

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 市川 宗厳

真核細胞では、細胞内物質輸送や細胞分裂、鞭毛・繊毛運動などを効率的に行うために、細胞運動の機構が発達している。それらを担う細胞骨格とモータータンパク質の相互作用の機構とその制御機構については、これまでに多くの研究結果が蓄積されてきたが、モータータンパク質の1つであるダイニンについては、その巨大で複雑な分子構造の故に分子レベルでの理解が遅れていた。申請者の市川宗厳氏は、博士論文「ダイニン複合体のサブユニット分子構築の研究」において、ダイニンの発現系を開発・確立し、それを利用してダイニンの分子構造を明らかにし、ダイニンの運動機構とその制御機構についての基盤となる知見を見出した。

本論文の第1章では、軸糸ダイニンの発現系を繊毛虫テトラヒメナにおいて確立し、軸糸ダイニン複合体内での軽鎖 LC1 の局在と機能についての研究を行った。軸糸に存在する外腕ダイニンは、3種類の重鎖、2種類の間鎖、多数の軽鎖から構成される分子量 200 万に及ぶ巨大タンパク質複合体である。各重鎖はそれぞれ頭部ドメインと尾部ドメインをもち、3つの頭部が尾部で束ねられた三頭構造をとる。中間鎖と軽鎖の多くは尾部に局在することが知られていたが、軽鎖 LC1 は頭部ドメインに局在することが示唆されていたが、頭部のどこに局在するのか明らかでなかった。市川氏は、外腕ダイニン複合体内での軽鎖 LC1 の位置を決めるために、軽鎖 LC1 に His タグを融合させたタンパク質を、相同組み換えによりテトラヒメナに発現させ、繊毛に局在することを確認した後、組み換えタンパク質を精製し、さらに His タグをそのリガンドである Ni-NTA を結合させた金ナノ粒子で標識し、電子顕微鏡観察を行った。その結果、LC1 は外腕ダイニン複合体中の特定の外腕頭部のストークの先端の微小管結合領域に結合することを明らかにした。さらに、その結合性をストークのキメラタンパク質を用いて調べ、LC1 は微小管結合領域のみで十分に結合すること、LC1 が結合すると微小管に対する親和性が低下すること、などを明らかにした。軽鎖 LC1 は真核細胞の繊毛・鞭毛に普遍的に存在し、この変異体はヒトの繊毛病や繊毛形成異常を引き起こすことなどが知られていたが、原因は明らかでなかった。市川氏の新たな知見は、LC1 が外腕ダイニンの微小管との相互作用を直接コントロールすることを強く示唆するものであり、繊毛運動の機構解明に大きな光明を与えるものである。

本論文の第2章において、市川氏はヒト細胞質ダイニン重鎖の全長をヒト培養細胞 (HEK) において組換え体として発現・精製する系を世界で初めて確立した。細胞質ダイニンには、細

胞質で働くダイニン 1 と繊毛・鞭毛内の物質輸送に関わるダイニン 2 が存在するが、ダイニン 2 については、その分子構造や運動性については不明であった。市川氏は、ダイニン 2 重鎖にタグを付けて発現精製し、電子顕微鏡観察によりダイニン 2 が双頭構造をとることを明らかにし、*in vitro* において運動性を確認し、微小管のマイナス端方向へ運動するモーター分子であることを示した。さらに、市川氏は、細胞質ダイニン 1 の中間鎖、中間軽鎖、軽鎖の N 末端あるいは C 末端にタグを導入したダイニン 1 複合体を得て、それらの尾部上の位置を決定した。その結果は、中間鎖は尾部のほぼ全長に渡って存在するが、その向きは従来から想定されてきたものとは逆で、C 末端が尾部の先端に位置するものであった。中間鎖の C 末端部分は WD リピートを形成し、他のダイニン結合タンパク質と相互作用する部位であること、また N 末端はダイニン機能に促進作用をもたらすとされるダイナクチンの結合部位であること、などを考え合わせると、市川氏のダイニン 1 尾部の分子構築についての新たな発見は、ダイニンの制御機構についてのこれまでの知見を大きく塗り替えるものである。

以上のように、本論文では、細胞質ダイニンと軸糸ダイニンの両者についてそれぞれ発現系を確立し、組み換え体タンパク質を得て、その分子構築を明らかにし、ダイニンの機能と制御に関する新たな知見を示した。申請者の市川氏は、本論文の一部を第一執筆者の論文として既に公表している。これらの理由により、本審査委員会は、博士（学術）を授与するにふさわしいものと認定する。