

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on the organization of axonemal inner-arm dyneins in *Chlamydomonas* (クラミドモナス軸系内腕ダイニンの構築に関する研究)

氏名 柳澤 春明

真核生物の鞭毛・繊毛は原生動物からヒトまで保存された細胞運動器官である。モーター蛋白質、ダイニンにより引き起こされる周辺微小管間の滑り運動が、その特徴的な波形運動の原動力である。しかし、複数種ある鞭毛ダイニンが正しく構築され、また制御されるメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで本研究では鞭毛ダイニンのうち、波形発生に重要である内腕ダイニンに着目しその構築機構を探る目的で実験を行った。

材料には多数の鞭毛変異株が存在する *Chlamydomonas* を用いた。 *Chlamydomonas* の内腕ダイニンは 7 分子種である。いずれもモーター活性を持つ重鎖とその調節や軸系上への構築に働くと予想される中間鎖、軽鎖からなり、周辺微小管上に 96 nm 周期で規則正しく構築されている。

(1) 内腕ダイニン自身は微小管系のモーターであるにもかかわらず、軽鎖としてアクチンを含むことが特徴的である。一般にアクチンは重合して微小繊維を形成し、微小管とは別の細胞骨格系をなす。 *Chlamydomonas* のアクチン欠損変異株ではアクチンを含む内腕ダイニン 6 種のうち 4 種が軸系から失われる。このためアクチンは内腕ダイニンの軸系上への輸送、構築に重要であることが予想される。そこで、これまで不明であったアクチンのダイニン複合体中での位置及び他の構成サブユニットとの相互作用を決定することで、内腕ダイニンの構築機構について有益な情報が得られると考えた。

精製した内腕ダイニンについてそのサブユニット構成を調べたところアクチンを含む分

子種には軽鎖 p28 またはセントリンが排他的に含まれていること、また重鎖との量比からアクチンは単量体もしくは 2 量体であることが確認された。p28 は機能未知、セントリンは Ca^{2+} 結合能を持つことが知られている。さらに化学架橋剤を用いた実験により、アクチンは p28 またはセントリンを介してダイニン重鎖の tail ドメインに結合していることがわかった。

次に p28 について組換蛋白質を作成し、その性質を検討した。電気穿孔法で組換 p28 蛋白質(rp28)を欠失変異株に導入すると変異形質が回復した。よって rp28 は生理活性を有していると考えられる。rp28 は *in vitro* での実験で 2 量体として存在すること、F-アクチンと 1:1 に結合し束化する性質があることが明らかになった。

ダイニン分子は構造上、微小管結合及び ATP 加水分解を担う motor ドメインと、カーゴや軸系構造への結合の場とされる tail ドメインに分けられる。本研究でアクチンは tail ドメインに F-アクチン結合能を持つ p28、または Ca^{2+} 結合能を持つセントリンを介して結合していることがわかった。この結果は繊維状態のアクチンが内腕ダイニンの軸系上への輸送、構築に機能することを示唆する。

(2) 精製した内腕ダイニンは単体で微小管結合能をほとんど示さず、また微小管表面の周期性は 8 nm であり内腕ダイニンの周期 96 nm より小さいため、軸系上に内腕ダイニンと微小管を結びつけ、結合位置を決定する因子の存在が予想される。そこで、1)微小管結合能、2)内腕変異株での欠失という 2 つの指標をもとに探索を行った。その結果、内腕ダイニン"e"を欠損した変異株 *pf3*, *ida6* で 58kDa の新規微小管結合蛋白質(p58)が減少していることを見出した。

p58 を生化学的に精製し、部分配列を決定、それを元に cDNA 全長の配列決定を行った結果、以前ウニ精子鞭毛で見つかった中間系フィラメント様蛋白質、tektin と相同であることが判明した。tektin は微小管に沿った繊維状の構造を形成して鞭毛の周期構造と doublet 微小管形成に必須と考えられている蛋白質であるが、これまでに *Chlamydomonas* での存在は知られておらず、また内腕ダイニンや他の軸系上構造の結合に関与するという報告はなかった。遺伝子座の決定の結果 p58 は *pf3*, *ida6* の原因遺伝子ではないことが明らかになった。

まず抗体を作成し局在を調べたところ、p58 はウニ tektin と同じく軸系全体と basal body に一様に存在していた。tektin はこれまで軸系の長さあたり一定量存在すると考えられていたが、*pf3*, *ida6* では軸系全体で一様に減少していた。定量の結果、変異株軸系では野生型の 20%に減少していた。またウニ tektin でのモデルを適用すると、野生型では周辺微小管一本あたり 3 本の p58 繊維が存在することが明らかになった。

また軸系を 2M 尿素で抽出するとチューブリンと p58 を含む繊維状の構造が残ることを見いだした。この繊維構造はチューブリンの protofilament 2 本分の幅を持っていた。これまで tektin は一本の protofilament として A-微小管に組込まれているというモデルが立て

られていた。しかし今回 1M 尿素と 0.3% Sarkosyl によって A-微小管の構造は保持したまま p58 が抽出されることを見いだした。化学架橋剤を用いて *in vivo* での相互作用相手を検討したところ p58 自身及びチューブリン、および~80 kDa の蛋白質との結合を示唆する結果を得た。

pf3 では内腕ダイニン”*e*”に加えて、DRC(Dynein regulatory complex)と呼ばれる A-微小管上の構造が一部欠失することが知られている。p58 は周辺微小管上に微小管表面より長い周期性を持つ繊維構造を形成し、DRC と共に内腕ダイニンの結合位置決定に関与していると推測される。