

論文審査の結果の要旨

氏名 大和 幹人

本論文は、真核生物鞭毛において外腕ダイニンの微小管結合に介在する「ドッキング複合体(Outer Dynein Arm Docking Complex, ODA-DC)」の機能を解析した結果を記述したものである。全2部から構成され、第1部では ODA-DC 単体の性状について、第2部では ODA-DC の微小管結合様式について述べている。

真核生物鞭毛は細胞から生えた毛状の細胞小器官である。その内部構造「軸糸」は、9組の周辺微小管が2本の中心微小管を取り囲んだ円筒状構造を持つ。周辺微小管上に並ぶモータータンパク質ダイニンが、ATP加水分解によって隣の周辺微小管との間に滑りを起こすことで、鞭毛は波打ち運動を行う。ダイニンは、微小管上の位置から外腕と内腕に大別される。外腕ダイニンは24 nm 周期で1列に並んでおり、内腕ダイニンは異なる活性をもつ7種が96 nm 周期で複雑に並んでいる。このように異なるダイニンが周期的に配列していることが、鞭毛の波動形成に重要だと考えられている。しかし、各ダイニンの詳しい配列メカニズムは分かっていなかった。論文著者は、鞭毛の出力の約70%を生み出す強力な分子モーターである外腕ダイニンに着目し、その周期的配列機構の解明を目指して、鞭毛研究のモデル生物である緑藻クラミドモナスの ODA-DC を対象に生化学的研究を行った。

第1部では、外腕ダイニンの根元に存在し、その微小管結合に介在する、ODA-DC の性状について述べている。ODA-DC は3つのタンパク質(DC1(83 kDa), DC2 (62 kDa), DC3 (21 kDa))から成る複合体である。クラミドモナスの ODA-DC 欠失株は、外腕ダイニン構成タンパク質には異常がないにも関わらず外腕ダイニンが微小管に結合できないことが知られていた。そのため ODA-DC は外腕ダイニンの微小管結合に必要不可欠であると考えられてきたが、その性状は不明であった。論文著者は、所属研究室で共発現系が確立されていた組換え DC1・DC2 に対し、大腸菌で発現した組換え DC3 を混合し、試験管内で組換え ODA-DC を調製した。この複合体が ODA-DC としての構造と生理活性を保持していることを、ネイティブ ODA-DC とのゲルろ過カラム溶出プロファイルの比較、電気穿孔法による ODA-DC 欠失株への導入実験等によって確かめた。この結果から組換え ODA-DC はネイティブ ODA-DC とほぼ同一と考えられるとして、以下の実験を行った。まず、分析超遠心法により、組換え ODA-DC がサブユニット1つずつから成るヘテロ三量体であることを明らかにした。さらに、低角度回転蒸着法によ

る電顕観察を行ったところ、組換え ODA-DC 分子が長軸長 24 nm の楕円体状構造を持つことを見出した。これらは ODA-DC 分子の性状に関する初めての知見である。

第 2 部では、組換え ODA-DC およびネイティブ ODA-DC の微小管結合様式について解析した結果を述べている。まず、ODA-DC を保持した外腕ダイニン欠失株軸糸に対して化学架橋を行ったのち、抗 DC1 抗体で免疫沈降を行った。質量分析により、沈降産物は DC1 が 1 つ、DC2 が 2 つ架橋されていることがわかった。第 1 部の結果から ODA-DC はヘテロ三量体であることが分かったため、この結果は ODA-DC 同士が微小管上で隣接していることを示唆している。組換え ODA-DC を精製微小管と混合して化学架橋を行った場合も同じ結果が得られたため、ODA-DC は他の軸糸タンパク質に依存せずに微小管上で自己会合することがわかった。さらに外腕ダイニン欠失株軸糸と組換え ODA-DC の共沈実験を行ったところ、両者の結合は周辺微小管 24 nm につき ODA-DC 1 つの割合で結合したところで飽和し、ヒルプロット解析から正の協同性を持つことがわかった。最後に、生体内でネイティブ ODA-DC が微小管結合する様子を蛍光抗体法により観察したところ、ODA-DC は鞭毛の根元から先端に向かって徐々に結合することがわかった。これらのことから、ODA-DC の微小管結合には正の協同性があり、微小管上で ODA-DC が連結していることが初めて見出された。

第 1 部、第 2 部の結果を合わせ、論文著者は、外腕ダイニンの周期性構築について「長さ 24 nm の ODA-DC が微小管上で連結し、その後外腕ダイニンが ODA-DC に結合することで外腕ダイニンの 24 nm 周期が形成される」というモデルを提唱した。この結果は、これまで未知であったダイニンの周期的配列機構の理解を大きく進展させたと評価できる。

なお本論文は論文著者を含めた 8 名の共同研究であるが、論文著者が主体となって研究を遂行したもので、その寄与が充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。