

論文内容の要旨

論文題目 Studies on the basic components of ciliary and flagellar
axonemes

(真核生物の鞭毛・繊毛軸系構築の基礎となるタンパク質の研究)

氏名 池田 隆

真核生物の鞭毛・繊毛は、運動装置あるいはシグナルを受け取るアンテナとして働く細胞器官である。近年、人間においてこれら鞭毛や繊毛のなんらかの異常が様々な病気を引き起こすことがわかってきたことから、鞭毛・繊毛が担う機能の多様性と重要性が示されている。鞭毛・繊毛の骨格部分である軸系は、2本の中心対微小管を9組の周辺微小管が取り囲む、いわゆる9 + 2構造と呼ばれる構造を持っていて、各周辺微小管はネキシンリンクと呼ばれる繊維状構造によって隣り合う周辺微小管とつながれている。周辺微小管上にはネキシンリンクの他に、ダイニンやその活性を制御するダイニン制御複合体など様々な構造が規則正しく配置している。また、周辺微小管はA小管とB小管からなり、各周辺微小管はネキシンリンクと呼ばれる繊維状構造によって互いにつながれている。周辺微小管中にはプロトフィラメントリボンと呼ばれる、サルコシル処理に対して不溶性として残る構造体が存在し、周辺微小管の構築と安定性に重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。このような軸系の全体的な構造は古くから調べられ、少なくとも250種類のタンパク質から構成されていることがわかっているものの、その骨格を構成するタンパク質それぞれの実体、局在、相互作用や機能は、一部のものについてしか解明されておらず、軸系構築の基礎はいまだ不明な部分が多い。

軸系の構造は原生生物から哺乳類に至るまでよく保存されているが、鞭毛・繊毛を研究するのに、緑藻の一種であるクラミドモナスは優れたモデル生物として知られている。また、この生物は外界からの刺激に応答し、細胞内のCa²⁺濃度を変化させることによって劇的に鞭毛打波形を変換するなど、興味深い性質も持っている。近年、クラミドモナスにお

いて、プロトフィラメントリボンに存在する Rib72 と呼ばれるタンパク質が同定された。このタンパク質はある種のプロテアーゼと ATP の添加によって引き起こされる「sliding disintegration」と呼ばれる軸糸構造（9 + 2 構造）の解体と同時に失われることから、分子としての実体が不明であるネキシリンクとの関わりが指摘されている。また、Rib72 は DM10 と呼ばれるある種の NDP キナーゼに見られるドメインと、Ca²⁺結合モチーフである EF-hand を持つことから、Ca²⁺で調節される NTP 合成系の一部をなすのではないかという考えも提唱されている。しかし最近、Rib72 と相同な配列がヒトの神経細胞で発現し、この遺伝子に生じた変異が、若年性ミオクロニー癲癇（JME）と呼ばれる疾患の原因になっているのではないかという報告がなされた。このように、Rib72 が真核生物全般にわたって軸糸タンパク質として機能しているのかどうかや、このタンパク質がどのようなタンパク質と相互作用し、実際にどのような機能を担っているのかはわかっていない。

第1部では、クラミドモナスの鞭毛軸糸で同定された Rib72 が真核生物の軸糸一般に保存されているタンパク質であるかどうかを、マウスの Rib72 ホモログを調べることによって検討した。はじめにデータベース検索により、クラミドモナス Rib72 と相同な配列がマウスには2つあることがわかり、それぞれ、mRib72-1、mRib72-2 と命名した。これらマウスホモログはともに、クラミドモナス Rib72 と同様に DM10 ドメインの3回繰り返しと、C 末部分に2つの EF-hand モチーフを持っていた。しかし最近、意外なことに、mRib72-1 と同一の遺伝子が、若年性ミオクロニー癲癇の原因遺伝子 *EFHC1* のマウスホモログとして、*Efhc1* の名前で報告された。また後に、mRib72-2 のヒトホモログである EFHC2 も JME と関連すると報告されている。したがって、これらのタンパク質が実際に鞭毛・繊毛特有のタンパク質であるか否かを再検討される必要が生じた。様々な器官におけるノザン解析の結果、両者ともに精巣で最も多くの発現が認められ、他の器官ではわずかししか検出されなかった。また、mRib72-1 の抗体を作成し、タンパク質レベルでの発現を様々な器官で調べたところ、精巣と卵管で特に強く、次いで気管、肺で、そしてごく弱く脳での発現が見られた。これらはいずれも運動性の鞭毛・繊毛を持つ器官である。さらに、運動性の鞭毛・繊毛を持つ精子および気管上皮細胞と、非運動性の一次繊毛と呼ばれる繊毛を生やした NIH3T3 細胞について、間接蛍光抗体法による mRib72-1 の局在観察を行った結果、精子鞭毛軸糸と気管上皮繊毛軸糸全長にわたる局在が観察されたが、一次繊毛中では観察されなかった。以上の結果から、Rib72 は真核生物に広く保存された軸糸タンパク質であり、特に運動性軸糸に重要であることが示唆された。脳には髄液の流れを作る働きを担う運動性の繊毛が存在している。このタンパク質の変異と JME の発症との間の相関を示唆した報告では、変異 *EFHC1* が神経細胞のアポトーシス過程を阻害することが癲癇発症の原因として考えられているが、本研究の結果はその考えを支持しない。本研究の結果は、この疾患の病理に繊毛のなんらかの異常が関わっている可能性を強く示唆している。

