

ホタテガイ精巣特異的新規カルシニューリン 結合蛋白質 CaNBP75に関する研究

学位論文内容の要旨

セリン/スレオニン特異的プロテインフォスファターゼ2Bとして知られるカルシニューリンは、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性の脱リン酸化酵素で、真核生物の多くの組織で発現している。カルシニューリンの研究は、免疫抑制剤の標的蛋白質がカルシニューリンであることが報告されて以来、免疫系や神経系での進展が著しい。近年では新たなカルシニューリン結合蛋白質はいくつか報告され、カルシニューリンが心筋の肥大や筋原繊維の再構築にも関与するなど、多彩な機能を有することが明らかになってきた。しかし、研究の初期よりその発現量の多さから注目されていた精巣でのカルシニューリンの機能は現在でも解明されていない。

精巣特異的カルシニューリンは、ラット精巣での発現パターン変化や、細胞内での局在などの研究から、減数分裂や精子形成といった精巣に特異的な機能に関与しているのではないかと推測されてきた。しかし、精巣では精子形成細胞培養系が確立されていないこともあり、カルシニューリンの基質蛋白質の同定を含めた実際の生理機能については全く解明されていない。

本研究では、ホタテガイ精巣より新規カルシニューリン結合蛋白質CaNBP75を単離し、その分子機能を解析して、生理的意義について考察した。本論文は以下に示した6章から構成される。

第1章ではホタテガイ精巣に発現しているカルシニューリンについての知見を得るため、カルシニューリンの調節サブユニット（CaNB）の化学構造および遺伝子の発現解析を行った結果を示した。アミノ酸配列分析、およびcDNAクローニングの結果、ホタテガイ精巣CaNBはほ乳類CaNBアイソフォームのB α 1に近いことが明らかになった。また、精巣の成熟過程との関連を明らかにするためにホタテガイ精巣を用いてCaNB発現量の季節変化を調べ、ホタテガイ精巣CaNBの発現量が、精巣の成熟サイクルに伴って増減することを明らかにした。

第2章では、ホタテガイ精巣に含まれるカルシニューリン結合蛋白質を検出し、その単離を試みた結果を示した。カルシニューリン結合蛋白質がホタテガイ精巣抽出液中に存在することをファーウエスタン法を用いて明らかにし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で分子量約7万5千の移動度を示すことから、この蛋白質をCaNBP75（calcineurin binding protein of 75 kDa）と名付けた。ホタテガイ精巣から硫酸アンモニウム分画、等電点沈澱、DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーを用いて部分精製したCaNBP75は、ブロードな溶出パターンを示し、また二次元電気

泳動では複数のスポットを形成したことから、この蛋白質は単一の分子種ではないことが推測された。

第3章では、CaNBP75の化学構造を決定し、アミノ酸配列の特徴から得られたCaNBP75の性質について述べた。部分精製したCaNBP75のアミノ酸配列分析を行い、得られた配列情報に基づいてcDNAクローニングを行った。単離されたcDNAにコードされたアミノ酸配列から、CaNBP75は全長474残基、51,850 Daの蛋白質であることが推測された。また、データベース検索から、CaNBP75はC末端領域に低分子量GTPaseであるRanの結合モチーフを持つ新規蛋白質であることがわかった。CaNBP75のN末端領域に相同性のある蛋白質はデータベース上に存在しなかったが、C末端領域約200残基はヒトのRan結合蛋白質であるRanBP3のRan結合領域と非常に高い相同性を示し、CaNBP75もRanBP3同様、Ranの結合によって機能が制御されることが推測された。

第4章ではCaNBP75の組換え蛋白質を用いた機能解析と、ホタテガイ組織での発現解析を行った。CaNBP75変異蛋白質の発現系を構築し、カルシニューリンとの相互作用を解析した結果、CaNBP75のN末端領域6残基目から210残基目を含む組換え蛋白質がカルシニューリン結合能を示すこと、その作用点はカルシニューリンの触媒サブユニットであるCaNAであることが明らかになった。このN末端領域を含む組換え蛋白質は、SDS-PAGEにおける挙動が普通ではなく、このため見かけの分子量が大きく見積もられると考えられた。ノーザン法を用いた遺伝子発現解析から、CaNBP75の10 kbと5.2 kbの転写産物は、精巣に特に多く発現しているのが確認できた。10 kbの転写産物は腎臓でも発現量が高く、また、卵巣では1.7 kbの転写産物が多量に発現していた。ファウエスタン法を用いて組織分布を調べた結果、カルシニューリンがホタテガイ組織で普遍的に発現しているのに対し、CaNBP75の発現は組織特異性が高かった。CaNBP75の発現量は精巣で特に高く、卵巣にも発現が見られたが、カルシニューリン発現量の多い筋組織では全く見られなかった。この結果から、CaNBP75は精子変態、鞭毛の運動といった精巣特有の機能や、生殖細胞の減数分裂に関与する蛋白質である可能性も考えられた。

第5章ではCaNBP75の均質性について論じた。アミノ酸配列分析、およびcDNA塩基配列分析の結果を考慮すると、CaNBP75には少なくとも4種のアイソフォームが存在し、そのうち2種類は蛋白質として翻訳されていることを明らかにした。

第6章ではCaNBP75の生体内での機能について考察を行った。精子形成過程でのカルシニューリンおよびRanの局在に関する知見と、CaNBP75が精巣で高レベルに発現しているという結果から、精子形成過程でカルシニューリンはRanと共同して機能しており、CaNBP75はこれを仲介する形で制御する可能性を示した。また、CaNBP75とRanBP3の相同性から、Crm1を介したカルシニューリンの核外移行機構の可能性を示した。

