

氏名・本籍	近藤 裕祐 (愛媛県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第68号
学位授与の日付	令和5年9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	外腕ダイニン中間鎖2の点変異によってもたらされる繊毛運動の変調
学位論文審査委員	主査 教授 八木 俊樹 副査 教授 菅 裕 教授 齋藤 靖和 准教授 山下 泰尚

学位論文の要旨

第1章では本研究の背景について述べる。繊毛運動の基礎はモータータンパク質・ダイニンと微小管の滑り運動である。微小管の滑り運動が繊毛の波動運動に発展すると考えられるが、その機構はまだよくわかっていない。ダイニンの機能不全は、ヒトでは慢性気管支炎、不妊症、水頭症、内臓逆位など様々な病態を伴う繊毛病と呼ばれる遺伝病が生じる。この点で、繊毛ダイニンの機能解析は基礎医学分野においても重要である。繊毛には機能が異なる2種類のダイニン、外腕ダイニンと内腕ダイニンが存在する。緑藻クラミドモナスのダイニン欠失株を用いた解析から、両者の機能には大きな違いがあり、外腕ダイニンは鞭毛打の高速化に、内腕ダイニンは屈曲角の拡大に関与すると考えられている。クラミドモナスの場合、1本の繊毛微小管上に、外腕ダイニンは400分子、内腕ダイニンは100分子が規則的かつ密に並んでいる。これら2種類のダイニンは協同して、繊毛の規則正しい波動を生み出すと考えられているが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、クラミドモナスの新規ダイニン外腕変異株の解析から、ダイニン分子間の協同的なスイッチ機構を調べた。

第2章では、新しく単離した外腕ダイニン変異株の性質について述べる。新規運動性変異株を得る目的で、内腕ダイニン変異株に紫外線変異を導入したところ、運動性がない変異株が5種類得られた。それを野生型と戻し交配したところ、そのうちの一つに、野生株の70%の速度で遊泳する株が見つかった。PCRをベースとしたAFLP法により変異遺伝子の位置を絞り込み、さらに、原因遺伝子の候補を探索したところ、19種類ある外腕ダイニンのコンポーネントの1つ、中間鎖IC2、に点変異(E279K)があることがわかった。変異株に野生型ゲノムIC2遺伝子を形質転換したところ、この株の運動性が野生株並みに回復することから、この変異により運動性の低下が生じたことが確定された。この株では外腕ダイニンが正しく構築されることから、この点変異によりダイニンの機能が低下したことが強く示唆される。点変異により機能が低下したダイニン変異株が得られたのはこれが初めてである。

第3章では、中間鎖IC2の点変異によりなぜ外腕ダイニンの機能が低下するのか、その原因を追究した。ダイニン分子の尾部にあるIC2はモーター活性をもつ頭部と15nm程度離れており、IC2がどのようにしてモーター活性を制御するのかわかっていなかった。近年、クライオ電子顕微鏡による構造

研究から、IC2は隣接する外腕ダイニンの頭部と接触していることが明らかにされ、IC2は隣りのダイニン分子のモーター活性を制御している可能性が示唆されている。本研究では*oda6E279K*株の運動性低下はIC2と隣接するダイニン分子の制御が点変異によって乱されていることによって引き起こされる現象であると仮説を立てた。仮説のように隣り合うダイニン分子間で制御が働くとすると、個々のダイニン分子が孤立している場合と、ダイニン分子が密に並んだ場合で、微小管滑り速度やATP加水分解活性に対するこの点変異の影響に違いが見られるはずである。本研究ではこの可能性を検証する実験を行った。その結果、変異型ダイニンの微小管滑り速度は分子が孤立しているときに野生型ダイニンの70%、分子が密に並んでいるときに10%の速度にまで低下していた。また、ATP加水分解活性については孤立しているときには差が見られず、密に並んでいるときは野生型ダイニンと比較して70%にまで減少することが明らかになり、*oda6E279K*変異はダイニンが密に並ぶとき、その活性を大きく減少させることが分かった。この結果はE279K点変異によるモーター活性の低下がダイニン分子単独で起きている訳ではなく、IC2が隣接する外腕ダイニン重鎖のモーター活性を負に制御していることを強く示唆している。ここで新たな疑問が生じる。外腕ダイニンの重鎖は α γ β の3種類が存在するが、IC2が制御する外腕ダイニンの重鎖は果たしてどの種類の重鎖なのだろうか？

第4章では前章で生じた疑問を解決すべく、*oda6E279K*株と外腕ダイニン重鎖 α 、 β 、 γ のそれぞれが単独で欠失する変異株との二重変異株を作製し、その遊泳速度を評価することでIC2と相互作用する重鎖を調べた。その結果、IC2の変異は β 重鎖に影響を与える可能性が示唆された。

第5章では本研究の結論を述べる。本研究より、中間鎖が隣り合う外腕ダイニンの β 重鎖を制御している可能性が強く示唆された。外腕ダイニンが隣り合う分子と接触していることは古くから指摘されていたが(Goodenough et al., 1989)、この機能的な意義については未だに明らかになっていない。本研究結果は微小管上に密に並ぶ外腕ダイニン同士の機械的な接触の意義を明らかにするうえで重要な知見になったと考える。