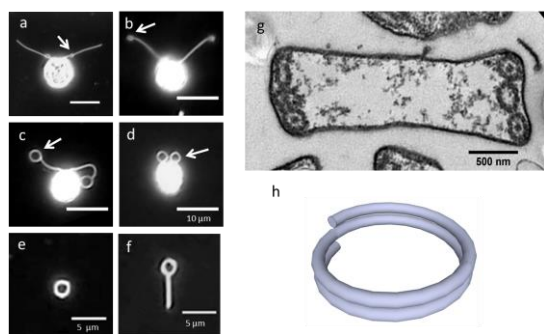


図 1. *lpp2* の表現型観察

(a, b) 鞭毛にコブ状構造を持つ細胞。(c, d) 環状化鞭毛を持つ細胞。(e) 培地中のリング。(f) 培地中のロリポップ。(g) リングの横断面図。(h) 環状化した軸糸の模式図。

(2) コブ状構造と IFT

軸糸の環状化に先立って形成されるコブ状構造の実体について調べた。細胞全体の固定した資料で鞭毛部分を電子顕微鏡で観察したところ、鞭毛膜と軸糸の間に顆粒状の物質が蓄積している部分があることがわかった (図 2a)。この顆粒は、鞭毛内の物質輸送を担う IFT 顆粒とよく似ていた。そこで、IFT の B 複合体を構成するタンパク質のひとつ IFT20 と mCherry の融合タンパク質を発現する株、*ift20lpp2cw92::IFT20-mCherry* を交配により作製し、この株の鞭毛を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、コブ状構造に対応するところに mCherry の蛍光が観察された (図 2b, c)。この結果から、コブ状構造には IFT の顆粒が異常に蓄積していると推察された。IFT は鞭毛の形成だけでなく、維持にも重要な役割を果たす。そのため、この IFT の異常が軸糸の強度の低下を起こしていることが示唆された。

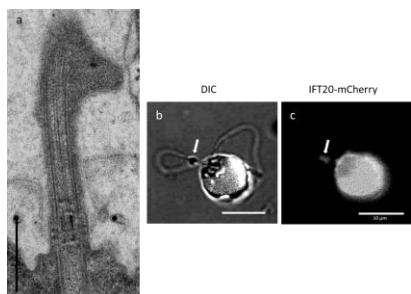


図 2. *lpp2* のコブ状構造

(a) 鞭毛のコブ状構造に相当する部分の超薄切片像。(b, c) コブ状構造の位相差像と蛍光像。

(3) 原因遺伝子探索

古典的な遺伝解析と AFLP 法を組み合わせる *lpp2* 変異のマッピングを行ったところ、5 番染色体の末端にマップ

された。この領域には、約 90 個の予測遺伝子が存在する。私が着目したのは、MOT30 というタンパク質の遺伝子である (図 3a)。MOT30 は比較ゲノミクスにより、運動性纖毛を持つ生物に共通して存在するが、纖毛を持たない生物や非運動性纖毛のみをもつ生物には存在しないタンパク質として同定された。この遺伝子の塩基配列の決定を試みたところ、第一エキソンの途中でシーケンシング反応が停止してそれ以降の塩基配列を決定できなかった (図 3b)。そこで、*lpp2* の MOT30 の第一エキソンを PCR で増幅したところ、その産物は明らかに野生型より大きく、この領域の塩基配列が野生型と異なることが強く示唆された (図 3c)。

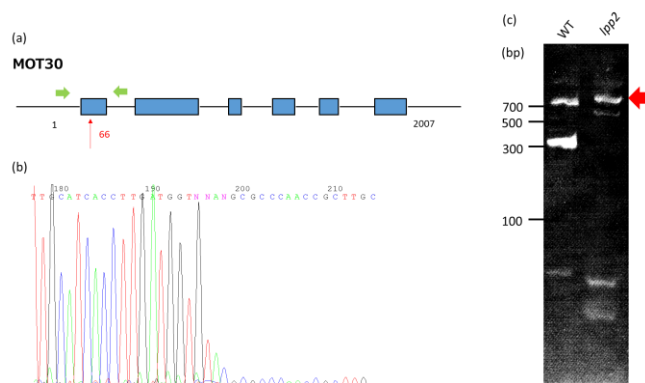


図 3. 第一エキソンの PCR 解析

(a) MOT30 genome の模式図。(b) *lpp2* の MOT30 のシーケンス結果。66 番目の塩基以降、シグナルが急激に落ちてしまう。(c) 野生型と *lpp2* の MOT30 の DNA の泳動写真。DNA は a の模式図で、矢印で示したプライマーで増幅した。

4. 結言

新規突然変異株 *lpp2* は、鞭毛軸糸の維持機構に異常を持つ突然変異株であることがわかった。さらに機能未知タンパク質 MOT30 をコードする遺伝子に変異があることが明らかになった。今後は *lpp2* に野生型 MOT30 を発現させ、表現型が回復するか検討する必要がある。MOT30 の機能を解析することで、鞭毛軸糸の維持機構の一端の解明が期待される。

5. 参考文献

- 1) 藤本潮、東京大学理学系研究科修士論文 2014 年
- 2) Kathir P, LaVoie M, Brazelton WJ, Haas NA, Lefebvre PA, Silflow CD. Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome. Eukaryot Cell. 362–379 (2003).