

## 学位論文題名

## ホタテガイ精巣カルシニューリンの研究

## cDNA クローニングと機能解析

## 学位論文内容の要旨

カルモジュリン (CaM) は、精巣での含量が脳についで高く、多くの標的酵素を活性化することで精巣の生理機能に関与すると考えられる。Ca<sup>2+</sup>/CaM依存性酵素のうち、タンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンは、精巣に特異的に発現するアイソフォームの存在することが知られている。精巣でのカルシニューリンの生理機能を明らかにする目的で、ホタテガイ精巣カルシニューリンAのクローニングを試みた。ホタテガイは、マウス、ラットに比べて精巣が大きく、その成熟には1年を1サイクルとする季節変化があるので、これを指標にして精巣の成熟過程でのカルシニューリンの生理機能を追跡した。

第1章では、カルシニューリンのcDNAクローニングを行った。カルシニューリンは、触媒サブユニット (カルシニューリンA) と調節サブユニット (カルシニューリンB) の2つのサブユニットから構成されている。ラット脳カルシニューリンAのcDNA断片をプローブに用いて、ノーザンブロッティングを行った。その結果、ホタテガイ精巣トータルRNA中の 8 kbの成分とクロスハイブリダイゼーションをすることがわかった。このcDNA断片を用いて、ホタテガイ精巣カルシニューリンAのcDNAクローニングを試みた。合計10個のクローンを単離し、その塩基配列から、2,268 bpの塩基配列を決定した。決定した配列は、5'-非コード領域 (5'-UTR) 133 bp、コード領域 (ORF) 1,458 bp、3'-非コード領域 (3'-UTR) 677 bpを含んでいた。これに基づき推定されたホタテガイ精巣カルシニューリンAのアミノ酸配列は486残基からなり、計算された分子質量は55,005.91 Daであった。また、このカルシニューリンAの配列は、それぞれ触媒ドメイン、カルシニューリンB結合ドメイン、CaM結合ドメイン、自己阻害領域の4つのドメインにより構成されることが明らかになった。このアミノ酸配列を他の生物種のものと比較すると、ホ乳類と両生類のカルシニューリンAと高い相同性を示し、なかでも、ホ乳類の精巣で特異的に発現しているアイソフォームよりも、脳で発現しているアイソフォームに対してより高い相同性を示すことがわかった。また、多くの生物種のカルシニューリンAに対して、ホタテガイ精巣カルシニューリンAの4つのドメイン (触媒ドメイン、カルシニューリンB結合ドメイン、CaM結合ドメイン、自己阻害領域) を比較した結果は、1次構造、及び立体構造が保存されている可能性が高いことを示した。カルシニューリンAは生物種が異なっても、保存された立体構造を持つことから、類似した配列を持つ基質を脱リン酸化する可能性があることを示唆した。

第2章では、単離したカルシニューリンA cDNAをプローブに用いて、カルシニューリンA mRNAの発現量の季節変化を調べた。1ヶ月ごとに採集した精巣を用いてノーザンブロッティングを行ったところ、常に 8 kbのシングルバンドのみが検出され、精巣に発現

するカルシニューリンAには他のアイソフォームはないことが示唆された。ホタテガイの筋肉組織においても精巣と同一の分子量を持つカルシニューリンが発現しており、これらは同一遺伝子から発現したタンパク質である可能性が考えられる。カルシニューリンA mRNAの発現量は、精巣の成熟（生殖巣指数の増加）に伴って1月から3月にかけて急激に上昇し、その後、7月にかけて減少した。精巣の成熟度は4月に最大となり、カルシニューリンA mRNAの発現量のピークを与える時期は、精巣の成熟度のピークよりも1ヶ月早いことがわかった。カルシニューリンA mRNAの最大発現時期は、ホタテガイ精巣の成熟過程で、精子比率が20~80%を占める時期にあたり、減数分裂直後であることがわかった。この結果は、カルシニューリンA mRNAが減数分裂後に最大の発現量を示すというマウス精巣で得られた結果と一致した。成熟した精子細胞では、カルシニューリンは頭部の先体主部と尾部の鞭毛に局在するという結果が報告されている。この結果と合わせて考えると、精巣のカルシニューリンは、減数分裂後の精子形成過程と成熟した精子の運動機能の制御過程で機能すると考えられる。

