

氏名(本籍)	おの野富男 (長野県)			
学位の種類	農学博士			
学位記番号	博甲第367号			
学位授与年月日	昭和61年3月25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	農学研究科			
学位論文題目	Biochemical Studies on Caldesmonin : a Heat-stable Calmodulin-binding Protein in Male Reproductive System and Central Nervous System			
主査	筑波大学教授	農学博士	新井勇治	
副査	筑波大学教授	農学博士	鈴木 恕	
副査	筑波大学教授	農学博士	今川 弘	
副査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄	

## 論文の要旨

カルシウムイオンは、筋収縮、細胞運動、繊毛・鞭毛運動、細胞分裂、ホルモン作用、酵素作用等の調節をしており、細胞内情報伝達物質の一種である。これらの調節作用はそのほとんどがカルシウム受容蛋白質であるカルモジュリン (CaM) とそれにより機能が調節されるカルモジュリン結合蛋白質 (CaMBP) を介して発現されると考えられている。

CaMは真核生物では普遍的に分布しており、特に哺乳類では脳と精巣に多量の存在が知られている。しかし、精巣でのCaMの役割については殆ど知られていない。

本論文では、精巣でのCaMの役割を明らかにするため、まずCaMBPの検索を行っている。その結果、新しい耐熱性CaMBP (カルスベルミン) を発見し、その性質を明らかにした。ついで、このカルスベルミンの特異抗体を用いてRIA系を作成し、組織内分布を調べている。

1. 「CaMBP (カルスベルミン) の同定」においては、ラット精巣のホモジネートについてcyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) の阻害活性物質として検索を行っている。カルスベルミンは、抽出液を加熱処理、DEAE-celluloseクロマトグラフィー、および調製用電気泳動をすることにより約940倍に精製された。このカルスベルミンの分子量はSDS電気泳動法で32,000、直線濃度勾配電気泳動法で40,000であった。

グルタルアルデヒドによるcross-linkの結果より、この蛋白質は単量体であり、Ca<sup>++</sup>依存性にCaMと1:1に結合することが示唆された。また、このCa<sup>++</sup>依存性結合はOrstein-Davis法に

よる電気泳動からも証明された。カルスベルミンはPDEのCaMによる活性化だけを阻害し、PDEの基礎活性には影響しなかった。この阻害活性は高濃度のCaM添加により消失したが、高濃度のCa<sup>++</sup>添加では消失しなかった。また、カルスベルミンはPDEのみではなくヒト赤血球膜のATPaseのCaMによる活性化も阻害した。カルスベルミンは9分間までの煮沸処理あるいは1NHCl中での4°C、12時間の処理に対して安定であり、活性を100%維持した。しかし、キモトリブシンおよびトリブシンで処理することにより失活した。以上の結果から、カルスベルミンがこれまでに報告されていない新しいCaMBPであると同定している。

2. 「カルスベルミンの精製」においては、大量に得ることを目的として、ブタ精巣を材料として精製を試みている。ブタ精巣390gより、熱処理、DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィー(酢酸塩緩衝液, pH5.5), CaM-sepharoseカラムクロマトグラフィー(100~0.1 μM Ca<sup>++</sup>により溶出)を行い、収率47%で1.62 mgの蛋白質を得ている。精製したカルスベルミンの比活性は30,200units/mg pro.で、粗抽出液に対して3,670倍に精製されている。純化したカルスベルミンの均一性はOrstein-Davis法による電気泳動およびLaemmli法によるSDS電気泳動で単一バンドを示したことから証明された。精製カルスベルミンの等電点はpH3.9であり、A1%275nmの値は4.98であった。また、Stokes半径はCaMとの結合型が41.3Å、解離型が39.5Åであった。さらに、S<sub>20w</sub>は1.43Sであり、SDS電気泳動で求めた分子量(32,000)とこの値から求めたfrictional ratioは1.89であった。この値から、カルスベルミンは非対称形であることが推測された。

