

論文内容の要旨

論文題目

Studies on the in vitro motile properties of *Chlamydomonas* outer-arm dynein
(クラミドモナス軸系外腕ダイニンの in vitro 運動特性に関する研究)

氏名 古田 茜

序論

真核生物の鞭毛・繊毛の屈曲運動は、軸系微小管上に周期的に並ぶモータータンパク質ダイニンが力を発生し、隣り合う微小管との間で“滑り”を生じることで作り出される。複数種からなる軸系ダイニンの中でも、軸系中に最も多く存在する外腕ダイニンは、微小管の速い滑りに重要であると考えられている。外腕ダイニンは、2～3個の異なる重鎖からなる複合体であり、各重鎖にATPを加水分解し、微小管と相互作用して力を発生する機能がある。キネシンやミオシン、細胞質ダイニンといった他の多くのモータータンパク質は、同じ重鎖を2つ持つホモダイマー構造をとるが、鞭毛・繊毛の外腕ダイニンはヘテロな重鎖の複合体であることが知られている。それぞれの重鎖が複合体の中でどのような役割をもつのかを明らかにすることは、外腕ダイニンの動作機構を理解する上でも興味深い課題である。本研究に先立ち、我々の研究室では、外腕ダイニンの3つの重鎖(α 、 β 、 γ)のそれぞれ1つを欠失する3種のクラミドモナス変異体の単離に成功しており、これらを用いた軸系レベルの研究により、重鎖ごとに運動への寄与の程度が異なることが示された。しかし、3

つの重鎖の分子レベルの性質の違いについては明らかにされていない。そこで本研究では、野生型の外腕ダイニン($\alpha\beta\gamma$ と呼ぶ)の in vitro における運動特性を調べるとともに、特定の1つの重鎖を欠く変異型のダイニン($\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\beta\gamma$ と呼ぶ)をそれらの変異株から単離して、野生型と活性を比較した。これらの外腕ダイニンは微小管滑り運動活性、ATPase 活性ともに大きく異なり、3つの重鎖が異なる性質を持つことが直接的に示された。

結果・考察

1. ビオチンタグ付外腕ダイニンの作製

運動活性を測定する方法として、蛍光標識したダイニンの微小管上の挙動を観察する方法と、ガラス上にダイニンを吸着させ、その上で微小管の滑り運動を発生させる Gliding assay 法を用いた。ここで、本研究では野生型と変異型の外腕ダイニンの活性を同じ条件で比較するために、全てのダイニンを同一の部位(尾部)で標識、固定する必要がある。この目的のため、外腕ダイニンを特異的に標識する新規な方法を開発した。外腕ダイニン複合体の尾部に結合することが分かっている軽鎖 LC2 に着目し、ビオチン化タグ BCCP(Biotin Carboxyl Carrier Protein)を融合した LC2 を発現する株を作製した。変異型の外腕ダイニンを発現する株についても同様のタグを導入し、ビオチンタグ付きの野生型および全種類の変異型外腕ダイニンを単離・精製することに成功した。これらのダイニンと、重合微小管を用いて、それぞれの運動活性を測定した。

2. 野生型ダイニンの運動特性

野生型3頭ダイニンによる微小管滑り速度は、ATP 濃度およびダイニン密度の増加とともに上昇した。滑り速度のダイニン密度依存性から、duty ratio (一回の ATP 加水分解サイクルに占める、微小管との結合時間の割合)は0.08と算出された。この値は細胞内の物質輸送に関わるキネシン(duty ratio = ~ 1)や、細胞質ダイニン(duty ratio = 0.6)に比べて非常に小さい。また、ビオチン化ダイニンに量子ドット-アビジンを結合して、微小管上の一分子のダイニンの挙動を観察したところ、ATP 依存的な微小管への結合・解離は見られるものの、微小管上の一方向の連続的な運動は

作り出せないことが分かった。これらの結果から、外腕ダイニンは、多数の分子が共同して速い運動を発生するのに適したモーターであると考えられる。

3. ADPによる微小管滑り活性の上昇

過去の研究により、数種の軸糸ダイニン(クラミドモナス内腕ダイニン, ウニ精子外腕ダイニンなど)において、運動性がADP存在下で上昇することが示されている。このメカニズムとして、重鎖に存在する4つのATP結合サイト(P1~P4)のうち、モーター活性に必要なATP加水分解に関わるヌクレオチド結合部位はP1であり、それ以外の3つのサイトはダイニンの調節に関わるサイトで、そこにADPが結合することで、ダイニンが活性化するという考えが提唱されている。しかし、その調節現象の一般性や、その実際の機構は明らかになっていない。そこで、クラミドモナスの野生型外腕ダイニンについてもADPによる活性の上昇が見られるかを調べた。あらかじめガラスに固定したダイニンを様々な濃度のADPでインキュベートしたのち、ATPと微小管を流して、滑り速度の経時変化を調べたところ、ADP濃度の上昇と共に、微小管滑り速度および運動の持続時間が上昇した。以上の結果から、クラミドモナス外腕ダイニンにおいても、ADPによる運動の活性化が見られることが明らかになった。

4. 野生型と変異型外腕ダイニンの活性比較

以上の結果をふまえて、野生型と3種の変異型外腕ダイニンについて、微小管滑り速度と、ATP加水分解活性を測定した。その際、各ダイニンのin vitro gliding速度は、野生型ダイニンが最大微小管滑り速度を起こす条件に統一して測定した。その結果、 β 重鎖を欠失すると滑り速度もATP加水分解活性も低下するが、 γ 重鎖を欠失すると両者共に上昇することが分かった。興味深いことに、 α 重鎖を欠失すると、野生型に比べて滑り速度は著しく低下するが、ATP加水分解活性は上昇した。このin vitro運動の系では、 α 重鎖が、3頭ダイニンの中で、全体のATP加水分解活性を抑えつつ、速い微小管滑り運動を作り出していること、すなわち、効率的な運動の発生に寄与していることが示唆される。これらの結果から、外腕ダイニンを構成する3つの重鎖はそれぞれ異なる

る役割をもつことが明らかになった。

結論

以上のように、本研究では、様々な種類のダイニンの *in vitro* 運動活性を同一条件で比較することにはじめて成功した。外腕ダイニンの活性は、異なる3つの重鎖の活性の単純な足し合わせではなく、重鎖間の抑制などの相互作用の結果として現れていることが明確に示された。一方、今回観察された各種外腕の運動活性は、それらの外腕を持つ軸糸の運動性とは必ずしも一致しないことも明らかになった。軸糸構造中では、外腕ダイニンは高い密度で整列し、隣り合うダイニンと協調することによって、この *in vitro* 系で見られた運動性とは異なる性質を持つものと考えられる。今回の研究は、個々のダイニン外腕それ自体が示す性質を測定したものとして重要であり、今回示唆された分子内の調節の機構と、軸糸内における分子間の相互作用の実体を明らかにすることは、今後の課題である。