



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ホタテガイ 精巢特異の新規カルシニューリン結合蛋白質CaNBP75に関する研究
Author(s)	中富, 晶子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第6184号
Issue Date	2003-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k6184
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32594
Type	doctoral thesis
File Information	6184.pdf



学位論文

ホタテガイ精巢特異的新規カルシニューリン結合蛋白質

CaNBP75に関する研究

平成14年度

北海道大学大学院 理学研究科 博士後期課程 化学専攻

生命分子化学講座 生物有機化学研究室

中富 晶子

目次

略語	1
要約	3
序章	6
第1章：ホタテガイ精巢カルシニューリン調節サブユニットの化学構造 および遺伝子発現の解析	18
1.1 目的	18
1.2 実験方法	18
1.2.1 カルシニューリンの調製	18
1.2.2 カルシニューリンPNPPase活性測定	19
1.2.3 CaNBの単離とS-ビリジリエチル化	19
1.2.4 CaNBのリシルエンドペプチダーゼ消化	23
1.2.5 CaNBの臭化シアン消化	23
1.2.6 逆相HPLCによるペプチドフラグメントの分離	23
1.2.7 アミノ酸配列分析	24
1.2.8 縮重プライマーを用いたPCR法	24
1.2.9 トータルRNA調製	25
1.2.10 ポリ(A)+RNAの精製	25
1.2.11 cDNAライブラリーの構築	26
1.2.12 プローブの放射能ラベル	27
1.2.13 ライブラリーのスクリーニング	27
1.2.14 λファージの精製とサブクロニング	27
1.2.15 プラスミドの精製	28
1.2.16 塩基配列分析	28
1.2.17 DNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動	28
1.2.18 RNAのホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動	28
1.2.19 ノーザンプロットティング	29

1.2.20 CaNB mRNA発現量の季節変化の定量	29
1.3 結果	29
1.3.1 CaNBのアミノ酸配列分析	29
1.3.2 CaNBのcDNA塩基配列分析	30
1.3.3 ホタテガイ精巢CaNB mRNA発現量の季節変化	39
1.4 考察	39
1.5 まとめ	44
第2章：新規カルシニューリン結合蛋白質CaNBP75の発見	45
2.1 目的	45
2.2 実験方法	45
2.2.1 ホタテガイ精巢抽出液の調製	45
2.2.2 ホタテガイ精巢抽出液の硫酸分画	45
2.2.3 ホタテガイ精巢抽出液の等電点分別沈澱	46
2.2.4 CaNBP75の部分精製	46
2.2.5 SDS-PAGE	47
2.2.6 二次元電気泳動	47
2.2.7 ウエスタンブロッティング	48
2.2.8 ファーウエスタンブロッティング	48
2.3 結果	49
2.3.1 カルシニューリン結合蛋白質、CaNBP75の検出	49
2.3.2 CaNBP75の部分精製	53
2.3.3 CaNBP75の同一性	56
2.4 考察	56
2.5 まとめ	60
第3章：CaNBP75のアミノ酸および塩基配列の決定	61
3.1 目的	61

3.2 実験方法	61
3.2.1 CaNBP75のアミノ酸配列分析	61
3.2.2 PCRによるCaNBP75cDNA断片frg68-69の増幅	62
3.2.3 DNA塩基配列分析	62
3.2.4 ホタテガイ精巢cDNAライブラリー	63
3.2.5 DIG標識されたDNAプローブの調製	63
3.2.6 プラークハイブリダイゼーション	64
3.2.7 5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) 法	64
3.2.8 DIG標識されたRNAプローブの調製	65
3.2.9 ノーザンプロットイング	65
3.3 結果	66
3.3.1 CaNBP75のアミノ酸配列分析	66
3.3.2 CaNBP75の塩基配列決定	66
3.3.3 ノーザンプロットイングによるCaNBP75 mRNAの同定	72
3.4 考察	72
3.5 まとめ	76
第4章：CaNBP75の機能解析	77
4.1 目的	77
4.2 実験方法	77
4.2.1 CaNBP75組換え体の構築	77
4.2.2 ホタテガイ各組織からの蛋白質の抽出	78
4.2.3 SDS-PAGE	78
4.2.4 ノーザンプロットイング	78
4.2.5 ウェスタンプロットイングおよびファウエスタンプロットイング	79
4.3 結果	79
4.3.1 CaNBP75発現系の構築	79
4.3.2 CaNBP75組換え蛋白質とカルシニューリンの結合	80

4.3.3 CaNBP75の組織分布	83
4.4 考察	88
4.5 まとめ	90
第5章：CaNBP75のアイソフォーム	91
5.1 目的	91
5.2 結果	91
5.3 考察	91
5.4 まとめ	95
第6章：総合考察	96
参考文献	102
謝辞	106

略語

AKAP	protein kinase A-anchoring protein
BA	benzamidine
CaM	calmodulin
CaN	calcineurin
CaNA	calcineurin A subunit
CaNB	calcineurin B subunit
CaNBP75	calcineurin binding-protein of 75 kDa
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Crm1	chromosomal region maintenance 1
DEPC	diethylpyrocarbonate
DFP	diisopropyl fluorophosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
ds	double stranded
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid
GST	glutathione-S-transferase
IAA	isoamyl alcohol
IL-2	interleukin-2
IL-4	interleukin-4
IP ₃	inositol 1,4,5-trisphosphate
2-ME	2-mercaptoethanol
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
NES	nuclear-export signal
NF-AT	nuclear factor of activated T-cell
NLS	nuclear-localization signal
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

