

## 論文内容の要旨

論文題目: Studies on the motility properties of flagellar inner arm dyneins

(鞭毛内腕ダイニンの特徴的運動性に関する研究)

氏名: 菊島 健児

真核生物の鞭毛・繊毛は、自律的に屈曲運動を発生する器官である。鞭毛は様々な構成要素から複雑に構成されているが、その運動は本質的にモータータンパク質であるダイニンと微小管との相互作用によって行われている。鞭毛内において、ダイニンは9本の周辺微小管上に存在しており、隣り合う微小管に対して滑り運動を発生する。そうして生じた周辺微小管間のひずみによって、鞭毛は屈曲するものと考えられている。鞭毛ダイニンは周辺微小管上の位置に応じて外腕ダイニン、内腕ダイニンの2種に大別でき、さらに内腕ダイニンには多種の亜種が存在する。クラミドモナスでは、ダイニン a-g と呼ばれる7種の内腕ダイニンの存在が知られている。これまで、ガラス表面上に吸着したダイニンによる微小管滑走運動の観察 (in vitro motility assay) により、それぞれのダイニンが異なる運動性質を持つことが明らかにされてきた。各ダイニン固有の役割を解明することは、現在の鞭毛運動機構研究の課題の一つである。鞭毛の周期的な波動運動の形成には、それら性質の異なる複数のダイニンが空間的・時間的に制御を受け、協調して働く機構が必要である

が、どのようなメカニズムでそれらのダイニンの働きが制御されているかについてはまだ解明されていない。今回、私はクラミドモナス鞭毛の内腕ダイニン a、c ならびに d に主に着目し、様々な条件下における *in vitro* でのダイニンによる微小管滑走の観察を行った。

本論文は全 3 章からなり、第 1 章では内腕ダイニン a に注目し、その運動活性が ADP 濃度に依存して、ゆっくりと活性化される現象について報告する。第 2 章では、内腕ダイニン c における外力存在下での微小管滑走速度変化について解析を行い、ダイニン運動性の力学的応答について扱っている。また、内腕ダイニン d、g を用いたこの研究において、微小管の滑走方向が右に曲がるという新たな性質が明らかとなり、第 3 章では、そのことについて扱っている。

## 第 1 章 ダイニン a の運動性は ADP 濃度に依存してゆっくりと活性化される

ダイニンのモータードメインは AAA+ファミリーに属しており、ATP 加水分解サイトの他にも、複数の調節的ヌクレオチド結合サイトを有している。ダイニンの活性は ATP、ADP に対して特殊な依存性のある事が報告されており、それらの調節サイトの寄与が示唆されているが、その具体的な作用機構や、鞭毛運動への生理学的意義については未だ不明である。第 1 章では内腕ダイニン a に着目し、*in vitro* でのダイニンによる微小管滑走へのヌクレオチドの効果について研究を行った。

溶液を 1 分毎に置換することにより、実験系内のヌクレオチド濃度を一定に保った条件下での微小管すべり速度の時間変化を観察した。実験の結果、ATP による活性化を開始してから、徐々に微小管の滑走速度が「分」のオーダーで増加する現象が観測された。ダイニンにおいてこのような遅い現象が発見されたのはこれが始めてである。また、この速度増加は ADP 濃度依存的に変化する事が明らかとなり、この現象は ADP がゆっくりと調節的ヌクレオチド結合サイトへ結合する事によりもたらされている事が示唆された。なお、この現象は可逆的であることも明らかとなった。

このゆっくりとした速度増加の現象の生理学的意味については不明であるが、ダイニンの特殊な性質として興味深いものである。またこの現象は内腕ダイニン c においても同様に観察され、ダイニンに一般的な性質であると考えられる。

## 第 2 章 溶液灌流による外力存在下での微小管滑走速度の変化

これまで、ダイニンの運動性調節については、Ca イオン、リン酸化、ヌクレオチド濃度、ならびに酸化還元状態といった化学的条件により制御を受けていることが示されてきた。しかし 鞭毛・繊毛の振動運動の発生には、これらのような化学的制御だけでなく、ダイニンの活性制御はダイニンが受ける力によって制御されるといった、メカニカルフィードバック機構を通じた制御の存在が必要であると考えられている。しかし、そのようなダイニンの力学的制御機構を直接示した研究はまだない。そこで、私は *in vitro motility assay* の系を応用し、小型のポンプによって ATP を含んだ溶液を一定の流速で灌流することにより、微小管に溶液による剪断力を加えた条件での、ダイニンによる微小管滑走運動の様子を観測した。溶液灌流による外力を加えると、多くの微小管が流れの下流方向に向かって進行する様子が観測された。これは溶液の剪断力が、ダイニンの結合していない微小管の先端

