

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 小田 賢幸

鞭毛は真核生物が持つ複雑な細胞小器官であり、細胞外に水流を生み出すことによって様々な生命現象に関わっている。そして、鞭毛が波打つ運動は ATP をエネルギー源とするモータータンパク質の鞭毛ダイニンによって引き起こされている。本研究では植物プランクトンであるクラミドモナスの鞭毛を用いて、ダイニンのモーター活性を構造生物学的に解析した。

1. 1979 年に Haimo et al.によって、ダイニンとチューブリン二量体を混合して重合させると二本の微小管がダイニンによって架橋された特殊な複合体を形成することが発表された。この複合体が捻れ構造を有している性質を利用して、クライオ電子顕微鏡による 3 次元像の再構成を行った。
2. SDS-PAGE によりダイニン-微小管複合体が外腕ダイニン複合体を構成するすべてのタンパク質を含んでいることを確認した。
3. 急速凍結ディープエッチング法により、ダイニン-微小管複合体のプラチナレプリカを作成し、電子顕微鏡によりダイニンの規則的な配列を観察した。ネガティブステイン法およびクライオ凍結法により、ダイニンが 24 nm 周期で並んでいることを観察した。
4. Total internal reflection fluorescence microscopy により、ATP 依存的に微小管がダイニン-微小管複合体の上を滑ることを観察した。これにより複合体のダイニン列がモーター活性を有していることが確認された。
5. 捻れ構造をもつ複合体の 2 次元投影像をクライオ電子顕微鏡で撮影した。それを断片化した上で、複合体の最大径から回転角を計算し逆投影法により 3 次元再構成を行った。
6.  $\alpha$  重鎖が欠損した変異株からダイニンを抽出し、同様にダイニン-微小管複合体の 3 次元再構成を行った。野生型の複合体の構造との比較により、3 種ある重鎖の並び順序が鞭毛内と同じであることが示された。
7. ヌクレオチド依存的なダイニンの構造変化を観察するために、ATP 加水分解サイクルをバナジン酸で停止させ、ADP+Pi 状態にあるダイニン-微小管複合体の 3 次元再構成を行った。

8. Apo 状態と ADP+Pi 状態の 3 次元再構成像の比較から、ヌクレオチド依存的に  $\beta$  重鎖のヘッドドメインが 3.4 nm の移動と  $44^\circ$  の傾斜を起こすことが観察された。
9. 従来支持されていた仮説ではダイニンのモーター活性は重鎖のヘッドドメインが回転することによるものとされていた。8 で述べた結果により、ヘッドドメインが微小管の長軸に対し垂直方向に移動することがダイニンのモーター活性に重要であることが分かった。

ダイニンはその大きな分子量と不安定な構造により、構造生物学的研究が困難であった。本研究によりダイニンが微小管に結合した生理的条件に近い状態で 3 次元構造変化を観察することができた。本研究は、ダイニンという脳神経から生殖に至るまで多くの生命現象に関わる重要なタンパク質の機能を理解する上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。