ラット、カルスベルミンとブタ、カルスベルミンは、SDS電気泳動上では区別できなかった。

3. 「カルスベルミンのRIA」においては、その組織内および細胞内の分布を検討している。まず、精製したブタ、カルスベルミンを家兎に免疫し、特異抗体を作成している。この抗体はブタ、カルスベルミンと強く反応したが、ラット、カルスベルミンとの交差性は乏しく、また他のCaMBPであるPDEやカルシノイリンとは反応しなかった。この特異抗体を用いて、0.5ng/assayを測定限界とする鋭敏なRIA系を作成し、カルスベルミンの組織分布および細胞内分布を検討した。カルスベルミンは精巣、精子および中枢神経系にのみ分布し、他の組織には殆ど検出されなかった。精巣のカルスベルミン含量は10±0.79 μg/g. tissueであり、その88%が細胞質画分に存在した。一方、脳の含量は8.91±2.25 μg/g. tissueであり、その74%は顆粒画分に存在した。ついでCaMおよびカルスベルミンの精巣における生理学的意義の可能性について検討している。精巣のCaM含量は出生直後から25日までは低い値であったが、その後45日にかけて急激に増加し、成熟ラットのレベルに達した。カルスベルミンは生後30日までは測定感度以下の低値を持続したが、35日以降急激に増加した。成熟ラットの精巣のCaMおよびカルスベルミンはそれぞれの94%、95%が精細管に分布した。精細管に存在するCaMの92%は105,000g遠心後の上清に、カルスベルミンの96%が同画分に存在した。副精巣中のCaMおよびカルスベルミン含量は、精巣中の含量に比べて著しく低い値であった。CaMおよびカルスベルミンは生後35日前後より急激に含量が増加したが、この時期は精母細胞の減数分裂および精子完成が開始される時期である。したがって、これらの結果から、CaMとカルスベルミンは主として成熟した精細胞(精子細胞と精子)に存在する

ことが推測された。また、30日間の腹腔睾丸により105,000g上清画分のCaM含量は27%に、カルスペルミン含量は術後3日で13.3%に低下した。下垂体摘除ラットでは、術後37日後には上清画分のCaM含量は対照(SHAM)の約64%に、またカルスペルミン含量はSHAMの約8%に低下した。FSHおよびテストステロンは減少したCaMおよびカルスペルミンを有意に回復することはできなかった。腹腔睾丸あるいは下垂体摘除による精巣萎縮の発現にともない、精子細胞と精子が消失することが知られている。したがって、CaMおよびカルスペルミンが主に成熟精系細胞に局在していることを推測している。

## 審 査 の 要 旨

現在、カルシウムイオンの関与する生理機能の多くは、カルシウム受容蛋白質であるカルモジュリンとそれにより機能が調節されるカルモジュリン結合蛋白質(CaMBP)を介して発現されると考えられている。カルモジュリンは、哺乳類では脳と精巣に多く存在することが知られている。脳に関する研究は非常に多いが、精巣については殆ど報告がない。

著者は、研究の遅れているこの分野に注目し、新たなカルモジュリン結合蛋白質、カルスペルミン、を発見した意義は大きい。また、カルスペルミンを精製し、その諸性質を明らかにしたことは十分に評価される。

RIAにより、カルスペルミンが主として精巣、精子および中枢神経系に存在することを明らかにしている。なお、これらの組織ではカルスペルミンの存在様式が異なり、精巣ではそのほとんどが細胞質画分に存在するのに対して、中枢神経系では大部分が顆粒画分に存在することを観察したのも本研究が最初である。さらに、腹腔睾丸および下垂体摘除により、ラット精巣内のCaMおよびカルスペルミンが減少すること、両蛋白質含量が精子形成および精子完成の時期に同調して増加すること、両蛋白質の大部分が精細管に分布していること等を明らかにしたことは、生理学上極めて大きな意義があると思われる。

よって著者は農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。