

論文審査の結果の要旨

氏名 池田 隆

真核生物の細胞運動装置、鞭毛・繊毛の骨格部分である軸糸は、2本の中心対微小管を9組の周辺微小管が取り囲む普遍的構造を持つ。この構造は古くから知られているが、微小管同士を結合する構造（ネキシンリンク）や周辺微小管の構成要素の実体はまだほとんどわかっていない。しかし最近、クラミドモナスにおいて、周辺微小管中に存在する安定な微小管束（リボンと呼ばれる）の主要タンパク質の一つ Rib72 が同定された。このタンパク質は微小管の安定化とともに、ネキシンリンクの結合にも関与する可能性が推定されており、軸糸構造の構築に基本的に重要な役割を果たすと考えられる。

本論文は、Rib72 を手がかりにして、軸糸構築機構に迫ろうとする実験結果をまとめたもので、2章からなる。まず第1章では Rib72 が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。データベース検索により、マウスには Rib72 と相同な配列が2つあることがわかった。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こ検出されなかった。さらに、そのうちの一つ 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、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、精子と気管上皮細胞について間接蛍光抗体法観察を行った結果、精子鞭毛軸糸と気管上皮繊毛軸糸全長にわたる蛍光が観察された。一方、非運動性の一次繊毛と呼ばれる繊毛を持つ培養細胞では局在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。最近、意外なことに、mRib72-1 と全く同一の遺伝子 Efhc1 が、ヒト若年性ミオクロニー癲癇 (JME) の原因遺伝子 EFHC1 のマウスホモログとして報告され、神経細胞の細胞死に関与しているという考えが提唱された。Rib72-1/Efhc1 が鞭毛・繊毛においてのみ特に強く局在することを明瞭に示した本研究の結果は、JME の発症機序に再考を迫るものである。

第2部では、Rib72 と結合するタンパク質を検索した結果が述べられている。クラミドモナスの組み換え Rib72 を用い、軸糸タンパク質に対するブロットオーバーレイアッセイを行った結果、EF-hand モチーフを持つ新規タンパク質 EFp39 と、Pacrg と呼ばれるタンパク質が同定された。軸糸の化学架橋実験によって、両者ともある種の架橋剤によって Rib72 と架橋されることが示され、それらのタンパク質間の結合が支持された。さらに、間接蛍光抗体法または免疫電子顕微鏡観察により、EFp39、Pacrg も周辺微小管に全長にわたって局在することがわかった。これらは軸糸から多くのタンパク質が解離する高塩濃度条件

下で抽出を行っても軸糸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。一方、KI など、塩溶性の高い溶液によって軸糸から完全に解離することが見いだされたが、その条件では Rib72 は部分的にしか溶出されなかった。したがって、Pacrg と EFp39 はともにリボン構成タンパク質というよりは、それに付属するタンパク質であることが示唆される。また、Rib72 は軸糸を ATP 存在下でプロテアーゼ処理した際、軸糸解体と同時に失われるタンパク質である。一方、EFp39 と Pacrg は軸糸が個々の周辺微小管に解体後も微小管に結合したまま残ることが認められた。このことから、EFp39 と Pacrg の軸糸との結合には Rib72 だけでなく、別のタンパク質も関与していることが示唆された。

以上の結果、運動性鞭毛・繊毛における Rib72 の普遍性が示され、それと相互作用する新規タンパク質 2 種が同定された。軸糸骨格の構成タンパク質がまだ数種類しか同定されていない現状では、このような新規タンパク質が発見されたことは重要である。このタンパク質を手がかりにして、さらに多くのタンパク質が同定されることが期待される。そのような今後の研究への手がかりを提供した研究として、本研究は高い価値を持つと考えられる。

なお、本研究は池田一穂、榎本匡宏、朴民根、広野雅文、神谷律との共同研究であるが、論文提出者が主体になって実験を行ったものであると認められる。したがって博士（理学）の学位を授与できるものと認める。