

論文審査の結果の要旨

氏名 林 真人

真核生物の鞭毛繊維毛は、その形成機構、動作機構ともに、多くのことが未解明で残されている。本論文では、鞭毛・繊維毛の動態研究の新たな方法として、緑藻クラミドモナスの細胞中に電気穿孔法を用いて外来蛋白質を直接導入する方法が有効であることを示すとともに、その応用について論じたものである。

クラミドモナスでは鞭毛構造に異常を持つ突然変異株が多数単離され、遺伝学的・分子生物学的実験方法を用いて、重要な軸糸蛋白質が同定されてきた。鞭毛の機能と構造の研究にとって、この生物は無くてはならない存在であると言える。しかし、クラミドモナスでは cDNA から蛋白質を発現させること困難であり、さらに細胞体が小さくマイクロインジェクション法によって蛋白質を導入することもできないという、重要な制約がある。このことにより、構造を改変した蛋白質を細胞内に導入してその機能を調べるという研究を行うことが、この生物ではむずかしい。外部から細胞内に蛋白質を導入することが容易にできるようになれば、この生物を用いた鞭毛運動の研究は更に発展すると思われる。そこで本研究では、これまで DNA の導入に用いられてきた電気穿孔法を蛋白質の導入に用いる可能性を検討し、実際、それが有効であることを示した。

本論文は三部からなる。

まず第一部では、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実験を行った。*ida5* はダイニン内腕のサブユニットであるアクチンを全く発現していないために、内腕ダイニンの一部を欠失しており、運動性が低下している。こ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。さらに、蛍光ラベルしたアクチンを導入すると、鞭毛軸糸は蛍光を示した。これらことから、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。

第二部では、低イオン強度溶液を用いた第一部の実験条件を改良し、生理的塩濃度の溶液条件下で組換え蛋白質を導入する方法を確立した。ダイニン内腕の軽鎖 p 28 を大腸菌で発現させ、それを欠損した変異株 *ida4* に導入して、変異を回復させることに成功した。蛍光ラベルした p28 を導入すると、蛍光は軸糸に局在したが、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、本法は組み換え蛋白質の機能の検定と、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ことが示された。

第三部では本法のもう一つの応用として、軸糸蛋白質の動的な交換過程の観察が試みられた。最近の研究により、鞭毛内の多くの蛋白質は、鞭毛が完全長の状態で保持されている間も、頻繁に交換されていることが、明らかになってきた。しかし、その交換過程が直接観察されたことは無く、交換の様式など、不明のことが多く残されていた。そこで本研究では、蛍光アクチンを取り込ませた鞭毛の蛍光を部分的に退色させ、その回復を観察することによってアクチンの交換過程を直接観察する試みを行った。その結果、アクチンは160分でその半分が交換するという結果が得られた。またこの観察から、軸糸内のチューブリンは先端で重合して基部で脱重合するという“トレッドミリング”説は否定された。

以上のように、本研究はクラミドモナスにおける革新的な研究法を開発したものである。特に鞭毛研究においては、構造形成・構造維持の動的メカニズムの研究に威力を発揮するものと考えられる。その方法を提示し、基礎的実験を記述した本論文は、博士学位論文としての十分な内容を持つものである。なお、論文の第1部は広野雅文氏、神谷律氏との共同研究、第2部は柳澤春明氏、広野雅文氏、神谷律氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、申請者に博士（理学）の学位を授与できると認める。