

# 論文審査の結果の要旨

氏名 河野 崇宏

真核生物の鞭毛・繊毛は原生動物からヒトにいたる広範な生物間で保存された細胞運動器官で、生物の運動や発生において重要な役割を果たしている。その内部には2本の中心対微小管を9本の周辺微小管が円筒状に囲んだ軸糸と呼ばれる構造があり、周辺微小管の上のダイニンが隣接する微小管間に対し局所的滑り運動を発生することによって屈曲波を発生する。規則正しい波動が生じるためにはダイニンの力発生が厳密に調節されている必要があるが、その調節ではスポークと呼ばれる構造が重要な役割を果たしていると考えられている。また、スポークの機能のためには先端部にあるスポークヘッドが重要と考えられるが、その構造については、5種のタンパク質からなるということのほかには、ほとんど何もわかっていない。本論文では、そのスポークヘッドにおける構成タンパク質間の相互作用を解析した研究結果が述べられている。

本論文は2部からなる。第1部では、クラミドモナスのスポークヘッド構成タンパク質5種 (RSP1, 4, 6, 9, 10) すべてを大腸菌内で組み換えタンパク質として発現し、そのうちの3種について、電気穿孔法を使った細胞内導入法によって生理的活性を検証した実験が記されている。現在存在する3種のスポークヘッドを欠いた非運動性突然変異株 (RSP4, 6, 9を欠失したもの) それぞれについて、細胞から細胞壁を除去してから各組み換えタンパク質溶液中で電気パルスをかけたところ、一定時間後に、一部の細胞が運動を開始することが認められた。すなわち、それらの組み換えタンパク質は、細胞内にとりこまれたあと、正常な機能を発揮することが確認された。これにより、作製した組み換え体のうちの少なくとも3種が正常な機能を持つことが確認され、電気穿孔法がそのような構造タンパク質の活性を検定する方法として有効であることが示された。

第2部では、組み換えタンパク質を用いて、スポークヘッド構成タンパク質間の相互作用を解析した研究の結果が記されている。ここでは、5種のスポークヘッド構成タンパク質に加えて、スポークヘッドと相互作用している可能性が考えられるスポーク本体のタンパク質3種 (RSP2, 5, 23) が用いられた。まず、最初の実験として、共沈実験が行われた。それら8種のタンパク質につき、それぞれのアミノ末端に2種の配列タグをつけた組み換えタンパク質を作製し、2つずつ混合した後に、片方のタグに結合するビーズで沈殿させた。その結果、64通りの組み合わせのうち、10の組み合わせで相互作用

が検出された。第2の実験として、化学架橋剤を用いて実際の軸系内のスポークヘッド中におけるタンパク質間の相互作用が調べられ、5つのタンパク質の組み合わせで相互作用が存在する可能性が示された。さらに、第3の実験として、作製した組み換えタンパク質を混合してスポークヘッドを再構成する試みが行われた。その結果、5種のスポークヘッド構成タンパク質のうち **RSP10** を除く4種のタンパク質が高次の複合体を形成することが明らかになった。密度勾配遠心法の解析によると、この複合体は鞭毛から抽出されたスポークヘッドに近い沈降係数を持っており、スポークヘッドの部分構造が再構成された可能性がある。これらの結果から、鞭毛・繊毛軸系のスポークヘッドについて、初めて構成タンパク質間の相互作用地図を描くことが可能になった。また、スポークヘッドとスポーク本体の結合部位に関しては、これまで **RSP5** が関与しているという報告があっただけであったが、本研究では **RSP5** は結合と無関係で、別の二つのタンパク質 (**RSP2, 23**) が関与していることを明瞭に示した。

以上のように、本研究では、これまで全生物を通じてまったく不明だったスポークヘッド構成タンパク質間相互作用の概要を明らかにし、スポークヘッドとスポーク本体の結合様式についても重要な情報を提供するものである。さらに、組み換えタンパク質からスポークヘッドの部分構造が再構成できる可能性を示したことは、将来の構造研究のために重要であると考えられる。

なお、本論文の主要部分は若林憲一、Dennis Diener、Joel Rosenbaum、神谷律との共同研究であるが、論文提出者が主体となっておこなったものであると判断する。したがって、河野崇宏に博士（理学）の学位を授与できると認める。