

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on protein interactions required for the outer arm dynein assembly
on the axonemal microtubule in *Chlamydomonas*

(外腕ダイニンのクラミドモナス軸糸微小管上への構築に必要な蛋白質間相互作用の研究)

氏名 井手 隆広

真核生物の鞭毛・繊毛は、細胞の運動や細胞表面の水流の発生・検知など、多くの生命現象に関わる重要な機能を持つ。内部には原生生物から高等動物まで高く保存された軸糸構造を持つ。この構造は、運動性鞭毛・繊毛の場合、2本の中心対微小管の周りを9本の周辺微小管が囲む「9+2」と呼ばれるパターンを示す。周辺微小管上にはモータータンパク質である軸糸ダイニンが周期的に結合しており、これらが隣り合う微小管との間で「滑り」を生じ、それが鞭毛の屈曲運動に変換される。

軸糸ダイニンは周辺微小管上の結合位置によって外腕ダイニンと内腕ダイニンに分けられる。外腕ダイニンは、軸糸ダイニン中で最も分子数が多く、鞭毛運動の原動力の約7割を発生する。3つの重鎖、2つの中間鎖、10種の軽鎖からなる巨大な複合体で、それが周辺微小管上の特定の位置に24 nmの周期で結合している。この規則的配置が鞭毛運動における波動の伝播に重要だと考えられているが、その構築機構の詳細は十分に解明されていない。クラミドモナスのミュータントを用いたこれまでの研究から、外腕ダイニン複合体は細胞質中でシャペロン様蛋白質の補助を受けて構築され、鞭毛内に輸送されたのち、外腕ダイニンドッキング複合体(ODA-DC)と相互作用して微小管に結合することが明らかにされている。ODA-DCは、3つのサブユニット DC1,

DC2, DC3 からなる複合体で、このうち、ダイニンの微小管上への配置には DC1, DC2 が重要で、DC3 は必須ではないことがわかっている。

外腕ダイニンが微小管上に配置する際には、外腕ダイニン分子の基部（微小管に近接する位置）に存在する軽鎖 LC7b が DC2 と相互作用する。一方で、ダイニン中間鎖 IC1 が微小管と直接相互作用することも明らかになっている。外腕ダイニン分子には、もう 1 つの中間鎖 IC2 が含まれている。構造のよく似た両者は、外腕ダイニン基部の主要コンポーネントとして ODA-DC と近接した位置に存在することがわかっている。電子顕微鏡観察によるこれらの位置情報と、いくつかの生化学的な解析から、IC1 と IC2、およびこれらの中間鎖と ODA-DC が相互作用する可能性が指摘されているが、いずれもまだ検証されていない。外腕ダイニン基部に存在するタンパク質間の相互作用は、外腕ダイニンの規則的な配置機構を理解するうえで極めて重要だと考えられる。そこで本研究では、外腕ダイニンの微小管結合機構の全貌を明らかにすることを目的として、IC1、IC2、ODA-DC、および微小管について、それらの間の相互作用を検討した。

第一部では、外腕ダイニン中間鎖の組み換えタンパク質を調製し、外腕ダイニン基部タンパク質との相互作用を解析した。まず大腸菌に中間鎖 IC1、IC2 を発現させたところ、ほとんどが不溶性タンパク質となった。そこで、昆虫培養細胞を用いて同様の試みを行ったところ、充分量の可溶性中間鎖を得ることに成功した。組み換えタンパク質に標識した His-tag を利用して精製したタンパク質を、それぞれを欠失した *oda9* および *oda6* 変異体細胞にエレクトロポレーション法により導入したところ、いずれも、一部の細胞の運動性が回復した。従って、得られたタンパク質は生理的活性を持ち、外腕ダイニンを軸系内の正しい位置に配置する機能をもつと結論された。

組み換え IC1、IC2 をゲル濾過カラムを用いてさらに精製した後、それらの溶液を混合して IC2 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、IC2 とともに IC1 も沈降した。従って、両者は溶液内で複合体を形成すると考えられる。外腕ダイニンには、タンパク質の 2 量体化を促進する LC8 というサブユニットが存在しており、IC1、IC2 の複合体形成には LC8 が必要であるという可能性が指摘されていた。しかし、今回の結果から、IC1 と IC2 は LC8 の介在がなくても結合できることが判明した。次に、この IC 複合体と、ODA-DC の主要サブユニットである DC1-DC2 ヘテロダイマーとの相互作用を検討した。IC2 および DC2 に対する抗体を用いた免疫沈降の結果、IC1-IC2 複合体は DC1-DC2 ダイマーと結合することが明らかとなった。また、この 4 種複合体を BMH で化学架橋すると、IC1 と DC1、IC2 と DC1 が架橋されたことから、4 種複合体のなかで IC1 と DC1、IC2 と DC1 が近接して存在することが示唆された。

第二部では、これらのタンパク質の微小管に対する相互作用を定量化することを目的に実験を行った。まず、組み換え IC1、IC2 について、軸系との結合性を検討し

た。ODA-DC を欠失する変異体 *oda1* の軸糸に対して IC1、または IC2 をそれぞれ反応させたところ、IC1 は濃度依存的に軸糸と結合し、野生型軸糸に含まれる IC1 と同程度の結合量で飽和した。従って、IC1 は軸糸の特定の位置に特異的に結合していると考えられる。一方 IC2 の結合量はわずかであった。

IC1、および DC1-DC2 複合体は、細胞質性微小管に対しても結合性を持つことが報告されている。そこで、IC1-IC2 複合体と細胞質微小管の結合性を検討するとともに、DC3 を含む ODA-DC、鞭毛から精製した外腕ダイニン-ODA-DC 複合体についても同様の解析をおこない、それらの結合の強さを比較した。共沈降実験と水晶発振子マイクロバランス測定法(QCM)の応用法 (NAPiCOS) を用い、タンパク質-細胞質性微小管間の結合性を検討し、それらの解離定数を測定した。その結果、IC1-IC2 複合体は IC1 または IC2 単独の場合よりも強く結合すること、ODA-DC の結合性は IC1-IC2 複合体よりわずかに強く、軸糸から精製したダイニン-ODA-DC 複合体はさらにそれよりもわずかに強く結合することが判明した。また、結合キネティクスの比較により、ODA-DC は IC1-IC2 複合体よりも、微小管に対して結合しやすく、また同時に解離しやすい性質を持つことが明らかになった。ミュータント軸糸を用いたこれまでの実験により、ODA-DC は IC1 よりも強く軸糸微小管に結合すること、しかし ODA-DC も外腕ダイニン非存在下では軸糸微小管全長の一部にしか結合できないことが分かっていた。今回得られた各タンパク質が示す微小管結合性の定量的解析結果は、この実験結果とよく一致することから、軸糸内のタンパク質間相互作用を反映しているものと考えられる。

第一部、第二部の結果を総合すると、外腕ダイニンと微小管の結合に関する、以下のような新しいモデルが考えられる。すなわち、(i) 外腕ダイニンは、IC1 または ODA-DC のみを介しただけでは微小管上に安定して結合できない。(ii) 外腕ダイニンと ODA-DC は、LC7b-DC2 という既知の経路に加え、今回新たに発見した IC1-DC1、IC2-DC1 という 2つの経路によって結合する。(iii) 中間鎖依存的結合と ODA-DC 依存的結合をまたぐこの経路により、外腕ダイニンの微小管への結合が安定化する。本研究によって得られたこの知見は、真核生物鞭毛のダイニンが安定して微小管に結合する機構を理解する上で重要だと考えられる。