

[375]

氏 名（本籍）	佐 藤 真奈美（新 潟 県）		
学 位 の 種 類	博 士（理 学）		
学 位 記 番 号	博 乙 第 2411 号		
学位授与年月日	平成 21 年 1 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Analyses of the Regulation of Coccolith Production by Environmental Factors and a Protein Associated with Coccolith Production by a Coccolithophorid, <i>Emiliana huxleyi</i> (円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> における環境要因によるココリス形成制御およびココリス形成関連タンパク質の解析)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博
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	渡 邉 信
副 査	筑波大学教授	理学博士	濱 健 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

生物が能動的にその形成に関与して合成された鉱物は、無機的な鉱物形成によっては形成されない特異な結晶構造を有する。生物が何らかの形で関与する鉱物形成作用機構（バイオミネラリゼーションと呼ぶ）は生物学的のみならず、材料工学的にも注目されている。海産微細藻類である円石藻はバイオミネラリゼーションによって炭酸カルシウムを主成分とする構造体（ココリス）を細胞内で形成し、それを細胞表層にまで運搬し細胞殻として保持する。

本研究は、円石藻 *Emiliana huxleyi*（ハプト植物門）のココリス形成が促進される培養条件を解明し、さらにその結果をもとに、ココリス形成促進時期に新規合成量が増加するタンパク質を同定・解析することにより、ココリス形成に関わる分子機構の解明を試みたものである。

E. huxleyi では低温ストレスを与えることによってココリス形成量が増加することを ^{45}Ca 取り込み量（ココリス形成量）の測定により明らかにした。直線増殖期前期の細胞をほぼ至適温度（20℃）から低温条件（12℃）に移した。このとき培地中のリン酸濃度は、培養開始後 3 日以内に検出限界以下になり、それに伴い AP 活性（リン酸欠乏により誘導される分子マーカー）の誘導が確認された。ココリス形成量は低温条件移行後 2 日から 3 日の間に増加しはじめ、移行後 6 日目（培養開始 7 日）には 5.6 倍になっていた。また、直線増殖期前期の細胞をリン酸培地とリン酸欠乏培地に移すと、細胞は 2 日以内に定常期に達し、AP 活性の誘導およびココリス形成の促進が観察された。このときココリス形成の促進はリン酸塩の添加によって抑制された。これらの結果から、ココリス形成は低温条件およびリン酸欠乏条件の両方で促進されることが示されたが、低温条件（12℃）下であってもリン酸の過剰投与によってココリス形成が抑制されたことから、低温はココリス形成の絶対誘導条件ではなく、促進条件であることを明らかにした。

次に、リン酸欠乏条件によるココリス形成促進時の新規合成タンパク質を ^{35}S -ラベル法によって検出し、106-kDa, 84-kDa, 43.5-kDa, 33-kDa, 32-kDa, 28-kDa および 26-kDa のタンパク質を得た。低温によるココ

リス形成促進条件では、32-kDa タンパク質の割合が上昇していた。低温条件下で培養した細胞から抽出した可溶性タンパク質画分を得て、アセトン沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーによって当該 32-kDa タンパク質の粗精製を行い、濃縮精製した。次に、二次元電気泳動法により、低温誘導 32-kDa タンパク質とリン酸欠乏誘導 32-kDa タンパク質が同一のものであることを確認した。

以上の結果を元に、低温処理細胞から 32-kDa のタンパク質を精製し、N 末端アミノ酸配列を決定した。その配列を EST データベース検索およびゲノムデータベース検索にかけた結果、推定分子質量 21767-Da、予想等電点 4.7 の一種類の推定アミノ酸配列が得られた。したがって、リン酸化およびグリコシル化などの何らかの翻訳後修飾があることが予測された。推定分子質量およびこの配列が FK506-binding protein (FKBP) の保存領域を有したことから、このタンパク質を EhFKBP21 と名づけた。FKBP はプロリンのイミド結合の *cis* と *trans* を変換する活性をもつペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ (PPIase) の一種であり、生物間で高度に保存されている。EhFKBP21 は N 末端にシグナルペプチドを有し、開裂部位は実験的に決定された N 末端配列の直前であると予測されたことおよび C 末端側に小胞体残留シグナル KDEL 配列を有することから小胞体局在性のタンパク質と予測した。EhFKBP21 の FKBP 保存領域の C 末端側には EF-hand motif が存在した。EF-hand motif はカルシウム結合モチーフであり、シグナル伝達に参与するタンパク質およびカルシウムの緩衝や輸送に関連するタンパク質に存在することが知られている。EhFKBP21 と同様に EF-hand motif を有する FKBP の機能解析はマウスの FKBP23 について行われており、このタンパク質は EF-hand motif がある C 末端配列を介してカルシウム濃度依存的に標的タンパク質である BiP (immunoglobulin heavy-chain binding protein) に結合し、その ATPase 活性を調節することが明らかにされている。また、小胞体局在 FKBP は小胞体におけるタンパク質の品質管理機構に関係していると考えられている。これらのことから EhFKBP21 もカルシウム濃度依存的に機能し、タンパク質の品質管理機構に関係すると予測した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究ではリン酸欠乏がココリス形成促進の独立的な主誘導要因となる一方で、低温ストレスはココリス形成を促進するための独立的な誘導要因とはならず、ココリス形成を促進する二次的要因であることを明瞭な生理実験的証拠で明らかにした。この成果はバイオミネラリゼーションの制御に関する生理学および地球環境に多大な影響を与える円石藻ブルームに関する海洋生態学的研究に対して重要な知見を与えるものと認められる。さらに、ココリス形成促進条件下で合成量が増加するタンパク質を同定し、EhFKBP21 と名付けた。ココリス形成機構と EhFKBP21 の関連の詳細はいまだ不明のままであるが、誘導制御機構を共有している可能性があり、EhFKBP21 の発見は、ココリス形成制御条件の解明につながる重要な成果と認められる。

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。