

論文の内容の要旨

論文題目 軸糸外腕ダイニンに駆動される
繊毛打の三次元運動に関する研究

氏名 山 口 真

[序論]

繊毛は真核生物で広く保存されている精巧な分子機械である。これは細胞表面にある突起状の器官であり、周期的に運動することで細胞の遊泳や細胞外の水流の発生など様々な生体機能を担っている。この運動は繊毛内部に存在するモータータンパク質である軸糸ダイニンによって駆動されていることが知られている。

この繊毛運動は生物種や細胞の機能によって多様性を示すが、良く保存された内部構造からそのような多様な運動が駆動される機構については未だ明らかになっていない。また、特に三次元的な波形を持つ繊毛運動においては、運動速度が速いことと三次元的な計測の難しさから、正確な波形を得ることが出来ていない。

繊毛を駆動する運動素子である軸糸ダイニンについても、その運動機構や機能については十分に解明されていない。繊毛運動を駆動する軸糸ダイニンは10種以上もあり、これらが繊毛内部のダブルレット微小管上に96 nmの周期で規則的に配置している。これらは内腕ダイニンと外腕ダイニンに大別され、それぞれを欠損した変異体での研究から、外腕ダイニンが繊毛打頻度の上昇に、内腕ダイニンが繊毛打波形の調節に機能していると考えられているものの、それぞれの軸糸ダイニンの運動特性がどの様に繊毛打運動の駆動に関与しているのかはわかっていない。

軸系ダイニンが繊毛打運動をどのように駆動しているのか明らかにするためには、運動素子としての軸系ダイニンの運動と、繊毛打運動という階層の異なる運動を両面から考える必要がある。そこで本研究では、繊毛を体表に持つ単細胞生物、テトラヒメナと、近年開発された三次元位置検出顕微鏡技術を用いて、軸系ダイニン的一种である外腕ダイニンの運動と繊毛の運動のそれぞれを定量することで、ダイニンが繊毛打運動を駆動する機構について明らかにすることを旨とした。

[第一章 繊毛を駆動する外腕ダイニンの三次元的な運動の解明]

第一章では、テトラヒメナから単離精製した外腕ダイニンの運動特性について調べた。ダイニンは ATP を加水分解して構造変化し、微小管との結合解離を繰り返してその長軸マイナス端方向に運動する分子モータータンパク質であり、運動機能を持つ巨大な重鎖と、軽鎖や中間鎖などのタンパク質との複合体を形成している。またダイニン重鎖は ATP を加水分解する頭部ドメインと、他のタンパク質との複合体化やダイニン同士の二量体化もしくは三量体化に関わる尾部ドメインからなる。外腕ダイニンはこの α 、 β 、 γ の三つの重鎖が三量体化したヘテロ三量体構造である。しかしながら、微小管の長軸方向への運動について調べられている先行研究では、この三つの頭部が協同して運動するのか、またそれぞれの頭部の運動特性にどのような違いがあるのかについては明らかになっていなかった。

近年ダイニンを含む微小管結合モータータンパク質では微小管の長軸方向のみならず長軸に並行な方向への力、トルクの発生も報告された。しかし外腕ダイニンがそのような運動特性を持つのかについては正確に調べられていなかった。

本研究では、三次元位置検出光学系を用いてダイニンによる微小管の運動を三次元的に計測することで、この外腕ダイニンによる微小管の長軸に並行な方向への運動特性を調べた。また、キモトリプシンによって三頭構造を持つ外腕ダイニンを単頭の α サブユニットと二頭の $\beta\gamma$ サブユニットに分離、精製する手法を用いて、三頭の外腕ダイニンのそれぞれの頭部についてこれを調べることで、頭部ごとの運動特性の違いを明らかにすることを旨とした。

結果、ガラス面上に結合した外腕ダイニンが微小管を長軸方向に滑らせる際に、微小管がらせん上に回転しながら運動するコークスクリュウ運動をすることが明らかとなった。このような運動は軸系内腕ダイニンにおいては報告されていたものの、外腕ダイニンについては初めての結果である。加えてコークスクリュウ運動と同様にダイニンのトルク発生に起因すると考えられる現象として、滑り運動する微小管が一定方向に曲がって運動方向を変えることが観察された。

また三頭の外腕ダイニンのみならず、それぞれのサブユニットでも同様のコークスクリュウ運動が見られたことから、このような運動は三頭構造によるものではなく、軸系ダイニンの各頭部が持つ運動特性によるものだと考えられる。

次にそれぞれの頭部の運動特性を調べるため、ATP 濃度が異なる条件で同様の計測を行ったところ、二頭の $\beta\gamma$ サブユニットではコークスクリュウ運動の回転のピッチ(1 回転あたりに微小

管が滑り運動する距離)の変動は見られなかったものの、三頭の外腕ダイニンと単頭の α サブユニットについては回転のピッチが低 ATP 濃度で増加する性質が見られた。 α 頭部を含むダイニンでのみこの運動が見られたことから、三つの頭部の中で α 頭部のみが異なる運動特性を持つと考えられる。

また、この運動についてガラス面上に α 、 $\beta\gamma$ サブユニットが共存する条件での運動は、それぞれ α 頭部と $\beta\gamma$ 頭部が単独で存在する条件の運動の単純な平均とならなかったことから、 α 頭部が $\beta\gamma$ 頭部より強く微小管に結合し、この負荷が低 ATP 濃度でのピッチの増加に寄与している可能性が示唆された。

