

論文内容の要旨

論文題目

Studies on the function of outer arm docking complex ODA-DC
in the regular arrangement of outer arm dynein
(鞭毛ダイニン外腕の周期的構築におけるドッキング複合体 ODA-DC の機能)

氏名 大和 幹人

真核生物の鞭毛・繊毛は原生物からヒトまで保存された細胞器官であり、細胞の運動や水流の発生、シグナル伝達など多くの生命現象において重要な役割を担っている。鞭毛・繊毛の内部構造である軸糸は、9つの周辺微小管が円筒状にならんだ構造を持つ。各微小管の長軸方向に周期的に結合した軸糸ダイニン外腕・内腕が、隣接する微小管とのあいだで滑りを起こし屈曲波を発生させる。軸糸ダイニンの周期性は波動が基部から先端へ伝播するのに重要であると考えられるが、その構築機構は明らかになっていなかった。本研究では、これらの軸糸ダイニンのうち鞭毛打出力の7割を担う外腕に着目し、それらが周辺微小管上の特異的な位置に24 nm 間隔で配置する仕組みを明らかにすることを目的とした。

クラミドモナスのミュータントを用いた研究により、外腕ダイニンの基部が微小管に結合するためにはドッキング複合体 ODA-DC が必須であることが知られていた。ODA-DC は DC1、DC2、DC3 の3つのサブユニットから成る複合体で、このうち、ダイニンの微小管上への配置には DC1、DC2 が重要な役割を担っている。いくつかの先行研究によって、ODA-DC は外腕ダイニンとは独立に外腕のサイトに結合すること、外腕ダイニンを欠失したミュータントの軸糸では、ODA-DC が24 nm 間隔で結合していることが明らかになっている。

これらのことから、ODA-DC は外腕ダイニンの微小管ドッキングに働いているだけでなく、その周期的構築にも関与していることが示唆される。そこで本研究では組換え ODA-DC とクラミドモナスを用いて、これまでよくわかっていなかった ODA-DC 分子の形状や微小管結合様式を解析し、ダイニン外腕の周期的構築における ODA-DC の機能を検討した。

第一部では、まず組換え ODA-DC を調製し、その性質を調べた。組換え ODA-DC をゲルろ過カラムにかけたところ、その溶出プロファイルは天然の ODA-DC のものと酷似した。さらに、ODA-DC を欠失したクラミドモナス変異株に組換え ODA-DC を導入したところ、約 19% の細胞が運動性を回復し、実際に組換え ODA-DC が天然 ODA-DC 同様に外腕のサイトに結合することが電子顕微鏡観察によって確認された。従って組換え ODA-DC は天然 ODA-DC と同様の構造、性質を持つと結論づけた。また、組換え ODA-DC の超遠心分析の結果から ODA-DC は各サブユニットひとつずつからなるヘテロ三量体であることがわかった。次に ODA-DC 分子の形状を調べるため、組換え体 ODA-DC を低角度回転蒸着法で観察した。その結果、ODA-DC は楕円体状の構造として観察された。さらに、長軸の長さのヒストグラムは 28 nm をピークとする正規分布様になった。白金蒸着の厚さ ($2 \times 2 = 4$ nm) を差し引くとピークは 24 nm であり、ODA-DC それ自体の長さがおおよそ 24 nm であることが明らかになった。この結果から、ODA-DC の大きさ自体がダイニン外腕の周期を決定している可能性が示唆された。

第二部では、ODA-DC の微小管結合様式を解析した。まずクラミドモナス軸系に対する化学架橋を行ったところ、DC1 一分子と DC2 二分子からなる架橋産物が得られた。ODA-DC はヘテロ三量体であることから、この結果は ODA-DC は軸系上で間隔をあけずに連続して結合していることを示唆する。

組換え ODA-DC と精製した微小管との結合性を共沈実験により調べたところ、ODA-DC は微小管と直接結合することがわかった。*oda1* 軸系に対する組換え ODA-DC の結合飽和量を同様の方法で測定したところ、野生型軸系における ODA-DC の存在量とほぼ同量であることが判明した。さらに、組換え ODA-DC と *oda1* 軸系との結合のヒル係数が 2.8 であったことから、ODA-DC は正の協同性をもって軸系微小管に結合することが強く示唆された。

また、この結合の K_d 値は精製した微小管に対する結合の約 20 分の 1 であった。従って、周辺微小管上には ODA-DC の結合位置を特定し、その結合を強化する因子があると考えられる。

次に、生体内での ODA-DC と外腕ダイニンの微小管結合様式を観察した。クラミドモナスが接合する際に細胞が融合する現象を利用し、ODA-DC または外腕ダイニンを欠失する変異株軸糸に、融合した細胞体からそれらが供給されて結合する様子を間接蛍光抗体法により観察した。ODA-DC と外腕ダイニンをともに欠失する *oda1oda6* 軸糸に細胞体から ODA-DC を供給すると、軸糸の基部から先端方向へと時間経過とともに結合していく様子が観察された。従って、ODA-DC が協同的に軸糸上に配置したものと考えられる。一方、外腕ダイニンのみを欠失して ODA-DC は保持している *oda6* 軸糸に外腕ダイニンを供給すると、鞭毛全長に均等に結合していく様子が観察された。このことから、外腕ダイニン単独での微小管結合には協同性はなく、外腕ダイニンの周期的構築は ODA-DC の協同的微小管結合が担っていることが示唆された。

本研究の結果をふまえると、長さ 24 nm の ODA-DC が周辺微小管の基部から先端へ協同的に結合していき、その上に外腕ダイニンが結合していくことで外腕の 24 nm 周期の配置が構築されるというモデルが考えられる。