

論文の内容の要旨

論文題目 Delivery of exogenous proteins into live *Chlamydomonas* cells
by electroporation: application for studying protein dynamics in the flagellum
(電気穿孔法によるクラミドモナス生細胞への外来蛋白質の導入：
鞭毛蛋白質動態研究への応用)

氏名 林 真人

真核生物の鞭毛・繊毛は非常に複雑な構造を持つ細胞運動器官である。その内部構造である軸糸は、ほとんどの生物において2本の中心微小管を9本の周辺対微小管が取り囲む「9+2」と呼ばれる構造を持つ。周辺微小管上には外腕ダイニン、内腕ダイニン、スポークなどの蛋白質複合体が周期的に結合している。内腕・外腕ダイニンはATP加水分解エネルギーを利用して隣り合う周辺微小管の間に滑り運動を引き起こす。この滑り運動が鞭毛・繊毛の周期的な屈曲運動の原動力となる。軸糸の構造と機能に関する知見の多くは、単細胞の緑藻クラミドモナスを用いた研究を通して得られた。クラミドモナスは突然変異体が得やすく、軸糸蛋白質の欠失突然変異株が数多くとられている。また、形質転換実験を行うことができるため、ジーンタギング法やBACクローン・ライブラリーを用いた変異相補実験によって、いくつかの重要な軸糸蛋白質の同定がなされてきた。クラミドモナスにおいては、外腕ダイニンは約10種の蛋白質からなる1種類の蛋白質複合体であるが、内腕ダイニンは7種類の複合体として存在する。そのうち6種類の内腕ダイニンはアクチンを軽鎖として持ち、さらにそのうち3種類はp28、残りの3種類はセントリンと呼ばれる蛋白

質を軽鎖として持つことが分かっている。しかし、これらの軽鎖が内腕ダイニンにおいて果たす役割については全く明らかにされていない。この問題に対するアプローチの一つとして、ダイニン複合体内の正常な軽鎖蛋白質を人為的に機能を改変したものと置き換えてその効果を調べるという研究が考えられる。しかし、クラミドモナスではクラミドモナス由来のゲノム DNA で形質転換することは出来ても、cDNA や他の生物由来のゲノム DNA を導入して発現する方法は確立されていない。また、クラミドモナスの細胞は直径 10 μm 以下と小さく、マイクロインジェクション法を用いて物質を導入することも事実上不可能である。そこで本研究では電気穿孔法を用いてクラミドモナスの細胞質中に蛋白質を直接導入する方法の開発を試みた。

第 1 部では、アクチンが内腕ダイニンにおいて果たす役割を明らかにするための第一歩として、アクチン欠損変異株 *ida5* の細胞中にウサギ骨格筋アクチンを導入することによって *ida5* の変異形質が回復するかどうかを確かめる実験を行った。*ida5* はアクチンをコードする遺伝子に変異を持つために、アクチン蛋白質を全く発現していない。そのために、軸糸上から内腕ダイニンの一部を欠失しており、低下した運動性を示す。一方、外腕ダイニン欠失突然変異株 *oda1* も低下した運動性を示す。しかし、これらの変異を併せ持つ二重変異株 *ida5oda1* の鞭毛は全く運動性を示さない。この *ida5oda1* の細胞中に電気穿孔法を用いてウサギ骨格筋アクチンを導入したところ、導入後 2-4 時間で最大 20% の細胞が運動性を回復した。回復の効率は印加するパルスの電圧、溶液中のアクチンの濃度、細胞に加わる電場の向きに依存した。泳ぎ出した細胞の運動性は *oda1* と全く同じであったので、アクチンが導入された *ida5* 変異は完全に回復したものと結論された。この回復は導入されたアクチンが内腕複合体に組み込まれることによって、欠失していた内腕が軸糸上に結合できるようになったことによると考えられる。そこで、アクチンが実際に軸糸内に導入されて

