

# 論文審査の結果の要旨

氏名 柳澤 春明

本論文は真核生物鞭毛内で力を発生している蛋白質複合体ダイニン内腕について、その構造と鞭毛軸糸微小管上の配列機構に関して行った研究を論述したものである。本論文は4章からなり、1-3章で内腕軽鎖の性質、4章で内腕-微小管結合に關与する蛋白質の同定と解析を扱っている。

第1章では、内腕ダイニンにおけるアクチンの状態を解析した。内腕ダイニンは微小管系の運動性蛋白質であるが、異なる運動系蛋白質であるアクチンを軽鎖として持つ。このアクチンが内腕ダイニンにどのように結合し、どのような役割を果たしているかは、まだ明らかではない。そこで、アクチンのダイニン複合体中の位置と結合サブユニットの同定を試みた。化学架橋剤を用いた実験により、アクチンは軽鎖 p28 またはセントリンを介してダイニン重鎖のアミノ末端側のステムドメインに結合していることが明らかになった。p28 は機能未知蛋白質、セントリンは  $Ca^{2+}$  結合能を持つ蛋白質である。いずれの軽鎖も既知のアクチン結合配列を持っていなかった。

第2章では、内腕軽鎖 p28 を組換蛋白質として発現し、その生理機能を検定した結果が述べられている。大腸菌を用いた発現系は生化学実験に必要な量の蛋白質を得ることができるが、機能不明の蛋白質の場合、組換蛋白質が生理活性を持つか否かを確認できないという問題があった。この研究では、その問題を克服するため、電気穿孔法で組換 p28 蛋白質をその蛋白質を欠失した変異株に導入し、変異形質の回復を確認するという実験を行った。その結果、この組み換え蛋白質に生理活性があることが明瞭に示された。

第3章では p28 とアクチンの相互作用を検討した。p28 と骨格筋アクチンを用いた *in vitro* 実験で、p28 は G-アクチン、F-アクチンどちらも結合することがわかった。また安定な2量体として存在し、F-アクチンを束化する性質があることが明らかになった。内腕ダイニン複合体が F-アクチン結合蛋白質を持つという今回の結果は、繊維状態のアクチンが軸糸上への各内腕ダイニンの構築及び輸送に關与している可能性を示唆する。

第4章では内腕ダイニンの微小管結合に關与した蛋白質を検索し、テクチンと呼ばれる蛋白質と類似した蛋白質を同定したことが述べられている。7種の内腕ダイニンは周辺微小管上に規則正しく結合し、全体として 96 nm の周期をなしている。この規則正しい結合を担う軸糸微小管上の因子を同定するため、多数の内腕ダイニン欠失変異株の軸糸中で、特異的に失われている微小管結合蛋白質を探索した。その目的のために、軸糸蛋白質を電気泳動で分離後、高分子膜上で微小管結合蛋白質を検出するという新しいアプローチが用いられた。その結果、内腕ダイニン"e"を欠損した変異株 *pf3*, *ida6* において 58 kDa の蛋白質(p58)が減少していることが見出された。この p58 を軸糸の段階的な変性剤処理と変性条件下のイオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製し、cDNA 全長の配列を決定したところ、p58 は以前ウニ鞭毛で見つかった中間系フィラメント様蛋白質、テクチンと相同であることが判明した。テクチンは周辺微小管の継目付近において長さ方向に繊維構造を形成し、軸糸の周期構造と周辺微小管の形成に必須と考えられて

きた蛋白質であるが、これまでクラミドモナスでは見つかっていなかった。ウニのテクチンは軸糸を界面活性剤サルコシルで処理した後に残るリボン状構造から発見されたが、クラミドモナス軸糸では、同様のリボン構造には存在しなかった。一方、間接蛍光抗体法による観察では、p58はウニのテクチンと同じく軸糸全体と基底小体にも存在することが判明した。これまでの研究では、テクチンは軸糸の長さあたり一定量必要であると考えられていたが、*pf3* と *ida6* においてはその存在量は野生型の20%以下に減少していた。すなわち、今回の研究はテクチンのホモログp58が内腕ダイニンの結合に関与することを明らかにし、さらに、この蛋白質の存在量が減少しても軸糸全体の構造には影響しないなど、これまでの他の生物で研究されてきたテクチンの性質とは大きく異なる結果をもたらした。現在広く信じられているテクチン機能に関して、今後再検討が必要になるものと考えられる。

以上のように、本論文で扱われた研究は、ダイニンの存在状態と、軸糸微小管構成蛋白質テクチンの機能に関して、重要な新知見をもたらしたものである。なお、本論文の第1部と第4部は神谷律と、第2部は林真人、広野雅文、神谷律との共同研究によるものであるが、論文提出者の寄与が十分であると判断される。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。