カルシニューリンの生理機能を明らかにするためには、単離したタンパク質を用いた試験管内の実験が必要である。第3章では、第1章の実験で得たホタテガイ精巣カルシニューリンA cDNAと当研究室で先にクローニングされたカルシニューリンB cDNAを用いて、カルシニューリンの大腸菌内での大量発現系の構築を行った。カルシニューリンBの発現系を用いた実験では、発現誘導後、カルシニューリンBの16 kDaのバンドが常に可溶性画分に存在し、これは容易に精製することができた。カルシニューリンAの発現系では、55 kDaの発現タンパク質が不溶性画分にあり、容易に可溶化せず精製が困難であった。さらに、可溶化した微量の発現タンパク質を精製したが、脱リン酸化活性を検出できなかった。次に、カルシニューリンAのN端側にタグとして、6残基からなるヒスチジン、あるいはグルタチオン S-トランスフェラーゼを付加した発現系を構築したが、どちらのタグをつけてもタンパク質は不溶性画分 (inclusion body) に回収された。発現の段階、あるいは精製の段階において活性を消失したと推測され、活性化因子であるカルシニューリンB (発現タンパク質)、Ca<sup>2+</sup>イオン、ホタテガイCaMを加えても、その脱リン酸化活性は上昇しなかった。そこで、カルシニューリンAとカルシニューリンBをコードするそれぞれのcDNAを挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドで形質転換後、発現、誘導したところ、両サブユニットともに発現することがわかった。カルシニューリンBは可溶性タンパク質となったが、カルシニューリンAは50%しか可溶化しなかった。可溶性画分と不溶性画分からそれぞれ精製を試みたが、脱リン酸化活性は検出できなかった。大腸菌内で発現させたカルシニューリンは正確な高次構造を取れないこと、また、真核細胞内で起こりうる共有結合的な化学構造の修飾が、大腸菌内では起こらないこと等が原因となっていると考えられる。

以上述べたように、この研究ではホタテガイを用いて軟体動物精巣カルシニューリンのcDNA クローニングに初めて成功した。cDNA配列から推定したアミノ酸配列を、他の生物種のものと比較することで、生物の進化過程でのカルシニューリンの保存性に関する知見を得ることができた。mRNA発現量の変化を1年間にわたって追跡、調査し、精巣の成熟過程との相関から生理機能について考察した。精巣カルシニューリンの生理機能を理解するためにはタンパク質化学的研究が必要なため、カルシニューリンの発現系の構築を試みた。今後、この発現系を完成させることで、今回得た発現量変化の結果を、精巣での生理機能の解明に発展させることが期待できる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 菊 池 九 二 三

学 位 論 文 題 名

## ホタテガイ精巢カルシニューリンの研究

### cDNA クローニングと機能解析

精巢でのカルモジュリンの含量は、脳に次いで高い。精巢が成熟し、生殖細胞が減数分裂を経て精子に変わる過程で、カルシウムイオンとカルモジュリンに依存した多くの標的酵素の活性化が重要な鍵を握っていると考えられる。生殖細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇すると、カルシウムイオンは調節タンパク質カルモジュリンに結合し、その結果形成されるカルシウム-カルモジュリン複合体が多くの標的酵素を活性化する。カルモジュリンで活性化されるいくつかの標的酵素が精巢で同定されているが、その基質の同定を含めて精巢のカルシウムシグナル伝達過程の詳細な分子機構は明らかになっていない。申請者は、哺乳類精巢で特異的なアイソフォームが発現することが知られているカルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンの生理機能の解明をめざして研究を展開した。

