

## 論文内容の要旨

### 論文題目

**Studies on the regulation of flagellar motility by axonemal tubulin  
polyglutamylation**  
(軸糸チューブリン・ポリグルタミン酸化修飾による鞭毛運動調節の研究)

氏名 久保智広

### 序論

微小管細胞骨格を構成する $\alpha$ 、 $\beta$ チューブリンは各種翻訳後修飾を受け、細胞内機能に応じた多様性を獲得する。本研究で着目するチューブリン・ポリグルタミン酸化は、チューブリン C 末端付近のグルタミン酸残基にさまざまな長さのグルタミン酸側鎖が付加する修飾で、中心子、紡錘体、鞭毛軸糸等の微小管に多く分布することが知られる。2005 年に、ポリグルタミン酸化活性を持つ修飾酵素が同定され、それが Tubulin tyrosine ligase-like (TTLL) protein family に属する複数の蛋白質であることが明らかになった。一方、ポリグルタミン酸化修飾は鞭毛軸糸の運動において周辺微小管と軸糸ダイニン間の相互作用に重要であることが示唆されてきたが、この修飾によって鞭毛運動全体がどのように影響を受けているのかを詳しく検討した研究はなかった。

本研究では、以前、我々の研究室で単離された軸糸チューブリン・ポリグルタミン酸化修飾に異常を持つクラミドモナス変異株 *tpg1* と *tpg2* を解析した。これまでの遺伝解析の結果から *tpg1* はポリグルタミン酸化酵素の一種 TTLL9 と相同な蛋白質 FAP267 をコード

する遺伝子に変異を持つことが分かっていた。*tpg2*の原因遺伝子は分かっていたが、本研究では機能未知の鞭毛蛋白質 FAP234 をコードする遺伝子に変異を持つことを明らかにした。*tpg1*、*tpg2*ともに軸系のポリグルタミン酸化チューブリンが減少し、そのことが原因で類似の鞭毛運動異常を示す。本研究ではさらに、*tpg1*と各種軸系ダイニン欠損株の二重変異株の運動性を解析することによって、チューブリン・ポリグルタミン酸化修飾が特定の内腕ダイニン一種の機能調節に特に重要であることを明らかにした。また、生化学的解析から、*tpg2*の原因遺伝子産物 FAP234 が TTLL9 と相互作用し、TTLL9 を鞭毛内へ局在させるために重要であることを明らかにした。*tpg1*を用いた実験結果を第一部と第二部で、*tpg2*を用いた実験結果を第三部で述べる。

## 第一部

以前の研究から、*tpg1*は哺乳類ポリグルタミン酸化酵素の一種 TTLL9 と相同な鞭毛蛋白質 FAP267 をコードする遺伝子に変異を持つことが明らかにされていた。生化学的解析、及び電子顕微鏡による解析の結果、*tpg1*軸系では周辺微小管 B 小管に特異的なポリグルタミン酸化修飾が減少しており、そのため軽微な鞭毛運動異常を持つことが明らかになった。興味深いことに、*tpg1*と外腕ダイニン完全欠損株 *oda2*の二重変異株は運動性を完全に失う。このことは、ポリグルタミン酸化修飾が特に内腕ダイニンの機能に重要であることを示している。

さらに、解体軸系中における軸系微小管滑り速度を比較したところ、驚くべきことに *oda2tpg1* 軸系の方が *oda2* 軸系よりも 2~3 倍程度速いことが明らかになった。この結果から、ポリグルタミン酸化修飾は、微小管と内腕ダイニン間の静電相互作用を増大して、軸系滑り運動の滑り速度を抑制する効果を持つことが示唆された。

## 第二部

第二部では、ポリグルタミン酸化修飾がどの内腕ダイニンの機能に重要であることを明らかにするため、各種内腕ダイニン欠損株と *tpg1*の二重変異株を作成し、ポリグルタミン酸化修飾の鞭毛運動性への影響を比較した。クラミドモナスは主要な内腕ダイニン分子種を 7 種持つ。それらのさまざまな分子種を欠損した変異株と *tpg1*を掛け合わせた二重変異株の

運動性を解析した結果、多くの変異株の運動性は *tpg1* 変異が共存すると大きく低下したが、内腕ダイニン e を欠損した変異株 *ida5*、*ida6*、*pf3* だけは *tpg1* 変異の影響をあまり受けないことが判明した。このことは、ポリグルタミン酸化修飾が、ダイニン e の活性に特に重要であることを示している。いろいろなダイニンのストークヘッド（微小管結合部位）のアミノ酸配列の等電点を比較したところ、興味深いことにダイニン e のストークヘッドは他の軸系ダイニン中、最も塩基性であった。したがって、ポリグルタミン酸化された微小管とダイニン e の間の静電相互作用が鞭毛運動全体に大きな影響を与えていることが示唆された。

