

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on the structure and function of the outer-dynein-arm docking complex in *Chlamydomonas* flagella

(クラミドモナス鞭毛ダイニン外腕結合複合体の構造と機能に関する研究)

氏名 若林 憲一

真核生物の鞭毛は、「9 + 2」と呼ばれるよく保存された構造を持っている。9組の周辺微小管が2本の中心対微小管を取り囲み、周辺微小管の上にはモーター蛋白質ダイニンの外腕と内腕が結合している。ダイニンはATPの加水分解と共役して微小管と相互作用し、局所的な滑り運動を発生する。これが鞭毛の屈曲運動の原動力となる。ダイニン腕の結合には厳密な周期性があり、外腕は24 nm周期、内腕は複数種が96 nm周期で、それぞれ特異的な位置に結合している。異なる運動特性を持つ外腕と複数種の内腕が、一定の位置関係で周期的に並んでいることが、鞭毛が屈曲運動を行うために重要であると考えられる。しかし、各ダイニンが特異的・周期的なサイトに結合する仕組みはまだ明らかになっていない。

最近、緑藻クラミドモナスにおいて、ダイニン外腕結合複合体 Outer-Dynein-Arm Docking Complex (ODA-DC)と呼ばれる蛋白質複合体が外腕の根本に存在することが発見された。これは83 kDa (DC83), 62 kDa (DC62), 21 kDa (DC21)の3つの蛋白質から成り、ダイニン外腕が微小

管上の特異的サイトに結合する上で重要な役割を果たしていると考えられる。この中で DC83 と DC62 が外腕結合サイトとしての機能に特に重要であることが、DC21 欠損変異株の解析から明らかになっている。また、ODA-DC がダイニンの運動活性を調節している可能性も指摘されている。しかし、そのような興味深い構造であるにもかかわらず、その複合体としての構造、微小管との結合能、生体内での形成過程に関してはまだほとんど明らかになっていない。本研究は、ODA-DC の主要構成蛋白質に対する抗体を作製するとともに、培養細胞においてそれらを発現し、ODA-DC の構造と機能を解明することを目的とした。

第一部では、ODA-DC の機能上重要な役割を担うと考えられる DC83 と DC62 に対する抗体を作製し、これを用いて ODA-DC の生体内における形成過程と鞭毛軸糸上での結合様式を調べた。

まず、すでに単離されている DC83 と DC62 遺伝子クローンを用いて組み換え蛋白質を大腸菌で発現させ、それらを抗原としてポリクローナル抗体を作成した。これらの抗体を用いて、DC62 欠損変異株 *oda1*、および DC83 欠損変異株 *oda3* の鞭毛および細胞体試料に対してウエスタンブロットを行った。その結果、これら 2 つの株の鞭毛では DC83, DC62 の両者ともに完全に失われていることがわかった。また *oda1* 細胞体においては DC62 が欠失しているばかりでなく DC83 が減少し、同様に *oda3* 細胞体においては DC83 が欠失しているばかりでなく DC62 がほぼ完全に失われていることが分かった。このことから、DC83 と DC62 は細胞質で複合体を形成しており、一方が失われると、もう一方の蛋白質も速やかに分解されることが示唆された。

次に、ODA-DC の形成過程を調べるために、野生株の細胞質抽出試料に対して、作製した抗 DC83 抗体と、ダイニン外腕のサブユニット IC69 に対する抗体を用いて、免疫沈降実験を行った。この結果、ODA-DC と外腕の複数の構成蛋白質は、それぞれが細胞質中で複合体を形成しているが、ODA-DC と外腕同士は結合していないことが分かった。ODA-DC とダイニン外腕は別々に鞭毛に運ばれ、鞭毛内、もしくは軸糸上で結合すると考えられる。

作製した抗体を用いて、クラミドモナス細胞の間接蛍光抗体法と免疫電子顕微鏡法による観察を行った。野生株と ODA-DC を持つ外腕欠失株 *oda6* においては、ODA-DC は鞭毛に沿って一様に結合していた。さらに、興味深いことに、*oda6* 軸糸では ODA-DC は野生株における外腕の結合周期と同じ 24 nm の周期で結合していることが分かった。これまで外腕の結合周期はダイニン自体の大きさによって決定されるという考えがあったが、この結果から、その周期は ODA-DC の結合周期に由来することが示唆された。また意外なことに、*oda6* 軸糸においては、根本から先端に

向かって序々に ODA-DC の結合数が減っていき、全長約 10 μm の鞭毛のうち先端約 2 μm 部分では完全に欠落していることが分かった。一方、野生株軸糸では、ODA-DC は鞭毛先端まで一様に分布していた。ODA-DC が *oda6* の軸糸先端部で欠落する理由はまだ十分明らかではないが、ODA-DC は外腕が存在しない状態では微小管との結合能が低く、その濃度が低くなる鞭毛先端部において結合量が減るという可能性が考えられる。