学位論文は、3章からなっている。第1章では、ホタテガイ精巢カルシニューリンcDNA クローニングの結果について述べている。カルシニューリンは触媒サブユニットと調節サブユニットからなるが、申請者はこのうちの触媒サブユニットをコードするcDNA のクローニングに成功した。構造既知のラット脳カルシニューリン触媒サブユニットの配列に基づきPCR法でプローブを作成し、Northernプロット法により8 kbのホタテガイ精巢カルシニューリン触媒サブユニットmRNA を同定した。このプローブを用いてホタテガイ精巢cDNA ライブラリーをスクリーニングし、得られた合計10個のクローンを解析して、1,458 bpからなる全コード領域を含む2,354 bpの塩基配列を決定した。塩基配列から推定されたアミノ酸配列(486残基)は哺乳類カルシニューリン触媒サブユニットの配列と高い相同性を示し、同様のドメイン構造をもつことから、両者は同様の高次構造をとることが推定された。このアミノ酸配列を詳しく比較検討した結果、哺乳類の精巢で特異的に発現しているアイソフォームよりも、脳で発現しているものにより高い相同性を示すことを明らかにした。

第2章では、精巢でのカルシニューリン触媒サブユニットmRNA の発現量の季節変化について調べている。ホタテガイ精巢は、1年周期で成熟・放精をくり返すので一ヶ月ごとに採集したホタテガイの精巢について、単離したcDNA をプローブに用いてNorthernプロット法で発現量を定量した。その結果、採集時季によらず、8 kbのバンド1本のみが常に検出された。また、この8 kbのシグナルは精巢が成熟する1月から3月にかけて急激に上昇し、放精時期に当たる5月から6月にかけて減少することを明らかにした。発現量のピークにあたる3月は、精巢の成熟度を示す生殖巣指数のピークよりも一月早く、生殖細胞が減数分裂した直後にあたる。この結果は、哺乳類精巢特異型アイソフォームの発現時期についての結果と同じであり、ホタテガイ精巢では、哺乳類脳型アイソフォームに近い配列をもつ1種類のカルシニューリンが、哺乳類精巢特異型アイソフォームと同様に減数分裂後の精子形成過程で

生理機能を果たしていると推測した。また、これに基づき、カルシニューリンの哺乳類精巣特異型アイソフォームは、生物進化の過程で軟体動物と脊椎動物が分岐した後で精巣の生理機能の複雑化に対応する形で出現し、その後、哺乳類の分岐を経て今日にいたるまでに急速に変異してきたという仮説を提唱した。

第3章では、カルシニューリンの生理機能を試験管内の実験から解明することを目的に、カルシニューリンの大腸菌体内発現系の構築を試みた結果について述べている。申請者がクローニングしたカルシニューリン触媒サブユニットcDNAのコード領域と、先に協同研究者の中富がクローニングしたホタテガイ精巣カルシニューリン調節サブユニットcDNAのコード領域とを発現プラスミドのT7プロモーターの下流に挿入した。形質転換により大腸菌体内に両サブユニットは発現されたが、脱リン酸化酵素活性を検出することはできなかった。しかし、触媒サブユニットの調節領域を切除したcDNA断片を用いて同様の系を構築することで、カルモジュリンに依存せず常に高い酵素活性をもつヘテロダイマー構造のタンパク質の発現に成功した。大腸菌体内発現系を用いて、このように活性の高いカルシニューリンを高収率で得たのは、これが初めてのことである。

このように、申請者は、ホタテガイ精巣カルシニューリン触媒サブユニットcDNAのクローニング成功し、これによりカルシニューリンの精巣での生理機能を解明する糸口を作るとともに、大腸菌体内発現系を用いたカルシニューリンの大量発現系を構築してタンパク質化学的な研究の出発点を作り上げることに成功した。

本論文で述べられたこれらの成果は、精巣の精子形成過程でのカルシウム調節の分子機構の解明に貢献するところが大きく、審査員一同は、申請者が北海道大学博士（理学）の学位を得る十分な資格を有すると認めた。