

論文審査の結果の要旨

氏名 岡野 浩行

本論文は3章からなり、第一章はカルモデュリン変異が標的酵素との結合および活性化に与える影響、第二章は接合過程におけるカルモデュリンの機能、第三章では、遺伝子内相補の新たなメカニズムを解析した。

カルモデュリン (CaM) はすべての真核細胞に存在するCa²⁺結合タンパク質であり、*in vitro*で30種類以上のタンパク質と結合することから、細胞内の様々なプロセスに関与すると考えられている。出芽酵母においてはCaMが実際に細胞増殖、イオンホメオスタシス、エンドサイトーシスなどの複数の細胞機能に必要であることが示されている。このうち細胞増殖においては、CaMが複数の機能を持ち、それらの機能が遺伝学的に分離可能であることが、大矢とBotsteinにより示されている。彼らはCaMのターゲットとの結合に重要であると考えられるフェニルアラニン残基を系統的にアラニン残基に置換したCaM変異株を多数作製し、そのうち温度感受性を示す変異株が4つの遺伝子内相補性グループに分類されることから、各グループのCaM変異はそれぞれ異なる必須標的タンパク質との結合に特異的に欠損を持つとの仮説を提唱した。この遺伝子内相補を利用したCaMの多重機能の分離は、後にエンドサイトーシスにおけるCaM機能の解析に応用されている。CaM機能の解析において多数のCaM変異株を用いることの最大の利点は、各CaM変異が複数の標的タンパク質との結合や活性化にさまざまな程度の欠損を与えることが期待できる点である。しかしながらこの点についての生化学的な証拠は得られていなかった。そこで、まず第一章では、二種の標的酵素、カルシニューリンとCaM依存性プロテインキナーゼ (CaMK) について、CaM変異が標的酵素との結合および活性化に特異的に欠損を与えるか否かを検討した。その結果、カルシニューリンあるいはCaMKの最大速度のみを低下させるCaM変異や、カルシニューリンとCaMKの両方の最大速度を低下させるCaM変異が存在することがわかった。したがって各CaM変異は標的酵素の活性化にアレル特異的かつ標的酵素特異的に欠損を与えることが示され、CaM機能の解析において多数のCaM変異株を用いるアプローチの有効性に生化学的基盤が与えられた。

