

論文の内容の要旨

論文の題目 **Characterization of a novel axonemal protein
essential for the integrity of the 9+2 structure**

(鞭毛軸系 9 + 2 構造の保持に必要な新規蛋白質の同定)

氏名 池田 一穂

真核生物の鞭毛、繊毛は 2 本の中心微小管とそれを取り囲む 9 組の周辺微小管を基礎として構成される運動性の細胞器官である。微小管上にはダイニンやラジアルスポークなどの多様な構造がそれぞれ周期的に結合しており、軸系は長軸方向に約 96 nm を単位とした規則正しい構造をとっている。周辺微小管の A 小管にはリボンと呼ばれる 3 本のプロトフィラメントからなる構造が存在し、その構成蛋白質の一部は周辺微小管の構造や構築を担うとともに、このような軸系の周期性の構築に関与しているとも考えられている。

鞭毛は周辺微小管上のモーター蛋白質ダイニンが発生する力を原動力として周期的な屈曲運動を行う。この際、周辺微小管は互いに結合したまま、隣り合う微小管の間にすべりが生じることによって軸系の屈曲波が形成される。ダイニンについてはその分子構造や ATP 分解酵素としての機能に関して多くのことが明らかにされているが、それが発生するすべり運動がどのような機構で周期的な屈曲運動に変換されるのかはまだほとんど分かっていない。このような機構の一部として極めて重要と考えられるのは、微小管同士をつなぐ仮想的な弾性繊維である。この構造によって微小管間のすべりは一定の振幅に抑えられ、鞭毛の波打ち運動が生じると考えられている。

そのような繊維状構造はネキシリンクあるいはインターダブレットリンクと呼ばれ、隣接する微小管同士を架橋する構造として、軸系の長軸方向に 96 nm ごとに存在することが電子顕微鏡によって観察されている。この構造はプロテアーゼと ATP 存在下における軸

糸の解体 (sliding disintegration) の際に分解消失することから、ダイニンのすべりを一定の振幅に抑える弾性繊維そのものと期待されている。しかし、その蛋白質としての実体と構造的、機能的な性質はいまだ未知であり、弾性を持つことを疑問視する報告もある。現在、ダイニンやラジアルスポークといった軸糸内部の構造の構成蛋白質については、鞭毛内構造を欠失したクラミドモナスの変異株の解析によって、多くのことが明らかになっているが、ネキシンリンクの場合はそれを欠失すると鞭毛が生えなくなるためか、まだ変異株がとられていない。そのため、ネキシンリンクは鞭毛運動において極めて重要な機能が想定されているにも関わらず、解明が進んでいないのである。

そこで、本研究ではネキシンリンクを構成する蛋白質を生化学的に同定することを試みた。前述のように、このリンクはプロテアーゼ処理による軸糸の解体とともに失われる蛋白質によって構成されていると期待される。そこで、クラミドモナスから単離した鞭毛軸糸にトリプシンと ATP を加え、sliding disintegration の進行と同様の時間過程で分解される蛋白質を調べたところ、約 70 kDa の蛋白質が電気泳動ゲル上で同定された。さらに軸糸を高イオン強度、及び低イオン強度の溶液で抽出した結果、この蛋白質は抽出した軸糸中に残ることが示され、またこの条件では周辺微小管は結合したままであることが分かった。そこでその遺伝子のクローニングを行った。この蛋白質の部分アミノ酸配列を決定し、クラミドモナスの cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、アミノ酸 635 残基をコードする cDNA を得た。その配列からこの蛋白質は C 末に Ca^{2+} 結合モチーフとして知られる EF-hand 構造を 2 つ持ち、分子内には 3 つの DM 10 ドメインを持つ推定分子量 71,985 Da の蛋白質であることが判明した。ヒトやマウス、ショウジョウバエなどに相同な遺伝子があることが分かったが、いずれも機能は明らかにされていない。この蛋白質はほぼ同時期に Petal-King らの報告した p72 と同一であったが、局在の検定の結果、後に述べる通りプロトフィラメントリボンとの相互作用が認められたため Rib72 と呼ぶこととした。