部分を下流方向へと曲げるためであると考えられる。このときの下流方向へと向かう微小管滑走速度の測定を行ったところ、ダイニン d では、ATP 濃度の条件にかかわらずに、溶液灌流による微小管の滑走速度変化は観測されなかった。それに対して、ダイニン c では、ATP が 0.5 mM 以上の条件に限り、外力によって微小管の滑走速度が増加する現象が観測された。一方、灌流方向を反転することによって、溶液の流れと反対方向に運動する場合の微小管滑走速度について測定を行ったところ、ダイニン c、d ともに、いずれのヌクレオチド条件下においても、流れの有無によって変化することなく、ほぼ一定であった。このことから、ダイニン c には、外力を一定方向にのみ伝えるラチェットのようなメカニズムが存在しており、この機構は ATP の調節的ヌクレオチド結合サイトへの作用を通じて制御されていることが示唆される。また、このとき多くの微小管は外力によって外れることなく滑走を続けることから、観測された外力による速度増加はダイニン・微小管間結合が弱くなったために生じたのではなく、ダイニンの運動サイクルが外力によって増大していることによるものであると考えられる。鞭毛内には運動性の異なる複数のダイニンが存在するが、動きの遅いダイニンが速いダイニンによる運動を邪魔することなく協調して力発生を行う必要がある。これまでその機構は明らかにされていなかったが、ここで示したダイニンの外力応答の性質は、その仕組みの基礎として重要であろう。

### 第3章 ダイニン d の発生するトルクによる微小管曲進運動

溶液灌流下での微小管の滑走方向を詳細に調べた結果、ダイニン c ではほとんどの微小管がほぼ流れと平行に滑走するのに対して、意外なことに、ダイニン d では流れに対して右向きに配向することが明らかとなった。この角度は灌流速度、ヌクレオチド濃度に依存するが、微小管の長さには依存しない。このことは、微小管の進行方向を曲げる力がダイニンの活性によって発生されていることを示唆するものである。

溶液灌流を止めた後の微小管滑走運動を観測すると、ダイニン c では滑走方向が徐々に進行方向がランダムになっていった。これは、以前にキネシンを用いた実験で報告された結果と同様のものである。それに対して、ダイニン d では、滑走方向がランダムになりつつも時計回りに変化する現象が観測された。また、外力のない条件での個々の微小管先端の軌跡をトレースした結果、ダイニン d では軌跡が右方向への曲率を有していることから、外力の有無にかかわらず、ダイニン d は微小管の進行方向を右方向に曲げていることがわかった。このときの微小管のイメージを重ねると、各微小管とも右向きに曲がった 1 本の曲線上を滑走しており、微小管がガラス平面状をスライドして移動するのではないことが明らかとなった。

次に、微小管の滑走方向変化と滑走速度から滑走軌跡の曲率を測定を行ったところ、その曲率は微小管の長さ、ヌクレオチド濃度によらずに一定であるが、ダイニン濃度が薄い条件では軌跡の曲率が減少する傾向が認められた。以上のことから、観測された微小管曲進運動は、ダイニンが微小管に対して直角方向にトルクを発生しており、その先端部分を少しずつ右方向へ屈曲させることによって生じていると考えられる。また、このトルクは微小管を長軸方向に運動させる力発生と対応していると推測される。

同様の微小管曲進運動は、内腕ダイニン g においても同様に観測されたが、他のクラミ

ドモナス鞭毛ダイニンでは見受けられなかった。

これまで、鞭毛の屈曲は周辺微小管間のすべりによって引き起こされると考えられており、そのことはまず確定している。しかし、今回の研究結果は、鞭毛屈曲が周辺微小管間のずれによるだけでなく、ある種のダイニンの発生するトルクによっても直接引き起こされうる可能性を示唆している。発生トルクの直接測定は今後の課題である。

本研究により、鞭毛内腕ダイニンはそれぞれ種類ごとに様々な特異な性質を有しており、化学的、力学的な制御を受けてその運動活性を変化させていることが明らかとなった。鞭毛の波動運動発生には、これらの特殊な性質を持ったダイニンが、それぞれ協調して働くことが必要であると考えられる。