第2部では、Rib72 と結合し、軸糸構築の基礎となるタンパク質を同定し、解析した。まず、マウス mRib72-1 と相互作用するタンパク質を酵母ツーハイブリッド法で探索したが、

再現性のある結果は得られなかった。そこで、組換え Rib72 を用いて、クラミドモナスの軸系タンパク質に対するプロットオーバーレイアッセイを行った。その結果、2組の EF-hand モチーフを持つ新規タンパク質 (EFp39 と命名) と、Pacrg と呼ばれるタンパク質のホモログを同定した。Pacrg はもともと哺乳類でパーキンソン氏病の原因遺伝子である *PARK2* とプロモーターを共有する遺伝子の産物として知られていたものである。さらに、EFp39 と Pacrg の Rib72 結合を他の実験系で検討するため、化学架橋実験を行った。その結果、両者ともにある種の架橋剤によって軸系内で架橋されるが、特に EFp39 については何種類もの薬剤で架橋されることがわかった。この結果からも、EFp39 と Pacrg が Rib72 と結合している可能性が高いことが示された。

次に、EFp39 と Pacrg の局在を間接蛍光抗体法、または免疫電子顕微鏡観察によって検討した。その結果、両者とも周辺微小管に全長にわたって局在するという Rib72 と似た局在を持つことがわかった。しかし、両者ともに、プロトフィラメントリボンに存在する Rib72 は部分的にしか抽出されない溶液条件下で完全に解離することがわかった。したがって、これらはプロトフィラメントリボンの構成タンパク質ではなく、それに付随するタンパク質であることが示唆される。ただし、ダイニンなど多くの周辺微小管を形成するタンパク質が軸系から解離する条件下で抽出を行っても EFp39 と Pacrg は軸系から解離しないので、周辺微小管に比較的強く結合したタンパク質であると考えられる。

Rib72 は sliding disintegration と同時に失われるタンパク質である。そこで、最後に sliding disintegration の進行過程における EFp39 と Pacrg の挙動を調べた。その結果、Rib72 の分解および sliding disintegration の進行に比べて、これらのタンパク質の軸系からの解離ははるかに遅く起こることがわかった。このことから、EFp39 と Pacrg の軸系との結合は Rib72 の存在状態とは独立であり、これらのタンパク質を周辺微小管につなぎとめておくには別のタンパク質が関与していることが示唆された。

データベース検索の結果、他の生物種においては、EFp39 と相同な配列をもつタンパク質は見出されなかった。したがって、このタンパク質はクラミドモナス特有のカルシウム結合タンパク質である可能性がある。クラミドモナスの鞭毛は Ca^{2+} 濃度によって運動波形を大きく変化させるという特徴的な性質を持つが、このタンパク質はそのような鞭毛の特殊な性質に関係している可能性も考えられる。一方 Pacrg は、最近、トリパノソーマ鞭毛で、その発現を阻害すると一部の周辺微小管が失われ、その欠失した周辺微小管の数は鞭毛の先端に近いほど多いことが報告された。また、周辺微小管の欠失がない領域でも、一部のネキシンリンクに切れ目が生じることも観察されたことから、Pacrg がネキシンリンクの一部を形成することによって、9 + 2 構造の安定化に寄与している可能性が指摘されている。したがって、今回 Pacrg が、ネキシンリンクに関連していると考えられている Rib72 と相互作用する可能性が示唆されたことは興味深い。周辺微小管は、tubulin を中心に様々なタンパク質間相互作用ネットワークの結果構築されていると考えられる。今後、EFp39 および Pacrg と Rib72 の結合をさらに検討するとともに、これらと結合するタンパク質を

研究することによって、ネキシンリンクのタンパク質構成や、周辺微小管の構築機構が明らかになると期待される。