

氏名(本籍)	は にゅう かづこ 羽 生 加津子 (茨城県)
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	博 甲 第 1,628 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Immunocytochemical Studies on the EF-Hand Calcium-Binding Proteins in <i>Tetrahymena thermophila</i> (テトラヒメナ EF ハンド型カルシウム結合タンパク質の免疫細胞化学的手法を用いた研究)
主 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 鎌 田 博
副 査	筑波大学教授 理学博士 高 橋 三保子
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男
副 査	筑波大学助教授 理学博士 沼 田 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

カルシウム結合タンパク質は細胞内でカルシウムイオンを受容し、細胞内情報伝達系の出発点となるタンパク質である。中でも EF ハンド型結合部位をもつ一連のタンパク質は、その機能が明らかにされているものもあるが、まだ具体的機能が明らかにされていないものが多い。

本論文において、著者はまず原生動物繊毛虫のテトラヒメナで二つの EF ハンド型カルシウム結合タンパク質、TCBP-23 と TCBP-25 を大腸菌で大量発現させることを試みた。これらはいずれも遺伝子がクローニングされていながら、細胞からの直接精製が困難なためタンパク質として単離されておらず、機能も明らかにされていないものである。繊毛虫は終止暗号である TAA と TAG をグルタミンとして用いているので、まず遺伝子内にあるそれらのコドンで site-directed mutagenesis でグルタミンコドンである CAA と CAG に変換し、大量発現に成功した。大腸菌で発現されたこれらのタンパク質は、EF ハンド型カルシウム結合タンパク質の性質であるカルシウム依存的な立体構造の変化を示唆し、カルシウム結合能も確認された。

次に、大腸菌で発現された TCBP-23 と TCBP-25 をウサギに免疫し、それぞれのタンパク質に特異的な抗体を作成した。蛍光抗体法及び免疫電顕法を用いて細胞増殖期と有性生殖過程における TCBP-23 と TCBP-25 の局在を検討した。TCBP-23 と TCBP-25 はともに、細胞の口部装置と繊毛基部を除く細胞表層に、全生活環を通じて局在することを確認した。この局在は界面活性剤 NP-40 で処理した細胞でも確認された。さらに、免疫電顕では、TCBP-25 は細胞表層を構成する表層細胞質に存在することを確認し、表層のカルシウム貯蔵部位からカルシウムイオンを受容し細胞機能に関っていることを示唆した。

テトラヒメナの接合過程では複雑な核変化が順序正しく進行する。接合した二つの細胞がそれぞれ 2 個の配偶核を形成し、細胞の接着面で一つをお互いに交換する時、TCBP-25 は移動する核を取り囲む局在を示した。その前後には全く局在は確認されず、時期特異的であることを示し、核の移動にカルシウム依存的な過程が存在すること、その過程に TCBP-25 が寄与していることを示唆した。

審査の結果の要旨

本研究は原生動物繊毛虫テトラヒメナで、これまで遺伝子はクローニングされていたが、具体的な細胞機能が全く明らかにされていなかった TCBP-23と TCBP-25を大腸菌で発現されることに成功し、全生活環を通してどのように局在しているかを示したものである。カルシウム依存的な細胞機能は種々報告されているが、本研究は細胞表層で行なわれる繊毛運動やエクソサイトーシスなどに TCBP-23と TCBP-25が深く関わっていること、また、接合時には核の移動に TCBP-25が関わっているということを強く示唆したものである。核の移動にチューブリン以外のタンパク質が関与していることを示した初めての知見である。カルシウム結合タンパク質は、情報伝達系の出発点として働くタンパク質であり、中でもカルモジュリンで代表される EF ハンド型カルシウム結合タンパク質の機能は、現在注目されているところである。著者が明らかにした結果は EF ハンド型カルシウム結合部位をもつタンパク質の具体的な機能を明らかにする、重要な知見であると高く評価できる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。