

学位論文題名

ホタテガイ精巣における Ran およびカルシニューリンの
機能に関する研究

学位論文内容の要旨

カルシニューリンは、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性のセリン/スレオニン特異的ホスファターゼである。この酵素は精巣で多く発現しており、精巣特異的アイソフォームが存在することが知られている。カルシニューリンはまた、精細胞の核や精子の先体後部に局在することや、精子形成に伴って発現量が変化することが報告されている。このため、カルシニューリンは精子形成に関与すると考えられているが、その具体的機能は未解明である。

精巣におけるカルシニューリンの機能を研究する過程で、カルシニューリン結合タンパク質 CaNBP75 がホタテガイ精巣より発見された。このタンパク質は、C末端側に哺乳類 RanBP3 と相同性を示す領域を持つことから、RanBP3 のホモログと考えられる。また、CaNBP75 はカルシニューリン結合能を持つのみならず、RanBP3 相同領域内に Ran 結合ドメインが存在し、Ran 結合能を有する。

Ran は低分子量 G タンパク質で、精子完成に伴って精細胞内での局在が変化することが報告されている。このことから、Ran もまた精子形成に関与していると考えられているが、具体的機能は未だ明らかではない。

本研究では Ran、CaNBP75 およびカルシニューリンが精子形成の過程で協同して働くことを仮定し、この仮定を検証することで、精巣における Ran およびカルシニューリンの機能解明に向けた新たな知見を得ることを目的とした。

精巣における Ran およびカルシニューリンの機能をホタテガイ精巣を材料に用いて検討するにあたり、はじめにホタテガイ Ran の cDNA 塩基配列を決定した。推定されたタンパク質一次構造の比較から、得られたホタテガイ Ran は多くの生物種の Ran と比較して高度に保存されていることを明らかにした。次に、ノーザンブロット法によりホタテガイ Ran mRNA 分子種の検討を行い、ホタテガイ精巣には単一の分子種の Ran が発現している可能性が高いことを明らかにした。さらに、マウスの Ran との比較により、この分子種はマウスの体細胞型の Ran に近いことも明らかにした。加えて、ホタテガイ精巣からの Ran の精製法を確立し、生化学的解析に必要なミリグラム量の Ran の精製を可能にするとともに、クローニ

ングにより得られた cDNA がコードする Ran とホタテガイ精巢に発現している Ran が同一のものであることも示した。

精巢で Ran、CaNBP75、カルシニューリンが協同して働く可能性を検証するため、ホタテガイ精巢における Ran の生殖周期に応じた発現量変化をノーザンブロット法により解析し、これまでに精子完成期に極大となることが明らかになっているカルシニューリンおよび CaNBP75 の発現量変化との比較検討を行った。その結果、Ran も生殖周期に伴って発現量が変化し、精子完成期に発現が極大になること、この変化は CaNBP75 やカルシニューリンの発現量変化とも一致することを明らかにした。これは、Ran、CaNBP75、カルシニューリンが精子形成の同時期に働くことを示唆するものであり、CaNBP75 の Ran、カルシニューリン結合能も考慮すると、これらのタンパク質が精子形成に協同して働く可能性を示すものである。次に、*in vitro* での Ran、CaNBP75、カルシニューリンの複合体形成能を GST pull-down 法により検討し、Ran、カルシニューリンが GST 融合 CaNBP75 に同時に結合しうることを示した。さらに、ホタテガイ精巢抽出液を用いた免疫共沈降法による複合体の検討より、生理的条件下でも CaNBP75 がカルシニューリンと Ca^{2+} 依存的に結合していること、Ran が CaNBP75 を介してカルシニューリンと複合体を形成することが示唆された。これは、Ran、CaNBP75、カルシニューリンは三元複合体を形成し、精子完成期の精巢で協同して働きうることを示すものである。

本研究の結果と、これまでに報告されている Ran とカルシニューリンの精子完成期の局在から、精子形成期の核でのカルシニューリンの機能及び精子先体後部での Ran およびカルシニューリンの機能についてのモデルを提唱した。これらの機能は、ホタテガイのみならず、哺乳類でも保存されているものと考えられる。

本研究は、低分子量 G タンパク質 Ran と、 Ca^{2+} シグナルの中心的役割を果たすタンパク質カルシニューリンが、精子形成において協同して働きうることを初めて示したものである。本研究で得られた知見やアプローチは、今後の精巢内での Ran、カルシニューリンの機能研究に寄与するものである。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	村 上 洋 太
副 査	教 授	坂 口 和 靖
副 査	教 授	石 森 浩一郎
副 査	准教授	高 橋 正 行

学 位 論 文 題 名

ホタテガイ精巣における Ran およびカルシニューリンの 機能に関する研究

博士学位論文審査等の結果について（報告）

カルシニューリンは、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性のセリン/スレオニン特異的ホスファターゼで細胞内で多彩な機能を果たしている。この酵素は精巣で多く発現しており、カルシニューリンは精子形成に関与すると考えられているが、その具体的機能は未解明である。先行研究でカルシニューリン結合蛋白質 CaNBP75 がホタテガイに精巣より単離され、この蛋白質がほ乳類の Ran 結合蛋白質 RanBP3 のホモログで Ran、カルシニューリン双方と結合することが示唆されていた。低分子量 G 蛋白質 Ran は蛋白質の核輸送や染色体制御に関与し、精子形成に関与することも示唆されていた。そこで本論文では Ran、CaNBP75、カルシニューリンが精子形成過程で協同して機能していることを仮定して、生化学的解析が容易なホタテガイを用いてその仮定の検証を試みた。

まずホタテガイの Ran が未同定であったことから、ホタテガイ精巣からの Ran の cDNA の単離をおこない、Ran 蛋白質の精製法を確立した。精子形成過程における Ran の発現変化を解析したところ、カルシニューリン、CaNBP75 と同様に、精子完成期に発現が極大となることを見だし、この三者の蛋白質が協同して働くことが示唆された。次に Ran、CaNBP75、カルシニューリンの複合体形成能について精製蛋白質を用いて *in vitro* で検証し、Ran、カルシニューリンが CaNBP75 に同時に結合しうることを示した。さらにホタテガイ精巣抽出液を用いた免疫沈降実験から、生理的条件下でも三者の複合体が存在することが示唆された。これは、Ran、CaNBP75、カルシニューリンは三元複合体を形成し、精子完成期の精巣で協同して働きうることを示している。

これを要するに、著者は Ran とカルシニューリンという細胞内で重要な因子が協同して働く可能性を初めて示した物であり、未知な点の多い精子形成過程の理解に寄与するだけでなく、より広範な生命現象での両蛋白質機能を理解する上でも大きく貢献することが予想される。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。