

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	真核生物繊毛運動調節における外腕ダイニンサブユニットの機能に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	久次史花
Author(English)	Ayaka Kyuji
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12341号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:若林 憲一,久堀 徹,田中 寛,柳田 保子,田口 英樹,立花 和則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12341号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 ライフエンジニア リング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of (理学)
学生氏名： Student's Name	久次史花		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	若林 憲一 准教授
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	久堀 徹 教授

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

運動する生物の多くは、刺激応答行動を示す。生物の行動の調節機構を理解するためには、この生体内で起きる反応カスケードを分子レベルで明らかにする必要がある。真核単細胞生物の運動の代表例が鞭毛・繊毛による運動である。鞭毛・繊毛は相同の細胞小器官で、近年は繊毛に用語統一する傾向があるため以後繊毛と呼ぶ。繊毛は後述するその構造の複雑さから、これを使った行動の理解が遅れていた。本研究は、主としてクラミドモナスが光行動を示すための繊毛運動調節機構の分子機構を明らかにすることを目的として行われた。

真核生物繊毛とは細胞から生えた毛のような細胞小器官で、運動することで細胞の周りに流れを生み出す。繊毛の膜を除いた内部構造「軸糸」は 9 組の周辺 2 連微小管が 2 本の中心微小管を囲んだ“9+2”構造をもつ。この構造は生物種を超えて広く保存されている。周辺微小管にはモータータンパク質「ダイニン」の外腕と内腕が結合している。このダイニンが ATP 加水分解エネルギーによって周辺微小管間に滑りを生じさせることで繊毛は屈曲運動を行う。

繊毛はただ動くだけではなく化学・力学刺激に応じて運動様式を変化させる。この変化は生物にとって重要であるが、どのようにして変化させるのかその分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

本研究では 2 つの理由で周辺微小管の外側に結合した外腕ダイニンに注目した。1 つはその欠損が重篤な運動低下を促す重要なモーターであること、もう 1 つは後述するようにさまざまな化学シグナルを受容する多くのサブユニットを持つ多機能モーターであるという点である。

繊毛研究のモデル生物であるクラミドモナスの外腕ダイニンは 3 つの重鎖 (Heavy Chain, HC)、2 つの中間鎖 (Intermediate Chain, IC)、11 種の軽鎖 (Light Chain, LC) の計 16 のサブユニットからなる巨大なタンパク質複合体である。外腕ダイニンの AAA+リング周辺には LC1,LC3,LC4,LC5 の 4 種がある。LC1 は HC のモーター活性を低下させるブレーキのような役割を持つ。その他の 3 種が化学シグナルによる運動調節に関わると考えられており、本研究の対象となる。LC3 と LC5 は酸化還元調節に関与するチオレドキシシン (Trx) のファミリータンパク質であり、LC4 はカルシウムイオン結合タンパク質であるカルモジュリンに似たタンパク質である。繊毛内にある Trx の機能は未知である。またカルシウムイオンはクラミドモナスの光行動に重要な因子として働く。

本研究では Trx 型およびカルシウムイオン結合型外腕ダイニンサブユニットの生理機能、特に繊毛運動調節に果たす役割を明らかにすることを目的とする。クラミドモナスの LC3,LC5,LC4 の欠損株を得ることが困難だったため、ノックダウン実験が容易な扁形動物

ラナリアを用いてそれらと相同の外腕ダイニンサブユニットの発現を抑制し、その運動表現型を解析した。その後クラミドモナス LC3 と LC5 の組換えタンパク質の Trx としての性質を生化学的に評価し、ほかのオルガネラ内にあるよく研究されている Trx との比較によって生理機能を予測した。クラミドモナスのダイニン軽鎖欠損株の入手と作成ができたことでこれらの株の運動と生理機能を予測した。

プラナリアの実験からコントロールとして使用した外腕ダイニンを微小管に結合させるドッキングコンプレックス (DC2) のノックダウン個体はクラミドモナスの DC2 の欠損株と異なる表現型を示した。この結果は、プラナリアにおける DC2 が外腕ダイニンの形成以外に、繊毛の形成、繊毛長の維持などにも重要な働きを持つことを示唆している。

クラミドモナス LC3 と LC5 の組換えタンパク質を用いた生化学実験から LC3 と LC5 の中点酸化還元電位を求めることができた。

クラミドモナスの LC3 と LC5 の欠損株を用いた運動性・光行動の表現型を解析した。1 秒間に繊毛が打つ回数、繊毛打頻度は LC3 欠損株、LC5 欠損株共に野生株と異なる表現型を示した。相補株で同様の実験をすると表現型が回復したことから LC3/LC5 がないとダイニンの活性を抑制/向上させるのかもしれない。

クラミドモナスは通常前進遊泳を行うが強光刺激を受けると後退遊泳する。外腕ダイニン欠損株が後退遊泳をしないことから、LC4 は前進遊泳から後退遊泳への変換に必要なだと期待されていたが、LC4 欠損株は後退遊泳を行ったので LC4 は後退遊泳に必須ではないことが分かった。

本研究では、繊毛を動かすモータータンパク質ダイニンのサブファミリーのうち、緑藻クラミドモナスと扁形動物プラナリアという 2 種のモデル生物を使って逆遺伝学的に解析した結果、チオレドキシン様軽鎖がダイニンのアクセルやブレーキとして機能していること、カルシウムイオン結合軽鎖が従来信じられてきた繊毛波形変換能を持っていないことなどを明らかにした。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース : Department of, Graduate major in	生命理工学 ライフエンジニア リング	系 コース	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of (理学)
学生氏名 : Student's Name	久次史花		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	若林 憲一 准教授
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	久堀 徹 教授

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Most motile organisms exhibit stimulus-responsive behavior. To understand the regulatory mechanism of their behavior, it is necessary to clarify the reaction cascade that occurs *in vivo* at the molecular level. A typical example of locomotion in eukaryotic unicellular organisms is caused by ciliary (or flagellar) motion. This study was mainly conducted to elucidate the molecular mechanisms that regulate ciliary motility in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a model organism to study cilia, to exhibit photo behavior.

Eukaryotic cilia are hair-like, motile organelles that protrude from the cells. The inner structure of cilia, axonemes, is widely conserved from protists to humans. An important feature of ciliary beating is that it changes its beating mode (e.g. waveform, beating frequency, beating amplitude, etc.) in response to the chemical/mechanical stimuli; however, the molecular mechanisms underlying this regulation remain unknown.

In this study, I focused on the role of the subunits of the outer arm dynein. Outer arm dynein is a family of dynein, a minus-end directed microtubule-based motor protein, that generates about two-thirds of the force required for ciliary beating. Among ~20 subunits, there are three subunits that potentially regulate ciliary beating: two thioredoxin-like subunits and one calcium-binding subunit. Redox and calcium ions have been known to act as important factors in the photobehavior in *C. reinhardtii*. However, the functions of those three subunits are unknown. By utilizing reverse genetic analysis in *C. reinhardtii* and also comparative analyses between *C. reinhardtii* and the flatworm planaria *Schmidtea mediterranea*, I revealed that thioredoxin-like subunits function to regulate the ciliary beating frequency, but not to regulate photobehavior. As for calcium ion-binding proteins, knock-out strain did not show photobehavior-related phenotypes. Both findings prompt a correction of long-held hypotheses.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).