これまで手がかりのなかった精巣でのカルシニューリンの生理機能解明の研究は、精巣特異的なカルシニューリン結合蛋白質であるCaNBP75の発見により、新しいアプローチの手段を得たことになり、今後大きく進歩すると期待する。

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

ホタテガイ精巣特異的新規カルシニューリン

結合蛋白質 CaNBP75に関する研究

セリン/スレオニン特異的プロテインフォスファターゼ2Bとして知られるカルシニューリンは、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性の脱リン酸化酵素で、真核生物の多くの組織で発現している。免疫系や神経系での生理機能に加え、近年では心筋の筋原繊維の再構築過程で機能することが示され、その多彩な機能が注目されている。しかし、研究の初期よりその発現量の多さから注目されていた精巣でのカルシニューリンの機能は現在でも解明されていない。精巣特異的カルシニューリンは、ラットでの発現パターン変化や、細胞内局在などの研究に基づき、減数分裂や精子形成に関与すると推測されている。しかし、精子形成細胞の培養系が確立されていないこともあり、カルシニューリンの基質蛋白質の同定を含めた実際の生理機能については全く解明されていない。

申請者は、カルシニューリンと相互作用しその機能を制御する因子が生理機能解明の鍵を握るという観点から、カルシニューリンと特異的に相互作用するタンパク質の探索を試みた。その結果、ホタテガイ精巣に含まれる新規カルシニューリン結合蛋白質CaNBP75の単離に成功し、その分子機能を解析してカルシニューリンの生理機能の解明に重要な糸口を与えることに成功した。

本論文は以下に示した6章から構成されている。第1章では、ホタテガイ精巣カルシニューリンの調節サブユニット (CaNB) の化学構造および遺伝子発現の解析を行った結果が示されている。精巣の成熟過程でのCaNB発現量の変動を解析した結果、ホタテガイ精巣カルシニューリンは、精巣の成熟に伴って発現が増加することを明らかにした。

第2章では、ホタテガイ精巣に含まれるカルシニューリン結合蛋白質を検出し、その単離を試みた結果を示している。ホタテガイ精巣抽出液中にカルシニューリン結合蛋白質が存在することをファウエスタン法を用いて明らかにし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上での分子量約7万5千に基づきCaNBP75 (calcineurin-binding protein of 75 kDa) と名付けた。硫酸アンモニウム分画、等電点沈殿、DEAE-セルロフラインカラムクロマトグラフィーを用いた部分精製の結果、および二次元電気泳動で検出されるスポットの形状から、この蛋白質は単一の分子種ではないと推測した。

第3章では、CaNBP75の化学構造を決定し、その特徴からCaNBP75の性質について考察している。部分精製したCaNBP75のアミノ酸配列分析を行い、得られた配列情報に基づいてcDNAクローニングを行った。単離されたcDNAにコードされたアミノ酸配列から、CaNBP75は全長474残基、51,850 Daの蛋白質であると推測された。また、データベースを検索した結果、CaNBP75はC末端領域に低分子量GTPase蛋白質Ran結合モチーフを持つ新規蛋白質であることが明らかになった。C末端領域約200残基は、ヒトのRan結合蛋白質RanBP3のRan

結合領域と非常に高い相同性を示したことから、CaNBP75もRanの結合によって機能が制御されると推論した。

第4章ではCaNBP75の組換え蛋白質を用いた機能解析と、ホタテガイ組織での発現解析を行った結果を示している。CaNBP75変異蛋白質の大腸菌発現系を構築し、カルシニューリンとの相互作用を解析した結果、CaNBP75のN末端側205残基を含む領域がカルシニューリン結合能を示すこと、その作用点はカルシニューリンの触媒サブユニットであるCaNAであることを明らかにした。ノーザン法を用いた遺伝子発現解析とファーウエスタン法を用いた蛋白質発現解析により組織分布を調べた結果、カルシニューリンは各組織で普遍的に発現しているのに対し、CaNBP75の発現は組織特異性が高いこと、その発現量は精巣で特に高く、卵巣にも発現が見られたが、カルシニューリン発現量の多い筋組織では全く見られなことを示した。これに基づき、CaNBP75が精子変態、鞭毛の運動といった精巣特有の機能に加え、生殖細胞の減数分裂に関与する可能性についても考察した。

第5章ではCaNBP75の均質性について論じ、CaNBP75には少なくとも4種のアイソフォームが存在し、そのうち2種類は蛋白質として翻訳されていることを明らかにした。

第6章ではCaNBP75の生理機能、および精子形成過程でのカルシニューリンの生理機能について総合的に考察している。カルシニューリンおよびRanの局在に関する知見と、CaNBP75が精巣で高レベルに発現しているという結果に基づき、カルシニューリンは精子形成過程でRanと共同して機能しており、CaNBP75はこれを仲介する制御因子として機能する可能性を示した。また、CaNBP75がCrm1を介したカルシニューリンの核外移行過程で機能する可能性を示した。

以上のように、申請者は、精巣特異的なカルシニューリン結合蛋白質であるCaNBP75を発見しその性質を明らかにすることで、精巣でのカルシニューリンの生理機能解明の研究に新たな手がかりを与えることに成功した。本論文で述べられた成果は、精巣でのカルシニューリンの生理機能解明の研究を進展させ、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。