The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of binding proteins and possible functional roles of dicalcin,a Ca2+-binding protein in frog olfactory cilia.
Author(s)	上尾, 達也
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48802
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【14】

氏　　名	上　尾　達　也（うえ　び　たつ　や）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２１５５１　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 9 月 26 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Identification of binding proteins and possible functional roles of dicalcin, a Ca^{2+}-binding protein in frog olfactory cilia. （嗅繊毛 Ca^{2+} 結合蛋白質ダイカルシンの標的蛋白質の同定と機能解析）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　河村　　悟 （副査） 教　授　金澤　　浩　　教　授　倉光　成紀

論　文　内　容　の　要　旨

Ca^{2+} は生体内で情報伝達物質として重要な役割を果たしており、その情報は、Ca^{2+} の濃度変化を検出するさまざまな Ca^{2+} 結合蛋白質によって伝達されている。ダイカルシンはウシガエル嗅上皮から見出された Ca^{2+} 結合蛋白質であり、S100 蛋白質と高い相同性を持っている。ダイカルシンは嗅細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化に応じて何らかの生理的機能を果たしていると考えられるが、その機能はいまだ未知である。そこでダイカルシンの生理的機能を明らかにするために、その標的蛋白質を同定することを試みた。

ダイカルシンを固定化したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、ダイカルシンに Ca^{2+} 濃度依存的に結合する蛋白質を検索した。その結果、カエル嗅上皮より、分子量約 35 kDa、約 38 kDa の蛋白質が得られた。これら蛋白質についてアミノ酸配列を解析した結果、哺乳類のアネキシン A1、A2、A5 のいずれかと相同性を持つ配列が複数得られたことから、ダイカルシンに結合する蛋白質として得られた 35 kDa、38 kDa 蛋白質群は、アネキシンの混合物であることが示唆された。これら蛋白質を同定するために、ウシガエルのアネキシン A1、A2、A5 に対する抗体を作成し、ウエスタンブロットを行った結果、35 kDa、pI＝～5.5 の蛋白質はアネキシン A5、38 kDa、pI＝～７の蛋白質はアネキシン A1、38 kDa、pI＝～８の蛋白質はアネキシン A2 であることが示唆された。

これらアネキシン A1、A2、A5 が生体内においてダイカルシンの標的蛋白質として機能しているかどうかを検討するため、アネキシンとダイカルシンの局在を免疫組織化学染色法により確認した。嗅上皮において、ダイカルシンとアネキシン Al、A2、A5 のすべてが嗅繊毛上で共局在していた。また、３種のアネキシン相互の局在を検討した結果、３種すべてが繊毛上で共局在していた。また呼吸上皮においても同様に、ダイカルシンと各アネキシンは繊毛上で共局在していた。嗅繊毛と呼吸上皮繊毛の生理的機能は異なるが、運動性の繊毛と言う点で一致している。よってダイカルシン・アネキシン複合体は運動性繊毛に共通して存在する可能性が示唆された。

アネキシンは膜結合性を持つ蛋白質であり、Ca^{2+} 濃度依存的な膜凝集能をもつことが知られている。そこでアネキシンの膜凝集能に対するダイカルシンの影響を、各アネキシンが嗅繊毛内で存在している存在比の元で測定した。ダイカルシンはアネキシン A1 と A2 による膜凝集活性を Ca^{2+} 濃度依存的に顕著に増加させた。ダイカルシンの有無に関らずアネキシン A5 による膜凝集活性は認められなかった。また半分の活性を引き起こすのに必要な Ca^{2+} 濃

度はアネキシン A2 で低く、5μM 以下であるのに対して、アネキシン A1 では 30μM 程度であり、ダイカルシンは２種のアネキシンの活性を異なる Ca^{2+} 濃度で促進していることが示唆された。また、またアネキシン A1 と A2 が共存する場合のダイカルシンによる膜凝集活性の促進は、各アネキシン単独に対する促進効果の和に等しかった。

以上の結果からダイカルシンの標的蛋白質としてアネキシン A1、A2 が繊毛中に存在し、ダイカルシンはアネキシン A1、A2 の膜凝集活性を Ca^{2+} 濃度の変化に応じて順番に制御することが示唆された。アネキシン A1、A2 はその膜凝集活性で細胞膜の修復に関与していることが示唆されている。ダイカルシンは２種のアネキシンの活性を異なる Ca^{2+} 濃度で制御することで、幅広い Ca^{2+} 濃度変化に対応して、損傷した繊毛を修復している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

上尾達也君はウシガエル嗅繊毛で発現していることが報告されているものの、これまで機能が明らかでなかったカルシウム結合蛋白質ダイカルシンの機能を明らかにすることを目指した。ダイカルシンはカルシウムを結合することから、カルシウム結合型のダイカルシンが活性型であり、活性型ダイカルシンが標的蛋白質と結合し、生理機能を発揮すると考えた。そこで大腸菌を用いて発現させたダイカルシンを結合したカラムを作り、高カルシウム濃度条件で嗅繊毛蛋白質に対してアフィニティーカラムクロマトグラフィーを試みた。その結果、主要な蛋白質として、35 kDa と、38 kDa の分子量を持つ蛋白質を得た。これらの蛋白質は複数種の蛋白質の混合物であり、かつ、部分分解された蛋白質を含んでいたため解析は困難を極めたが上尾君は見事にこの難題を解決し、38 kDa 蛋白質はアネキシン A1 と A2、35 kDa 蛋白質はアネキシン A5 に加え、アネキシン A1 と A2 の分解物を含んでいることを明らかにした。

上尾君は、アネキシン A1、A2、A5 とダイカルシンが生体内で結合して生理作用を発揮しているかどうかを調べるため、これら４者が、同じ細胞で発現しているかどうかを検討した。そのため、新たに、異なる動物で特異的な抗体を作成し、二重染色の技法を用いて、免疫組織法により、４者は嗅繊毛に共局在することを明らかにした。

アネキシンは膜凝集活性を持っていることが知られているのでこのアネキシン活性に及ぼすダイカルシンの作用の有無を検討した。その結果、ダイカルシンはアネキシン A1 と A2 が示す、膜凝集活性を著しく増加させることを明らかにした。効果を及ぼすカルシウム濃度はアネキシン A1 と A2 とでは異なっており、両者に対する作用を持つことでダイカルシンは幅広いカルシウム濃度で膜凝集活性を制御出来ることを明らかにした。また、ダイカルシンが複数のアネキシンと結合出来るのは、これまで知られていない新規の結合様式が寄与しているためであることを見出した。

上記の研究成果は高い学術的価値を有し、当該分野の発展に寄与したと認められる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として充分に価値あるものと認める。