

氏名(本籍)	おおにしじゅんこ 大西淳子(東京都)
学位の種類	理学博士
学位記番号	博甲第595号
学位授与年月日	昭和63年10月31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	Roles of Calmodulin-Binding Proteins in Ca^{2+}-Regulation of Ciliary Motility in <i>Tetrahymena</i> (テトラヒメナの繊毛運動の Ca^{2+} 制御におけるカルモデュリン結合蛋白質の役割)
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 内藤豊
副査	筑波大学教授 理学博士 平林民雄
副査	筑波大学教授 理学博士 藤伊正

論 文 の 要 旨

微小管系が関与する細胞運動の代表例としてよく研究されている繊毛・鞭毛運動は、微小管に結合したダイニン ATPase の発生する力で微小管相互に滑りが生じ、滑りは屈曲に変換されて繊毛・鞭毛打が形成されることが明らかになっている。この運動系には Ca^{2+} 依存性の制御反応、例えば繊毛逆転反応などの誘起が知られており、その制御反応機構の解析は分子生物学の重要な課題となっている。最近、その制御反応の調節因子としてカルモデュリン (CaM) が注目されてきた。しかし、繊毛逆転反応における CaM 直接的関与を示す報告は少なく、さらに CaM の作用機序については、これまでほとんど明らかではなかった。

著者は、繊毛打の Ca^{2+} 制御機構における CaM の役割を明らかにすることを目的に、テトラヒメナ繊毛内で CaM と結合し波型変換をひき起こすと考えられる CaM 結合蛋白質 (CaMBPs) を検出し、それらの性状を調査し、繊毛逆転反応における CaMBPs の機能を十分に示唆しうる新しい知見を得た。以下にその成果を述べる。

- (1) CaMBPs 検出法としてこれまで用いられてきた gel overlay 法は、 ^{125}I -CaM のオートラジオグラフと蛋白質の染色パターンが正確に対応づけられないなどの欠点があった。著者はニトロセルロース膜上で ^{125}I -CaM と CaMBPs と反応させる諸条件を検討し、より優れた解析ができる改良法を確立した。この改良法を用いて、テトラヒメナ繊毛全体及び膜・基質、粗ダイニン、周辺小管の3分画について CaMBPs の存在を調べ、1 mM Ca^{2+} 存在下で少なくとも36種の

CaMBPs が検出されることを示した。これらの CaMBPs と CaM との結合は、すべて Ca^{2+} 依存的でかつ CaM 特異的であることも示した。

CaMBPs と CaM との反応時の Ca^{2+} 濃度を 10^{-7}M から 10^{-3}M まで変化させて結合の性質を調べてみると、低 Ca^{2+} 濃度で CaM と結合できるもの、 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴って結合が強くなるもの、高 Ca^{2+} 濃度になると結合しはじめるものなど CaMBPs は $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ との結合性状から幾つかに分類できることが判った。このことは、 Ca^{2+} 濃度の微妙な変化に対しておこる繊毛の複雑な反応に CaM と CaMBPs の多様な結合が関与している可能性が考えられた。

- (2) 著者は繊毛内に多種類検出された CaMBPs を native な状態で回収するため、繊毛全体と膜・基質、粗ダイニン、周辺小管の各分画を可溶可して CaM 親和カラムにかけ、 Ca^{2+} 依存的に吸着された蛋白質 (CaMBPs) を調べた結果、量的に多い CaMBPs のほとんどが周辺小管分画に由来することが判った。繊毛打の Ca^{2+} 制御は脱膜し周辺小管を主体とした繊毛運動モデルにも Ca^{2+} 感受性があるので、周辺小管分画に検出された CaMBPs の性状を知ることは Ca^{2+} 制御機構を知る上で重要であった。しかし、周辺小管の CaMBPs の回収率、ゲル濾過での溶出位置、EPC カラムでの行動等から、CaMBPs の多くがチューブリン二量体や微小管と結合している可能性が示唆された。

そこで、CaMBPs と微小管との相互作用を再構成 (共沈) 実験で調べたところ、少なくとも 3 種の CaMBPs (Mr69, 45, 37 kD) は明らかに微小管に結合すること、さらに他の 3 種の CaMBPs (Mr30, 26, 22 kD) があらかじめ微小管に組み込まれていることが判った。これらの CaMBPs は Ca^{2+} の流入時に CaM の格好の標的となると考えられ、しかもごく僅かな量しか存在しないことから、 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 依存性酵素として制御反応に働いている可能性が考えられた。

- (3) テトラヒメナ繊毛内の CaMBPs のいずれかが燐酸化または脱燐酸化酵素として役割を果している可能性があったので、 Ca^{2+} 依存的にそれらの酵素の基質となる蛋白質を繊毛軸系内で調べた。その結果、燐酸化、脱燐酸化酵素とも高い活性が認められたが、脱燐酸化は全て $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 非依存的な反応であった。しかし、燐酸化については、 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ によりラベルされた 60 余の燐酸化ペプチドのうちチューブリン β -サブユニットのみが $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 依存的に燐酸化されることが判った。この $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ チューブリン燐酸化酵素は周辺微小管に親和性をもち、しかも脱膜運動モデルにも活性が高いことが判った。

以上のことから、*in vivo* でも膜の脱分極によって流入される Ca^{2+} による繊毛逆転時に、CaM と CaMBPs 依存的な β -チューブリンの燐酸化がおき繊毛打の波型変換がおこる可能性が示唆された。

審 査 の 要 旨

微小管系の細胞運動の Ca^{2+} 制御機構の解析は繊毛・鞭毛運動ばかりでなく、核分裂時の染色体の極への移動等の重要な生命活動を理解する上で大切である。著者は繊毛運動の Ca^{2+} 制御機構を Ca^{2+}

+受容体であるカルモデュリンやそれと結合して機能すると考えられる CaMBPs について、数々の実験を試み、それらの機能を明らかにし、繊毛逆転反応機構に係る示唆に富んだ数多くの新事実と新しい考えを提供した。これらの著者の業績はこの分野の将来の発展に大きな貢献をもたらすものであり、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があるものと認める。