

氏名(本籍)	水野克俊(岐阜県)			
学位の種類	博士(理学)			
学位記番号	博甲第5711号			
学位授与年月日	平成23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	<b>Molecular Characterization and Functional Analysis of a Novel Calcium Binding Protein Calaxin from Sperm Flagella in the Ascidian <i>Ciona intestinalis</i></b> (カタユウレイボヤ精子鞭毛の新規カルシウム結合タンパク質カラクシンの同定および機能解析)			
主査	筑波大学教授	理学博士	稲葉一男	
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田治	
副査	筑波大学教授	博士(理学)	和田洋	
副査	筑波大学准教授	理学博士	齊藤康典	

### 論文の内容の要旨

真核生物の繊毛、鞭毛は9+2対の微小管、分子モーターダイニンの他、200以上のタンパク質からなる複雑な運動装置であり、原生生物から多細胞動物にいたるまで高度に保存された構造をもつ細胞小器官である。これらは遊泳、食物の輸送、異物の排除など生命現象において多様な役割を担う。特に精子においては鞭毛による遊泳運動が受精の成立に必須である。精子鞭毛は細胞外の走化性物質に応答し、鞭毛の対称性、非対称性を変化させ、細胞運動方向を変化させる。これらの鞭毛波形変化は $Ca^{2+}$ によって軸系ダイニンによる微小管の滑りが変化することにより起こると考えられ、この過程には何らかの $Ca^{2+}$ 結合タンパク質が関与すると推測される。しかし、今まで精子においては軸系ダイニンに直接関係する $Ca^{2+}$ 結合タンパク質は明確に同定されておらず、長年 $Ca^{2+}$ による制御の分子的な実体は不明であった。本研究では鞭毛波形制御に関わることが強く示唆されるカルシウム結合タンパク質カラクシンを新規に同定し、その機能解析を行った。

カラクシンはホヤ精巢cDNAライブラリに対する鞭毛軸系タンパク質抗体によるイムノスクリーニングにより得られた、軸系に存在するカルシウム結合タンパク質であり、3つのEF-handモチーフからなる。他の軸系内 $Ca^{2+}$ 結合タンパク質とは異なりカルモジュリンとは類縁性をもたず、Neuronal Calcium Sensor (NCS)タンパク質ファミリーに属することが分子系統的解析から明らかとなった。さらに抗体を用いた研究から、カラクシンはホヤの組織でも精子の他、鰓などの繊毛が多く生えている組織に存在していること、カタユウレイボヤ精子の鞭毛の外腕ダイニンの近傍に位置することが明らかとなった。また、ファーウエスタンブロットティングの結果、カラクシンは $Ca^{2+}$ 依存的に分子モーターである外腕ダイニン $\beta$ 重鎖、中間鎖IC2、 $\beta$ -チューブリンに結合することが明らかとなった。外腕ダイニンに $Ca^{2+}$ 依存的に結合する性質から、カラクシンが $Ca^{2+}$ 依存的な鞭毛波形制御、さらには精子走化性時の運動制御に大きな役割を果たしている可能性が強く示唆され、さらに以下に述べる解析を行った。

外腕ダイニンの滑りに対してカラクシンがどのように機能するかを明らかにするため、微小管滑りアッセ

イによる解析を行った。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  を含む条件下においても微小管の滑り速度は変化しなかったが、外液にカラクシンを添加すると  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で滑り速度が著しく減少することがわかった。すなわち、カラクシンが  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な外腕ダイニンによる微小管滑り運動に調節に直接関与することが示された。

NCS ファミリー  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質に特異的な拮抗阻害効果をもつ repaglinide を共有結合させたセファロースビーズを用いた実験の結果、repaglinide がカラクシンと  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合することが明らかとなった。さらに、repaglinide を用いて、精子鞭毛運動や精子走化性におけるカラクシンの機能を解析したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的な鞭毛波形の非対称化が repaglinide 処理によって失われることが明らかとなった。また、repaglinide 処理により、精子の走化性が有意に阻害されることが示された。鞭毛内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの結果、鞭毛波形に異常が見られるにもかかわらず、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化は正常に起こっている様子が観察された。

以上の結果から、カラクシンは精子鞭毛軸系におけるカルシウムセンサーであり、カルシウム依存的に外腕ダイニンを制御することにより鞭毛の対称性を制御し、精子の走化性に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。ダイニン-微小管系を制御する神経カルシウムセンサーについてはカラクシンが初の報告となる。他の生物の精子鞭毛や様々な繊毛におけるカラクシンの機能を解析することにより、 $\text{Ca}^{2+}$  による鞭毛繊毛運動の制御機構を解明することにつながると期待される。

## 審査の結果の要旨

鞭毛・繊毛の波形変化は、細胞の運動や組織外液の流れの制御に極めて重要である。精子においては受精を効率よく行う上で、精子走化性がほとんどの生物で見られる。これまで走化性物質の同定や、波形変化時にカルシウム流入が起こること、カルシウム流入に至るシグナル伝達やそれに関与するチャネルの特定に関する多くの研究が行われてきた。しかし、カルシウムがいかに波形変化につながるのか、その分子メカニズムに関してはよくわかっていなかった。また、カルモジュリンがダイニンの制御に関わるといった研究が古くからあるが、ダイニンとカルモジュリンの相互作用についての証拠はなく、ダイニン制御に関与するカルシウム結合タンパク質についても不明のままであった。本学位論文は、脊索動物でもっとも原始的な体制を保ち、体外受精を行うホヤを用いて、この未解決の問題に対して重要な発見を行った。まず、新規の神経カルシウムセンサーファミリータンパク質を同定し、カラクシンと命名した。生化学的な解析、および *in vitro* 運動解析系を用いて、カラクシンがダイニンを  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に直接制御することを証明した。さらに、特異的な阻害剤を用いて、カラクシンが走化性時の鞭毛波形変化を制御していることを明らかにした。この発見は、ホヤにとどまらず、哺乳類など他の生物の精子走化性にも関わる共通の機構として、また、精子のみならず上皮性繊毛の運動制御にも波及することができる機構として、極めて重要かつ基盤となる研究成果である。

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。