いることを確認するために、蛍光標識したアクチンを用いた実験を行ったところ、運動性を回復した細胞の鞭毛は蛍光を示し、その分布は軸糸上の内腕の局在と一致した。除膜した軸糸でも同様の局在を示すことから、導入されたアクチンが確かに軸糸中に組み込まれていることが分かった。以上の結果から、電気穿孔法がクラミドモナス細胞中への蛋白質導入法として有効であること、および、ウサギ骨格筋アクチンがクラミドモナス細胞内で内腕ダイニン軽鎖としての機能を果たしうるということが明らかとなった。

第2部では、第1部で開発した方法の応用として、まず組換え蛋白質の導入法の確立を試みた。そのために大腸菌で発現させた組換え p28 (以下 rp28) をクラミドモナスの p28 欠失突然変異株 *ida4* の細胞内に導入する事によって *ida4* 変異を回復できるかどうかを確認する実験を行なった。rp28 は第1部でアクチンの導入に用いた溶液中では不溶性であったため、実験条件の再検討を行った。その結果、軸糸や軸糸蛋白質の研究に広く用いられている溶液とよく似た組成の溶液を用いることによって、効率よく蛋白質が導入できることが明らかとなった。この際、溶液中に 1 mM 程度の Ca^{2+} が含まれていることが細胞の生存率を高め、効率よく物質導入を行うために重要であった。この溶液を用いて rp28 を *ida4oda6* (全く運動性を持たない) 細胞中に導入したところ、導入後 2-3 時間で最大 25% の細胞が *oda6* と同程度の運動性を示すようになった。蛍光標識した rp28 (以下 rp28*) を用いて実験を行ったところ、rp28* の蛍光は軸糸上に確認されたが、それだけでなくしばしば基底小体においても観察された。これは鞭毛内に輸送される直前の内腕ダイニンの局在を示していると考えられる。これらの結果から、rp28* は内腕ダイニン軽鎖としての活性を保持していると考えられ、軸糸内へのダイニン内腕の輸送過程を直視する研究に有効であると結論できる。

第3部では本方法のもう一つの応用として、軸糸構成蛋白質の交換過程の観

察を試みた。鞭毛・繊毛は複雑で規則的な軸糸構造を持ち、常に一定の長さを保ちつつ屈曲運動を続けているため、物質交換のない安定した構造である考えがちである。しかし、最近の研究によって、鞭毛の長さが一定である定常期であってもチューブリンやダイニン重鎖をはじめ多くの鞭毛構成蛋白質が頻繁に交換されていることが明らかになってきた。特にダイニンは鞭毛運動による力学的ストレスに常に曝されているため、定期的な交換が必要なのだと考えられる。しかし、どの種類のダイニンがどの程度の頻度で交換されているのかは明らかではない。この点を明らかにするために、蛍光アクチンを取り込ませた軸糸に収束させたレーザー光を照射して蛍光を部分的に退色させ、その回復を観察する実験を行った。その結果、ダイニン軽鎖であるアクチンが常に交換されているという直接的な証拠を得ることが出来た。アクチン交換の半減期は約160分であった。これは内腕ダイニンが常に交換されていることを示唆している。

以上に示したように、本研究で開発した方法によって様々な物質をクラミドモナスの生細胞中に導入する道が開けた。アクチンはこれまでに最も良く研究された細胞骨格蛋白質のひとつであり、化学修飾を用いた人為的な機能改変法について多くの蓄積がある。これらの方法と本法とを組み合わせることによって、アクチンのどのような性質がダイニン軽鎖としての機能するために重要であるかを明らかにすることができると期待される。また、組換え蛋白質の活性を検定することが可能になったことは、軸糸蛋白質の機能部位の特定に威力を発揮すると考えられる。さらに、蛍光標識した蛋白質を導入して、その蛍光退色回復過程を解析する方法は、鞭毛の構造形成・構造維持の動的メカニズムを研究する上で重要な方法となるにちがいない。