有性生殖を行なうすべての生物は、両親由来の二種の配偶子が融合し、接合子を生じることで発生を開始する。この接合子形成の過程において、 Ca^{2+} シグナルが重要な役割を果たすことがいくつかの生物において報告されている。例えばウニ、ヒトデ、マウス等の卵の受精においては、精子の侵入箇所から Ca^{2+} 波が生じる。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*は α と a と呼ばれる二つの性を持ち、富栄養条件下で接合と呼ばれる過程によって、細胞および核を融合させて接合子を生じる。この過程で細胞外からの Ca^{2+} の流入が起こることが知られており、この流入は接合子の生存率の維持に重要であることが示されている。そこで第2章では、接合過程におけるCaM機能を調べるために、21個のCaM変異株について34°Cにおける同一変異株同士での接合能を測定した。その結果 *cmd1-228*, *cmd1-233*, *cmd1-234*, *cmd1-235*, *cmd1-239*, *cmd1-240*, *cmd1-242*, *cmd1-250*, *cmd1-251*, *cmd1-252*の計10個の変異株が野生株の20%以下という著しい接合効率の低下を示した。このうち*cmd1-233*を除く9個のCaM変異株は野生株との接合には大きな欠損を示さなかった。このように同一変異株同士では接合できないが、野生株とは接合できる変異株をbilateral変異株と呼ぶ。そこで次にこれら9個のbilateral変異株について異なるアリル間での接合を調べた結果、*cmd1-228*と*cmd1-239*, *cmd1-228*と*cmd1-250*の間で著しい接合効率の回復が見られた。このような異なるアリル間での接合効率の回復を、ヘテロ二倍体で観察される遺伝子内相補と区別して、「遺伝子内接合相補」と名付けた。したがってbilateral CaM変異株は*cmd1-228*の属するグループと*cmd1-239*, *cmd1-250*の属するグループの二つの遺伝子内接合相補性グループに分類されることになる。次に各グループに属するCaM変異株*cmd1-228*および*cmd1-239*が接合過程のどのステップに欠損を持つかを調べたところ、両者ともに接合子の形成、細胞膜の融合は正常であったが、核融合に欠損を示すことがわかった。*cmd1-228*と*cmd1-239*の示す核融合の欠損がどの標的タンパク質の機能欠損によるものかを調べるため、5個の標的タンパク質の変異株について、34°Cでの核融合能を調べた。その結果*nuf1*変異株のみが核融合に欠損を示すことがわかった。そこで次に*cmd1-228*と*cmd1-239*の核融合の欠損が、Nuf1pとの結合欠損により生じる可能性について検討した。まず最初に各CaM変異がNuf1pとの結合に与える影響について調べるために、免疫沈降法によりいくつかのCaM変異株におけるCaMとNuf1pの複合体形成を調べた。その結果、*cmd1-228*と*cmd1-239*において最も著しいNuf1pとの複合体形成欠損がみられた。次にこの*cmd1-228*と*cmd1-239*におけるNuf1pとの複合体形成欠損が、接合欠損を引き起こす原因かどうかについて検討した。NUF1優性変異であるNUF1-407はCaM結合部位を欠失しており、CaM非依存的に機能することが知られている。もし*cmd1-228*と*cmd1-239*の接合欠損がNuf1pとの結合低下によるものならば、

Nuf1-407pの発現によってCaMのNuf1pへの結合の必要性がバイパスされ、接合欠損が抑圧されることが予想される。そこで*NUF1-407*を1コピー導入して*cmd1-228*と*cmd1-239*の接合欠損の抑圧の有無を調べたところ、予想通り接合欠損の抑圧がみられた。以上の結果から、*cmd1-228*および*cmd1-239*の接合欠損はNuf1pとの結合能の低下より生じることが明らかになり、この結合能の低下が核融合の欠損を引き起こすことが示唆された。

接合欠損変異株である*cmd1-228*と*cmd1-239*は共に細胞増殖に関して温度感受性を示し、温度感受性増殖についての4つの遺伝子内相補性グループのうちの異なるグループに分類される。この*cmd1-228*と*cmd1-239*の温度感受性増殖が接合欠損と同様に*NUF1-407*によって抑圧されるか否かを調べたところ、両者ともに温度感受性の抑圧がみられた。一方、他の二つの遺伝子内相補性グループに属する*cmd1-226*と*cmd1-231*の温度感受性は*NUF1-407*によって抑圧されなかった。したがって*cmd1-228*および*cmd1-239*の増殖に関する温度感受性はNuf1pとの結合能の低下によるものであることが示された。そこで、第3章では、*cmd1-228*と*cmd1-239*が共にNuf1pとの結合に欠損を示すにも関わらず、遺伝子内相補を示す原因を調べるため、各CaM変異のホモ二倍体と*cmd1-228*と*cmd1-239*のヘテロ二倍体について免疫沈降実験を行なった。その結果、半数体の場合と同様に、複合体形成能は*cmd1-228/cmd1-228*と*cmd1-239/cmd1-239*において最も著しく低下していた。一方*cmd1-228/cmd1-239*においては複合体形成の回復が見られた。したがって*cmd1-228*と*cmd1-239*の間で見られる遺伝子内相補は、各変異CaM単独ではNuf1pと結合できないにも関わらず、両変異CaMが共存すると結合が回復するという新たなメカニズムによって生じることが示唆された。

なお、本論文第1章は、Martha Cyert、大矢禎一と共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって、博士（理学）の学位を授与できると認める。