

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 生島 智樹

本論文は、精子内で  $\text{Ca}^{2+}$  依存的にダイニンと相互作用することで鞭毛運動の制御を担うタンパク質、カラクシンの構造および機能の制御機構の解析について述べたものである。本論文は、第一章の「序論」、第二章の「マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造」、第三章の「溶液中におけるカラクシンの構造変化の解析」、第四章の「総合討論」からなる。

第一章の「序論」では、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的な精子の鞭毛運動制御とカラクシンの機能に関する従来知見、さらに、カラクシンの構造変化と機能の制御機構を解明するという本研究の目的が述べられている。

第二章の「マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造」では、 $\text{Mg}^{2+}$  結合型のカラクシンの立体構造解析について述べられている。X 線結晶構造解析法により  $\text{Mg}^{2+}$  結合型のカラクシンの結晶構造が 2.6 Å 分解能で決定された。非対称単位中に open state と closed state の 2 分子が存在していた。 $\text{Mg}^{2+}$  結合型の構造は  $\text{Ca}^{2+}$  結合型の構造と類似していた。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  結合モチーフ(EF0-EF3)のうち、 $\text{Ca}^{2+}$  は open state と closed state の EF1、EF2、EF3 に結合していたのに対し、 $\text{Mg}^{2+}$  は closed state の EF3 には結合しておらず、 $\text{Mg}^{2+}$  結合型では closed state の構造をとりにくいことが示唆された。また、等温滴定型熱量測定により、カラクシンは  $\text{Mg}^{2+}$  よりも  $\text{Ca}^{2+}$  との親和性が強く、また  $\text{Mg}^{2+}$  存在下では  $\text{Ca}^{2+}$  との親和性が上昇することが示された。さらに、カラクシン分子の疎水性表面の一部が C 末端ヘリックス( $\alpha 11$ )と疎水性相互作用を形成していたことに基づいて、野生型と  $\alpha 11$  欠失変異体の熱安定性測定が行われた。その結果、 $\alpha 11$  の欠失によって変性温度が低下したことから、 $\alpha 11$  と疎水性表面との相互作用が熱安定性の向上に寄与していることが示された。

第三章の「溶液中におけるカラクシンの構造変化の解析」では、結晶構造では見られなかった  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  の結合によるカラクシンの構造変化について、溶液における解析が行われた。初めに、X 線小角散乱法により、 $\text{Mg}^{2+}$  結合型は open state と同じ構造をとるが、 $\text{Ca}^{2+}$  結合型では構造が closed state 寄りに遷移することが明らかになった。また、タンパク質の疎水性表面に結合して蛍光を示

す 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS)を用いた蛍光測定によって、 $Mg^{2+}$ 結合型と比べて  $Ca^{2+}$ 結合型では 1,8-ANS 結合時の蛍光強度が低下したことから、 $Ca^{2+}$ 結合によってカラクシンの疎水性表面の面積が減少することが示された。さらに、EF1、EF2、EF3 に Trp 残基を導入し、 $Mg^{2+}$ 結合型と  $Ca^{2+}$ 結合型の Trp 蛍光スペクトルの比較を行った結果、 $Mg^{2+}$ 結合型と比べて、 $Ca^{2+}$ 結合型では EF2 と EF3 に導入した Trp 蛍光スペクトルのピークトップが長波長側にシフトした。Trp 蛍光においては Trp 残基が疎水的環境に移動することでピークトップが長波長側にシフトするため、 $Ca^{2+}$ 結合によってカラクシンの構造が **closed state** 寄りに遷移することで、EF2 と EF3 に導入した Trp 残基が分子内部の疎水性環境に移動し、分子表面の疎水性ポケットが縮小したことが示された。

第四章の「総合討論」では、本研究の結果の総括と、カラクシンによる  $Ca^{2+}$  依存的な鞭毛運動制御機構の予測について述べられている。カラクシンと同じファミリーのタンパク質において、同様な疎水性ポケットに相互作用パートナーが結合することが報告されていることから、カラクシンにおいても疎水性ポケットがダイニンとの相互作用に関与し、 $Ca^{2+}$ 結合による疎水性ポケットの縮小によりダイニンとの結合力が上昇すると予想された。本研究は、結晶構造解析では明らかにできなかった  $Ca^{2+}$ 結合型と  $Mg^{2+}$ 結合型のカラクシンの構造の違いを溶液中における各種解析によって明らかにするといった、多角的な視点による高次構造およびその変化の解析が行われ、構造生物学分野において非常に価値の高い研究であると評価できる。本研究で用いられたカラクシンはカタユウレイボヤ由来のものであるが、ヒトにおいてもカラクシンとアミノ酸配列の類似したホモログが保存されていることから、本研究で得られた成果は精子の運動能の低下による不妊症の原因解明や、特異性の高い避妊薬の開発などに適用可能と期待される。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。