

論文審査の結果の要旨

氏名 山口 博史

脊椎動物の繊毛・鞭毛運動は多くの器官で正常発生と生体維持に重要な役割を果たしている。繊毛運動を駆動する軸系ダイニンには8種類のサブタイプ、OAD (outer arm dynein; 外腕ダイニン) と、a から g までの7種類の IAD (inner arm dynein; 内腕ダイニン) が存在する。それぞれの軸系ダイニンは複数のサブユニットから成る巨大な複合体であり、繊毛・鞭毛の構築に際してこれらの複合体はまず細胞質中で合成され、その後繊毛内へ輸送される。近年、この細胞質中での組み立てには DNAAF (dynein axonemal assembly factor) と呼ばれる因子が必要であることが分かった。しかし、異なる軸系ダイニンサブタイプの複合体形成プロセスや機能については、未だ知見が不足している。そこで論文提出者は、軸系ダイニンの複合体形成に関与が報告されている PIH タンパク質ファミリーについて、軸系ダイニンサブタイプとの対応関係に着目しながらゼブラフィッシュを用いて包括的な機能解析を行った。

本論文は2章で構成されている。第1章では、ゼブラフィッシュ変異体の精子の解析から、各 PIH タンパク質と軸系ダイニンサブタイプとの対応関係を明らかにした。ゼブラフィッシュは4種類の PIH タンパク質遺伝子 (*pih1d1*, *pih1d2*, *ktu*, *twister*) を持つ。ゲノム編集技術によって、各 PIH タンパク質を欠損したゼブラフィッシュ変異体を作製し、精子の運動性を観察した。*pih1d1* 変異体では鞭毛打頻度の低下、*twister* 変異体では運動性の喪失が観察された。一方、*pih1d2* 変異体と *ktu* 変異体の精子は野生型と同等の運動性を示した。そこで、これらの遺伝子間の補償機能を疑い、*pih1d2;ktu* 二重変異体を作製した。*pih1d2;ktu* 二重変異体では精子鞭毛の後方部分は運動性を失っていたが、前方部分では鞭毛打頻度が増加していた。したがって、4種類すべての PIH タンパク質遺伝子が精子の正常な運動に必要であることが判明した。また、各変異体の精子は異なるタイプの運動異常を示しており、PIH タンパク質が精子運動に対してそれぞれ異なる機能を持つことが示唆された。

次に、cryo-ET (cryo-electron tomography; 低温電子断層撮影法) をゼブラフィッシュ精子に適用し、鞭毛の詳細な構造解析を行った。その結果、*pih1d1* 変異体では IAD c の欠損と Dnai1(OAD サブユニット)の異常が観察された。また、*pih1d2* 変異体では Dnai1 の異常が観察され、*ktu* 変異体では IAD c の欠損が観察された。*twister* 変異体では OAD, IAD c, d, g の欠損が観察された。*pih1d2;ktu* 二重変異体では、運動性を失っていた後方部分

で、OAD, IAD b, c, e の欠損が観察された。したがって、すべての PIH タンパク質が軸系ダイニンの複合体形成に必要であり、それぞれ異なる軸系ダイニンの形成に関与することが明らかになった。

第2章では、変異体表現型の比較と軸系ダイニン遺伝子の発現解析から、軸系ダイニンの組成が器官で異なることを明らかにした。魚類クッペル胞は哺乳類のノードの相同器官であり、繊毛の回転運動が生み出す水流が胚の左右軸を決定する。変異体のクッペル胞繊毛の運動性を観察し、精子と比較したところ、*pih1d2* 変異体と *ktu* 変異体では、精子の運動は正常なのに対し、クッペル胞繊毛は運動異常を示した。また、DNAH (dynein axonemal heavy chain; 軸系ダイニン重鎖) 遺伝子の発現解析を行ったところ、*dnah8* (OAD サブユニット) と *dnah3* (IAD サブユニット) が精巣で特異的に発現する一方で、*dnah11* (OAD サブユニット) はクッペル胞で特異的に発現していた。したがって、*pih1d2* 変異体と *ktu* 変異体のクッペル胞特異的な繊毛運動異常は、器官特異的な軸系ダイニンの組成を反映している可能性が考えられた。

本研究から、脊椎動物の4種類すべての PIH タンパク質 (既知の KTU/DNAAF2, TWISTER/PIH1D3 だけでなく、PIH1D1, PIH1D2 も含む) が、それぞれ異なる軸系ダイニンの構築に必要であることが明らかになった。特に OAD, IAD c は複合体形成にすべての PIH タンパク質を必要とする複雑なプロセスを持つことが示唆された。一方、IAD a, f は本研究のいずれの変異体でも欠損せず、PIH タンパク質と独立した複合体形成を行うか、複数の PIH タンパク質によって複合体形成が補償されている可能性が考えられた。また、本研究から精子とクッペル胞繊毛で異なる軸系ダイニンの組成が明らかになった。繊毛・鞭毛は器官で異なる運動パターンを示すため、器官特異的な軸系ダイニン組成はこれと何らかの関係を持つ可能性が考えられた。また、cryo-ET を脊椎動物精子に適用したのは、本研究が初めてとなる。これまで脊椎動物の繊毛・鞭毛でゲノム編集と cryo-ET による詳細な構造解析を組み合わせた解析は行われていなかったため、今後はゼブラフィッシュの精子が新たな脊椎動物の繊毛・鞭毛モデルになることが期待される。

なお、本論文は小田賢幸 (山梨大学)、吉川雅英 (東京大学)、武田洋幸 (東京大学) との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究戦略の設定、実験、考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。従って、博士(理学)の学位を授与できると認める。