

氏名(本籍)	たけまさ 武政	とおる 徹(東京都)
学位の種類	理学博士	
学位記番号	博甲第717号	
学位授与年月日	平成2年3月23日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当	
審査研究科	生物科学研究科	
学位論文題目	Studies on the Genes for Three Kinds of Calcium-binding Proteins in <i>Tetrahymena</i> (テトラヒメナに存在する3種のカルシウム結合タンパク質の遺伝子の研究)	
主査	筑波大学教授	理学博士 渡邊良雄
副査	筑波大学教授	理学博士 平林民雄
副査	筑波大学助教授	薬学博士 岡田典弘
副査	筑波大学助教授	理学博士 鎌田博

## 論文の要旨

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は細胞運動を伴う多くの生命現象の重要な調節因子である。微小管系の細胞運動の代表例である繊毛・鞭毛運動も  $\text{Ca}^{2+}$  によって制御されており、繊毛虫テトラヒメナでは各種の刺激によって繊毛膜の脱分極がおこり  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが開いて  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、その情報が繊毛内微小管系運動装置に作用して繊毛逆転反応をひきおこす。しかし、実際に  $\text{Ca}^{2+}$  の情報を運動装置に伝える役割をになう  $\text{Ca}^{2+}$  受容(結合)タンパク質やその作用機序は未だ解明されるに到っていないかった。

著者はこの点に着目し、テトラヒメナの  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質の同定と性状を検討するため、遺伝子解析を試み、結果的にテトラヒメナ  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質25KDa (TCBP-25),  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質23KDa (TCBP-23), テトラヒメナカルモデュリン (CaM) の3種のCaMファミリーに属するタンパク質の遺伝子のクローニングとシーケンシングに成功し、それらの実体を初めて明らかにした。以上に得られた結果を要約する。

### I. TCBP-25遺伝子

$\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質の単離に用いられる  $\text{Ca}^{2+}$  依存フェニール・セファロース・カラムで分離されたTCBP-25の断片のアミノ酸配列結果を基に、オリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとしてテトラヒメナのゲノムDNA及びcDNAライブラリーよりTCBP-25遺伝子をクローニングすることに成功し、その遺伝子の全ヌクレオチド配列を決定し、以下のことを明らかにした。(i) 遺伝子のOpen Reading Frame (ORF) は218個のアミノ酸をコードし、分子量は24,702と算定され、im-

munoblot で検出した25KDa タンパク質 (TCBP-25) と合致した。(ii) ゲノム DNA には2つの introns の存在があった。(iii) 一般の生物で終止コドンとして認識されている TAA コドンがテトラヒメナではグルタミンをコードしていることを初めて直接証明した。(iv) TCBP-25は4つの EF-hand 型  $Ca^{2+}$ -binding domains をもつ CaM ファミリーに属する  $Ca^{2+}$ 結合タンパク質であることが判った。(v) Southern 及び Northern hybridizations の結果から、テトラヒメナには1種類の TCBP-25 遺伝子が存在し、0.94Kb の mRNA を active に転写していることが判った。(iv) homology search の結果、TCBP-25は既存のどの  $Ca^{2+}$ 結合タンパク質とも相同性が低く、 $Ca^{2+}$ -binding domains 間の距離が非常に長い特異な構造をもつ新タンパク質であることが判明した。

## II. TCBP-23 遺伝子

$Ca^{2+}$ 依存フェニール・セファロース・カラムで TCBP-25とは違った  $Ca^{2+}$ 結合タンパク質の断片が copurify されることに気づき、そのアミノ酸配列を参考に、オリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブにして cDNA ライブラリーから TCBP-23 遺伝子のクローニングとシーケンシングに成功した。(i) 決定された763塩基の中には唯一の ORF が存在し、207個のアミノ酸をコードし、このタンパク質の分子量は23,413と算定された (TCBP-23)。(ii) 塩基配列とアミノ酸配列の照合から、TAA のみならず、TAG もテトラヒメナではグルタミンをコードしていることを直接証明した。

(iii) TCBP-23も EF-hand 型  $Ca^{2+}$ binding domain のコンセンサスと完全に一致する4つの domains をもつ CaM ファミリーに属する  $Ca^{2+}$ 結合タンパク質であることが判った。(iv) TCBP-23の遺伝子もゲノム中に1種存在するが、明らかに TCBP-25のそれとは異っていた。(v) TCBP-23 遺伝子と較べると20%という低いレベルで0.84Kb の transcript を発現していることが判った。(vi) TCBP-23は既存の全てのタンパク質とは相同性が低いが、TCBP-25とは全長に渡って35%の相同性を示し、同じ祖先型タンパク質から進化したことをうかがわせた。

## III. CaM 遺伝子

*Tetrahymena thermophila* の CaM 遺伝子のクローニングは *T. pyriformis* で既に知られているアミノ酸配列を参考に合成したオリゴヌクレオチドをプローブにして行った。(i) 解析した707塩基のうち ORF が1つあり、149個のアミノ酸をコードし、分子量は16,670と算定された。(ii) *T. thermophila* と *T. pyriformis* は同属でありながら、その CaM には4つの置換と1つの挿入があることが判った。(iii) CaM 遺伝子もゲノム中1種で、0.72Kb の transcript が検出され、発現量は TCBP-23のそれと同程度であった。

## 審 査 の 要 旨

著者は繊毛虫テトラヒメナに CaM のほか2つの CaM ファミリーに属する全く新しい  $Ca^{2+}$ 結合タンパク質が存在することを遺伝子解析で明らかにした。このような報告は下等真核生物では初めてのものであり、原生動物の遺伝子の構造と発現を明らかにしただけでなく、繊毛運動制御機構を始めとする  $Ca^{2+}$ 制御機構の研究にとって大変重要な新真実を提供したものである。今後、これらの遺

伝子を用いて、Ca<sup>2+</sup>受容タンパク質間の機能分担・機能協力関係が明らかにされる道がひらかれてきた。本研究成果はすでに世界的に注目されており、この研究分野の将来の発展に大きな貢献をもたらす基礎を築いたものとして高く評価される。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。