

論文内容の要旨

論文題目 **Studies on the composition and assembly of flagellar inner-arm dyneins**

(鞭毛内腕ダイニンの組成と構築に関する研究)

氏名 山本 遼介

真核生物の鞭毛・繊毛運動を司る軸糸は、9本の周辺微小管が2本の中心対微小管を取り囲む円筒状の精緻な構造を持ち、周辺微小管上の巨大タンパク質複合体であるダイニン腕の協調した力発生により、規則正しい屈曲波を作り出す。軸糸ダイニンは大きく外腕ダイニンと内腕ダイニンとに分けられる。単一の分子複合体である外腕ダイニンに関しては、これまでその組成や構築機構に関して多くの研究が行われてきた。しかし内腕ダイニンについては、鞭毛の波形調節などに重要な役割を担っているにも関わらず、その分子種の多さや単離の困難さのために、少数の研究しか行われてこなかった。軸糸ダイニンの研究が最も進んでいるモデル生物、クラミドモナスでは、単一種の外腕ダイニンと7種の主要な内腕ダイニン（分子種 a~g）が存在する。このうち分子種 f は重鎖を2本持つ双頭ダイニンであり、複数種の間鎖と軽鎖を持つ。残りの6つの分子種はいずれも単頭ダイニンで、そのサブユニットとしてアクチン、セントリン、p28 の3種のタンパク質が現在までに同定されている。鞭毛内に存在するこれらの複数の内腕ダイニン種がどのようにして細胞体内で構築され、どのようにして軸糸上で規則正しく配置され、またどのようにして機能し制御されているのかについては、多くのことが謎として残されている。

本研究では、クラミドモナスを用い、生化学的な解析と遺伝学的な解析により、内腕ダイニンの軸糸上、および細胞質内での構築に必要な因子を同定した。

現在までの外腕ダイニンの研究により、軽鎖がダイニンの軸糸周辺微小管上への配列に重要であることが示されている。これより、第一部から第三部では、内腕ダイニンが軸糸周辺微小管上の特定の位置に配列する機構を探るために、これまで未同定の内腕ダイニン軽鎖の探索を行った。その結果、3種の新規内腕ダイニン軽鎖（p44、p38、FAP120）を同定することに成功した。

第一部と第二部では、2種の新規軽鎖、p44 と p38 についての解析を行った。これら2つのタンパク質はいずれも内腕ダイニン分子種 d の新規軽鎖であった。BLAST 検索の結果、p44 と p38 は原生物からヒトにいたるまで、運動性の鞭毛・繊毛を持つ生物に広く保存されていることが判明した。しかし意外なことに、これら2種のタンパク質は、内腕ダイニン分子種 d を軸糸内に持たない変異株の軸糸内にも存在し、その軸糸内で複合体を形成していることが示された。このことは、p44 と p38 が、軸糸微小管上への内腕ダイニン分子種 d の「結合座」を形成している可能性を強く示唆している。

第三部では、新規軽鎖 FAP120 (Flagellar Associated Protein 120)の解析を行った。このタンパク質は内腕ダイニン分子種 f の新規軽鎖であった。興味深いことに、この新規軽鎖は、内腕ダイニン分子種 f の活性をリン酸化/脱リン酸化を受けることにより制御すると考えられている中間鎖である IC138 (138kD Intermediate Chain) と相互作用することが分かった。軸糸内での FAP120 の存在量は IC138 の存在量と相関を示す。このことは、内腕ダイニン分子種 f の活性が IC138 と FAP120 を含む大きなタンパク質複合体によって制御されている可能性を示唆している。同時に、これらの研究の過程で、クラミドモナス変異株のスクリーニングにより、それまで得られていなかった IC138 の完全欠損株を単離することに成功した。これらの変異株の解析により、意外なことに、内腕ダイニン分子種 f は IC138 を完全に欠損しても軸糸上に結合できることが初めて示された。

第四部では、内腕ダイニンの組成と構築についての更なる理解を得るために、新規のクラミドモナス内腕ダイニン変異株の単離を試みた。上記の新規内腕ダイニン軽鎖の抗体等を用いて、クラミドモナス変異株のスクリーニングを行った。その結果、軸糸内の特定の単頭内腕ダイニン分子種が大きく減少する新規内腕変異株(*ida10*)を単離し、その原因遺伝子を同定することに成功した。*ida10* の原因遺伝子がコードするタンパク質は、運動性の鞭毛・繊毛を持つ生物に広く保存されており、意外なことに、ダイニン形成因子として近年報告されている PF13/Ktu と類似の PIH ドメインを持っていた。PF13/Ktu はシャペロンの co-factor 様タンパク質で、鞭毛内に輸送される前の、外腕ダイニンの細胞質内での構築に必須であることが示されている。これより *ida10* の原因遺伝子産物も PF13/Ktu 同様、細胞質内での特定の内腕ダイニン分子種の構築に必要であることが予想される。実際に、単頭内腕ダイニンの軽鎖である p28 の存在量が *ida10* の細胞体内では大幅に減少しており、これは細胞体内でダイニン複合体を形成出来なかった p28 が選択的に分解された結果だと考えられる。また、*ida10* は単頭内腕ダイニン以外に、軸糸外腕ダイニンにも軽微な欠陥を持つこと

が分かった。これらの事実は、クラミドモナスでは、一定の冗長性はあるものの、細胞質内における内腕ダイニンと外腕ダイニンの構築に、PIH ドメインを持つシャペロンの co-factor 様タンパク質 2 種が使い分けられていることを示唆している。

BLAST 検索の結果、運動性の鞭毛・繊毛を持つ生物の多くに、PIH ドメインを持つタンパク質が 2 種類以上存在することが判明した。このことは、クラミドモナスだけでなく様々な生物の軸糸ダイニンの細胞質内での構築に PIH ドメインを持つ複数のタンパク質が関わり、ダイニンの種類ごとにそれらのタンパク質が使い分けられている可能性を示唆している。

以上、本研究では、鞭毛軸糸上での内腕ダイニンの構築に必要と考えられる新規軽鎖 2 種、活性制御に関与していると考えられる新規軽鎖 1 種、および細胞質内で内腕ダイニン構成タンパク質が集合するために必須と考えられるタンパク質 1 種を同定した。これらの内腕ダイニンに関係するタンパク質は、いずれも運動性の鞭毛・繊毛を持つ原生生物から高等動物にまで広く保存されていた。このことは、内腕ダイニンが鞭毛・繊毛運動において必須であり、その形成と機能の機構が不変であったことを示唆している。鞭毛・繊毛軸糸中では、本研究で扱ったような複数の内腕ダイニン分子種が巧妙に協調して機能している。各内腕ダイニン分子種がどのように軸糸上の特定の位置を認識して互いに規則正しく配列するのか、鞭毛・繊毛運動において分子種ごとにどのような使い分けがなされているのか、またそれら複数の分子種がどのように協調して働き、鞭毛・繊毛運動に寄与するのかは、今後の大きな課題である。