次に、鞭毛形成時に ODA-DC はどのように軸糸微小管に結合していくのかを調べるために、鞭毛を切除して鞭毛伸長反応を誘導した *oda6* に対する間接蛍光抗体法を行った。すると、ODA-DC は鞭毛の伸長とほぼ同時に軸糸微小管に結合することが分かった。すなわち、ODA-DC は外腕が存在しなくても、それだけで速やかに軸糸に結合することができると結論される。また、この結合が鞭毛の伸長と共役しているかどうかを調べるために、*oda1xoda6* 株(外腕欠失、ODA-DC なし)と *oda6* 株(外腕欠失、ODA-DC あり)を接合させ、4 本鞭毛の 2 倍体細胞に対する間接蛍光抗体法観察を行った。すると、ODA-DC は接合後迅速に ODA-DC のない 2 本の鞭毛に結合することが判明した。この結果は、ODA-DC の輸送と軸糸への結合は鞭毛の伸長とは独立に行われることを示している。

以上から、ODA-DC と外腕は互いに独立に、かつ微小管伸長とも独立に軸糸内に輸送されること、また、それにもかかわらず ODA-DC が鞭毛先端部まで均一に結合するためにダイニン外腕の存在が必要であること、が結論される。

第二部では、ODA-DC の主要構成蛋白質を培養細胞で発現し、その精製標品の構造と性質を調べた。

第一部で抗原として使用した、大腸菌で発現した DC83 と DC62 は共に不溶性であったため、発現系を真核生物の蛋白質を発現するのに適したバキュロウィルスを用いた昆虫培養細胞に切り替えた。発現した DC83、DC62 はやはり不溶性であったが、2 つの蛋白質を共発現させたところ、生理的条件下で可溶化した。この共発現系において、DC62 にのみヒスチジンタグを結合させ、ニッケルカラムを用いて細胞上清から精製したところ、DC83 も共に精製された。このことから DC83 と DC62 は直接結合していることが示された。この発現蛋白質の複合体 (rODA-DC) は、軸糸から高塩濃度抽出した ODA-DC と同じ沈降係数を持っていた。rODA-DC は ODA-DC と同様の構造を保持していると考えられたので、この発現蛋白質の性質を調べた。

まず rODA-DC と野生株、*oda1* 株(外腕および ODA-DC 欠失)、*oda6* 株(外腕のみ欠失)の

軸糸、およびブタ脳細胞質性微小管との共沈実験を行った。rODA-DCは *oda1* 軸糸> *oda6* 軸糸> 野生株軸糸の順で良く共沈し、さらに細胞質性微小管とも共沈した。外腕を持つ野生株軸糸とも、細胞質性微小管とも共沈したことから、ODA-DCは微小管結合能を持つことが分かった。また上記のように、ODA-DCはそれを欠損した *oda1* 軸糸に最も結合しやすいことから、軸糸上には ODA-DCをつなぎとめるアンカーとなる構造が存在する可能性が示唆された。

次に、DC83,DC62がどのような蛋白質と相互作用しているかを明らかにするために、rODA-DCと軸糸に対して、様々な架橋剤を用いて化学架橋を行った。軸糸架橋産物のウエスタンブロットにより、DC83がβチューブリンと結合することが示唆された。また、rODA-DC架橋産物のウエスタンブロットの結果、抗DC83抗体および抗DC62抗体の片方とのみ反応するラダー状バンドパターン、また両方の抗体と反応するラダー状バンドパターンが得られた。この結果から、ODA-DCが重合能を持つ可能性が示唆された。また、両方の抗体と反応するバンドの泳動度から、DC83とDC62の結合比は一定値をとらないが、量比2:1でもっとも結合しやすいことが示唆された。DC83とDC62は配列の解析から3つの大きなコイルドコイル構造を持つ可能性があり、24 nm前後の長さを持つことが予測されている。これらのことから、軸糸上のODA-DCの24 nm周期はODA-DCの重合によって形成されている可能性が示唆される。また、軸糸架橋産物において、DC62が未知の蛋白質と結合している可能性を示すバンドパターンが得られた。このパターンはDC62自体の重合によって生じた可能性と、DC62と別の蛋白質の結合による可能性が考えられる。後者の場合、その蛋白質はODA-DCを特異的サイトにつなぎとめるアンカー機能を持つ蛋白質である可能性がある。

第一部・第二部の結果を併せて、ODA-DCの構造、および鞭毛形成時におけるODA-DCと外腕の形成過程のモデルを提案した。ODA-DC内でのDC83とDC62の結合様式は、DC83の二量体に1つのDC62が結合しているか、もしくは2つのDC83を1つのDC62が橋渡ししていると予測される。また、ODA-DCは細胞質で複合体を形成し、外腕と別々に迅速に鞭毛に運ばれ、何らかのアンカー構造により特異的サイトに結合し、重合によって24 nm周期を作り、外腕の足場となると考えられる。これらの結果は、真核生物鞭毛の周期的構造の形成機構を理解する上で重要な知見であると思われる。