Rib72 の性質を詳しく検討するために、まず Rib72 をバクテリアで発現させ、そのリコンビナント Rib72 を抗原として特異的な抗体を作成した。Rib72 は軸糸の sliding disintegration とともに失われる蛋白質として同定されたが、実際にプロテアーゼによって分解されるかどうかは不明である。そこでトリプシン、エラスターゼ、およびナガーゼによって sliding disintegration を起こさせた軸糸のウエスタンブロット解析を行った。軸糸の sliding disintegration の進行と、Rib72 の分解の時間過程を調べたところ、Rib72 はどのような分解条件下でも軸糸の sliding disintegration とほぼ平行して分解されることが示された。また、どのプロテアーゼ処理によっても Rib72 は分子の端から 10 kDa 程度の部位で切断された。これはおそらく Rib72 の分子中のその部位が微小管表面上に露出しているためであると考えられる。

次に、この抗体を用いて Rib72 の局在の観察を試みた。間接蛍光抗体法により細胞を観察したところ、Rib72 は鞭毛内に均一に存在することが示された。さらに金コロイドで標識した 2 次抗体を用いて免疫電顕による観察を行ったところ、金コロイドが微小管上に結合

する様子が観察された。プロテアーゼ処理によって部分的に解体された軸系では金コロイドによる標識がさらに高頻度で起こり、部分的には鞭毛の基本単位に近い約 100 nm の周期性が確認された。この結果は Rib72 の大部分は軸系の表面には露出していないが、プロテアーゼ処理によって露出してくることを示唆する。Rib72 が高イオン強度、及び低イオン強度の溶液で軸系から抽出されなかったことも考慮すると、Rib72 は軸系の内側、あるいは微小管の内部に局在しているという可能性が高い。そこで、軸系を Sarkosyl で抽出し、プロトフィラメントリボンにまで解体し、その抽出上清と抽出残渣をウエスタンブロット解析で比較することにより Rib72 の微小管内の局在を調べた。その結果、Rib72 のほとんどが不溶性の画分に検出されることが明らかになった。Sarkosyl 処理した軸系を免疫電顕で観察すると、金コロイドがリボンや部分的に解体した微小管の周りに高頻度でまとわりつくように結合する様子が見出された。またリボンから離れ、単独の細いフィラメントを作っているように見える部分も観察された。すなわち、Rib72 はリボンそのもののコンポーネントではなく、その結合蛋白質であると考えられる。これらの結果から、Rib72 はこのように、その大部分は微小管の中に埋もれているが、一部が微小管表面上に露出している、という特徴的な局在を示すことが示唆された。Rib72 はこのような局在を示しながらも、プロテアーゼによって軸系構造の崩壊と似た時間経過で分解されるという興味深い性質を持つことが分かった。

配列から推定される Rib72 分子は既知のリボン構成蛋白質との相同性は認められず、内部には EF-hand、DM 10 以外に特徴的なドメインを持たない。配列からの予測では Rib72 は α ヘリックス含量が低く、単体で繊維状のポリマーを構成するとは考えにくい構造であるが、それでは、軸系内ではどのような状態で存在するのだろうか？軸系由来の Rib72 とリコンビナント Rib72 をゲルろ過カラムクロマトグラフィーにかけた結果、この蛋白質は Rib72 単独の分子量の 2 - 3 倍の値を持つ複合体を形成していることが示唆された。すなわち、Rib72 はそれ自身でダイマーを形成し、さらに他の未知蛋白質を含むコンプレックスを構成する可能性が高いと想像される。分子の半分を占める DM 10 ドメインの機能は未知であるが、この結合に関与している可能性も考えられる。微小管と直接相互作用するかどうかについては今後の課題である。

現段階ではこの蛋白質と軸系周辺微小管同士をつなぐネキシンリンクとの関連は不明だが、これらの結果から Rib72 はネキシンリンク本体というよりは、その一部を構成している蛋白質か、或いはその機能の一端を担う結合蛋白質である可能性が大きいと考えられる。いずれにしても、鞭毛、繊毛を持つ生物に普遍的に存在し、軸系構造の保持に寄与する新規リボン結合蛋白質 Rib72 の発見は、鞭毛の運動機構および構築機構の解明にとって重要であると考えられる。