

【169】

氏 名（本籍）	うえ の ひろ のり 上 野 裕 則（茨 城 県）		
学 位 の 種 類	博 士（理 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 3716 号		
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 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	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Identification and Characterization of Calmodulin-Binding Proteins in <i>Tetrahymena</i> Cilia (テトラヒメナの繊毛におけるカルモデュリン結合蛋白質の同定と性状)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治
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	林 純 一
副 査	筑波大学助教授	理学博士	吉 村 建二郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

繊毛・鞭毛は様々な真核生物に存在し、波打ち運動をする細胞内小器官である。2本の中心対微小管とそれを取り囲む9本の周辺微小管によって形成されている。繊毛・鞭毛運動は Ca^{2+} 濃度依存的にその運動性を劇的に変化させることが知られているが、その制御機構についてはいまだに未知のままである。上野氏は Ca^{2+} 濃度依存的に起こる繊毛・鞭毛運動の変化の情報伝達経路を明らかにするために、 Ca^{2+} 結合蛋白質であるカルモデュリン（CaM）に着目した。CaMは多くの生物の繊毛・鞭毛内に存在していることが明らかとなっているが、その機能についてはほとんど明らかになっていない。上野氏は繊毛・鞭毛内におけるCaMの情報伝達経路が繊毛・鞭毛運動の Ca^{2+} 制御機構を担っていると考え、繊毛内でのCaMの標的蛋白質の発見をめざした。

まず最初に、抗テトラヒメナCaM抗体を用いた免疫電子顕微鏡法によって繊毛内におけるCaMの局在を詳細に検討し、CaMが軸糸微小管上、ラジアルスポークの基部側と一部先端付近に局在することを明らかにした。次に Ca^{2+} /CaMの情報伝達経路を解明するために、 Ca^{2+} /CaM親和性カラムを用い、繊毛内の Ca^{2+} /CaM結合蛋白質の網羅的な解析を行った。テトラヒメナから繊毛を単離し、それを膜マトリックス分画、粗ダイニン分画に分け、各分画における Ca^{2+} /CaM結合蛋白質の探索を行った。その結果、膜マトリックス分画ではペプチド伸長因子1 α （EF-1 α ）が Ca^{2+} /CaMの標的蛋白質であることを発見した。EF-1 α はGTP結合蛋白質であり、主にリボソーム上で蛋白質合成に関与している蛋白質である。しかし、近年EF-1 α がアクチンや微小管などの細胞骨格系と相互作用することが明らかになっている。特に微小管に関しては、EF-1 α が微小管を構成する β チューブリンと直接結合すること、微小管の重合核形成や束形成、微小管の安定化などに関与することが知られている。繊毛内では免疫電子顕微鏡法によって、EF-1 α が周辺微小管及び中心対微小管上に局在していることが判った。EF-1 α は Ca^{2+} /CaMと直接結合することから Ca^{2+} /CaMと軸糸微小管を仲介すること、また、軸糸微小管を安定化することにより、繊毛の形成や維持に関わっていることが推測される。

次に粗ダイニン分画（外腕ダイニン、内腕ダイニン、中心対構造、ラジアルスポークの含まれる分画）に

における Ca^{2+} /CaM結合蛋白質の解析を行った。その結果、116kDa, 66kDa, 62kDa, 33kDa, 30kDaの Ca^{2+} /CaM結合蛋白質を得ることができた。これらの Ca^{2+} /CaM結合蛋白質の中で強くCaMと結合している66kDa蛋白質 (p66), 62kDa蛋白質 (p62)に着目した。それぞれの蛋白質の遺伝子をクローニングした結果、p66とp62はラジアルスポークの頭部を構成する蛋白質と相同性が高いことが明らかとなった。繊毛・鞭毛が波打ち運動を生み出す際、微小管上に規則的に並んだダイニンは空間的、時間的に高度に制御されており、この調節に中心対構造やラジアルスポークが関与していると考えられている。ラジアルスポーク頭部のp66, p62に Ca^{2+} /CaMが相互作用することを明らかにした本研究成果は、 Ca^{2+} /CaMとp66, p62との結合によって中心対微小管とラジアルスポーク頭部との相互作用が変換し、繊毛運動の波形が変化することを示唆している。まさに、上野氏の研究成果は Ca^{2+} による波形変換機構の分子機構解明の糸口になるものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

内藤豊筑波大学名誉教授がゾウリムシの繊毛打の逆転が Ca^{2+} によって調節されていることを明らかにして以来、繊毛・鞭毛運動の波形変化が Ca^{2+} 濃度依存的に調節されていることは多くの生物で知られるようになった。しかし、繊毛・鞭毛運動の Ca^{2+} による制御機構は未知のままであった。上野氏は繊毛内に多く存在するCaMに着目し、CaM親和性カラムを用いてCaM結合タンパク質の同定分離を試み、EF-1 α とラジアルスポークヘッドの2つのタンパク質、p66とp62がCaMの標的タンパク質であることを発見した。EF-1 α が繊毛に存在することは世界で初めての発見である。また、 Ca^{2+} 濃度依存的に引き起こされる繊毛・鞭毛運動の波形変化にはダイニスが重要な役割を担っている。このダイニスの制御には中心対微小管とラジアルスポークの相互作用が重要であるという説が提唱されており、現在その研究が世界中で進められている。したがって、ラジアルスポーク頭部のp66, p62に Ca^{2+} /CaMが相互作用することを世界に先駆けて明らかにした上野氏の研究成果は繊毛・鞭毛運動の波形変化の分子機構の解明に多大な貢献をするものであり、その学問的な価値は非常に高いと判断される。

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。