外腕ダイニンによる微小管の運動の三次元計測から、外腕ダイニン及びそのサブユニットがトルク発生する性質を持つこと、各頭部の運動特性が異なることが示された。今まで十分に調べられていなかったこのような微小管長軸に並行な方向への力発生が、繊毛運動に重要な寄与を果たしている可能性がある。

[第二章 三次元計測によるテトラヒメナ繊毛打メカニズムの解明]

第二章では、ダイニンに駆動される繊毛がどのように運動しているのか、またその運動に多種のダイニンがどのように寄与しているのかについて、研究を行った。

一部の軸糸ダイニンを欠損した変異体での繊毛運動の計測を行えば、繊毛打運動を駆動する多種の軸糸ダイニンについてそれぞれの繊毛打運動への寄与を知ることができると考えられる。しかしながら、繊毛運動モデル生物であるクラミドモナスは、多数の繊毛に関わるタンパク質を欠損する変異株が確立されているため繊毛運動の計測において一般的に用いられているものの、相同組換えによって内在性の遺伝子に任意の変異を加える手法が確立されていない。本研究では相同組換えの技術が確立されているテトラヒメナを用いることで、一部のダイニンを欠損する変異体を作製することで、ダイニンのどのような運動特性が繊毛運動に寄与しているか調べることができると考えた。

作製する変異体として外腕ダイニンの β 重鎖の遺伝子に対し、ダイニンが微小管と相互作用するストーク部位もしくは頭部ドメイン全体を欠損し EGFP に置換することで β 頭部の機能を欠損した変異体、及びコントロールとして β 重鎖の C 末端に EGFP を付加した変異体を設計した。これらの配列と薬剤耐性遺伝子、及びその前後に相同組換え部位との相同配列を持つ DNA 断片を PCR 及びベクターによって作製した。

この DNA 断片のテトラヒメナへの導入は、金粒子に付加して遺伝子銃でテトラヒメナに打ち込む方法により行った。この方法では、テトラヒメナが持つ大核に目的遺伝子が相同組換えされる。テトラヒメナは大核に同遺伝子を 45 コピー持つため、薬剤濃度を徐々に上げながら植継ぎ、変異を含む遺伝子の比率を増やすアソートメントを行った。この操作は、テトラヒメナが無性生殖の際に大核のゲノムのみがタンパク発現に用いられていること、また大核の多コピーあるゲノムが分裂の際に不等分配されることを利用して、より薬剤耐性の高い、組換え配列を多コピー持った株を選別する操作である。

これにより、運動に影響しないコントロールとして設計した、 β 重鎖の C 末端に EGFP が融合した変異株を得ることが出来た。この株では、繊毛に一樣に GFP の蛍光が見られたことから、融合した変異タンパク質は正しく繊毛内に組み込まれていると考えられる。

しかしながら、ダイニンのストークもしくは頭部全体を置換して β 頭部の機能を失わせた変異体では、繊毛に EGFP の局在の見られる変異株を得ることができなかった。この原因としては、頭部の欠損部位が適切でなかったことなどが原因でダイニンのフォールディングが上手く行かなかったこと、ダイニンの欠損がテトラヒメナの増殖に悪影響となっていたことなどが考えられる。一部のダイニンの機能を欠損した変異体は得られなかったため、以降の繊毛運動の計測には野生型の細胞を用いた。

次に、テトラヒメナにおいて 1 繊毛の繊毛打運動を三次元的に計測する実験系の構築を行った。従来、テトラヒメナなどの繊毛虫では、体表上に多数の繊毛が存在することや、繊毛打運動が三次元的な波形を示すことから、二次元の投影像での正確な繊毛運動の計測は困難だった。そこで本研究では、テトラヒメナの細胞表面をビオチン修飾し、アビジン修飾した蛍光ビーズを標識として結合させることで、1 繊毛の運動の可視化を行った。このテトラヒメナをマイクロピペット先端に陰圧により補足して固定することで繊毛打運動の計測を行った。また、第一章で用いたものと同じ原理の三次元位置検出光学系を用い、繊毛打運動の三次元計測を行い、テトラヒメナの繊毛打運動の三次元的な波形を明らかにすることを目指した。

結果、アビジン修飾した蛍光ビーズはビオチン修飾したテトラヒメナの繊毛先端に結合し、このビーズが周期的に楕円様の軌道で運動することが明らかとなった。この先端の運動は、パラメシウムなどでの観察で間接的に推定されていた 2 つの弧の組み合わせで構成されるような非平面的な波形とは異なり、平面上の楕円運動となっていた。また、この回転の位相に応じて、繊毛運動の速度が変化することが観察された。細胞の向きや明視野観察による繊毛の波形と合わせて考えると、この繊毛打運動は細胞が遊泳する方向に水流を発生させる有効打では、細胞から離れた位置を繊毛は伸びた波形で速く運動し、逆向きの回復打では細胞面に近い位置を繊毛が屈曲しながら遅く運動することがわかった。

[総括]

本研究では繊毛打運動を駆動する軸糸ダイニンの運動及びテトラヒメナの 1 繊毛の繊毛打運動について、三次元位置検出光学系を組み込んだ新たな実験系を構築することで、従来では計測できなかった三次元的な運動を明らかにすることができた。

現時点では本研究で見られた外腕ダイニンの運動素子としての特性と、三次元的な繊毛打波形が実際にどの様に関係しているかはまだ明らかではないものの、繊毛打運動の駆動メカニズムを考える上で重要な知見が得られたと考えられる。今後軸糸ダイニンの一部を欠損した変異体での繊毛打運動の計測を行うことで、個々の軸糸ダイニンの特性と繊毛打運動について明らかになることが期待される。