一方、ダイニン e はダイニン内腕の活性を制御すると考えられている複合体 Dynein Regulatory Complex (DRC) と直接相互作用することが示唆されている。ダイニン e と DRC の機能的関係はまだよくわかっていないが、ポリグルタミン酸化修飾によって、DRC の機能がダイニン e を介して影響を受ける可能性が考えられる。

### 第三部

第三部では、新規に同定した *tpg2* というチューブリン・ポリグルタミン酸化修飾変異株の解析を行った。*tpg2* は、*tpg1* と類似の鞭毛運動異常を持つが、変異遺伝子座は異なる。遺伝子解析の結果、*tpg2* は FAP234 という機能未知の鞭毛蛋白質をコードする遺伝子に変異を持つことが明らかになった。生化学的な解析によって、*tpg2* 軸系は FAP234 に加えて TTLL9 を欠失していることが明らかになった。同様に、*tpg1* 軸系は TTLL9 に加えて FAP234 を欠失していた。したがって、TTLL9 と FAP234 は相互依存的に軸系に局在することが示唆される。また、免疫沈降法とショ糖密度勾配遠心法の解析結果から、TTLL9 と FAP234 は軸系中で 1:1 の複合体を形成することが明らかになった。

### 考察

本研究では、鞭毛運動においてポリグルタミン酸化修飾が静電相互作用によって特定の内腕ダイニン一種に大きな影響を与えるという予想外の結果を得た。鞭毛・繊毛の屈曲運動が生じるのは、周辺微小管同士の滑りの量が長さ方向に不均一であり、かつ中心対微小管の両側における滑りの方向が周期的に交互に切り替わることによる。この切り替えには

軸系の力学的状態が関わっていると考えられている。本研究の実験結果から想定される可能性として、ダイニン e とポリグルタミン酸化された軸系微小管間の強い静電相互作用は、鞭毛打サイクルの中で、(1) 隣接した二本の微小管同士の距離を縮めることによって他のダイニンと微小管を相互作用しやすくさせたり、(2) 隣接した微小管間の滑りの抑制を行うことによって屈曲を生じさせたり、あるいはさらに、(3) 屈曲の発生によって滑りの切り替えを誘導したり、などの重要な役割を持つことが考えられる。

一方、ダイニン e を欠失している変異株と、それ以外の内腕ダイニンを欠失した変異株の運動性の比較から、ダイニン e が修飾異常を持つ軸系に対して積極的に運動性低下をもたらすという興味深い結果が得られた。そのような結果になる原因として、ポリグルタミン酸側鎖が減少すると、強い塩基性のダイニン e ストックヘッドが微小管の本来とは異なる領域と相互作用してしまうことが考えられる。このようなダイニン e の「非特異的な」結合が、微小管の滑り運動の調節に異常をもたらしている可能性がある。

これらの仮説の検証は、今後の課題である。in vivo、in vitro におけるダイニン e の運動性がチューブリン・ポリグルタミン酸化によってどのように影響され、それが他のダイニンの場合とどのように異なるかを検定する実験が必要であろう。

本研究ではさらに、ポリグルタミン酸化修飾酵素 TTLL9 と 1:1 の複合体を形成する新規の軸系蛋白質 FAP234 を同定した。鞭毛・繊毛に局在する TTLL 酵素の相互作用相手が見つかったのはこれが初めてである。本研究では、しかし、FAP234 の機能を解明するには至らなかった。その機能の解明は今後の大きな課題である。FAP234 の機能として、(1) 鞭毛内輸送系の蛋白質と相互作用して TTLL9 の輸送においてアダプター蛋白質として機能する、(2) TTLL9 が微小管上に局在する際の足場蛋白質として機能する、(3) TTLL9 の立体構造を変化させて酵素活性を調節する、などの可能性が考えられる。今後は、FAP234 と TTLL9 の電子顕微鏡レベルの局在観察、鞭毛内に輸送される機構、および、FAP234 が TTLL9 の酵素活性に及ぼす影響を調べるのが重要である。これらの研究のためには、新しい実験系を開発することが必要であるが、全ての蛋白質の遺伝子と、それらを欠失している変異株が得られているので、近い将来、さらに実験が行われ、ポリグルタミン酸化修飾の機構とその生理的意義について重要な新知見が得られることが期待される。