PCR	polymerase chain reaction
PDE	phosphodiesterase
pI	isoelectric point
PLC	phospholipase C
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PNPP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PNPPase	<i>p</i> -nitrophenyl phosphatase
PTH	phenylthiohydantoin
5'-RACE	5'-rapid amplification of cDNA ends
Ran	Ras-related nuclear protein
RanBD	Ran-binding domain
RanBP3	Ran-binding protein 3
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
SAS	- %saturated ammonium sulfate
SDS	sodium dodecyl sulfate
ss	single stranded
TBS	Tris-buffered saline
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TFA	trifluoroacetic acid
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

要約

セリン/スレオニン特異的プロテインフォスファターゼ2Bとして知られるカルシニューリンは、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性の脱リン酸化酵素で、真核生物の多くの組織で発現している。カルシニューリンの研究は、免疫抑制剤の標的蛋白質がカルシニューリンであることが報告されて以来、免疫系や神経系での進展が著しい。近年では新たなカルシニューリン結合蛋白質がいくつか報告され、カルシニューリンが心筋の肥大や筋原繊維の再構築にも関与するなど、多彩な機能を有することが明らかになってきた。しかし、研究の初期よりその発現量の多さから注目されていた精巣でのカルシニューリンの機能は現在でも解明されていない。

精巣特異的カルシニューリンは、ラット精巣での発現パターン変化や、細胞内での局在などの研究から、減数分裂や精子形成といった精巣に特異的な機能に関与しているのではないかと推測されてきた。しかし、精巣では精子形成細胞培養系が確立されていないこともあり、カルシニューリンの基質蛋白質の同定を含めた実際の生理機能については全く解明されていない。

本研究では、ホタテガイ精巣より新規カルシニューリン結合蛋白質CaNB75を単離し、その分子機能を解析して、生理的意義について考察した。本論文は以下に示した6章から構成される。

第1章ではホタテガイ精巣に発現しているカルシニューリンについての知見を得るため、カルシニューリンの調節サブユニット (CaNB) の化学構造および遺伝子の発現解析を行った結果を示した。アミノ酸配列分析、およびcDNAクローニングの結果、ホタテガイ精巣CaNBはほ乳類CaNBアイソフォームのB α 1に近いことが明らかになった。また、精巣の成熟過程との関連を明らかにするためにホタテガイ精巣を用いてCaNB発現量の季節変化を調べ、ホタテガイ精巣CaNBの発現量が、精巣の成熟サイクルに伴って増減することを明らかにした。

第2章では、ホタテガイ精巣に含まれるカルシニューリン結合蛋白質を検出し、その単離を試みた結果を示した。カルシニューリン結合蛋白質がホタテ

ガイ精巢抽出液中に存在することをファウエスタン法を用いて明らかにし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で分子量約7万5千の移動度を示すことから、この蛋白質をCaNBP75 (calcineurin binding protein of 75 kDa) と名付けた。ホタテガイ精巢から硫酸アンモニウム分画、等電点沈澱、DEAE-セルロフラインカラムクロマトグラフィーを用いて部分精製したCaNBP75は、ブロードな溶出パターンを示し、また二次元電気泳動では複数のスポットを形成したことから、この蛋白質は単一の分子種ではないことが推測された。

第3章では、CaNBP75の化学構造を決定し、アミノ酸配列の特徴から得られたCaNBP75の性質について述べた。部分精製したCaNBP75のアミノ酸配列分析を行い、得られた配列情報に基づいてcDNAクローニングを行った。単離されたcDNAにコードされたアミノ酸配列から、CaNBP75は全長474残基、51,850 Daの蛋白質であることが推測された。また、データベース検索から、CaNBP75はC末端領域に低分子量GTPaseであるRanの結合モチーフを持つ新規蛋白質であることがわかった。CaNBP75のN末端領域に相同性のある蛋白質はデータベース上に存在しなかったが、C末端領域約200残基はヒトのRan結合蛋白質であるRanBP3のRan結合領域と非常に高い相同性を示し、CaNBP75もRanBP3同様、Ranの結合によって機能が制御されることが推測された。

第4章ではCaNBP75の組換え蛋白質を用いた機能解析と、ホタテガイ組織での発現解析を行った。CaNBP75変異蛋白質の発現系を構築し、カルシニューリンとの相互作用を解析した結果、CaNBP75のN末端領域6残基目から210残基目を含む組換え蛋白質がカルシニューリン結合能を示すこと、その作用点はカルシニューリンの触媒サブユニットであるCaNAであることが明らかになった。このN末端領域を含む組換え蛋白質は、SDS-PAGEにおける挙動が普通ではなく、このため見かけの分子量が大きく見積もられると考えられた。ノーザン法を用いた遺伝子発現解析から、CaNBP75の10 kbと5.2 kbの転写産物は、精巢に特に多く発現しているのが確認できた。10 kbの転写産物は腎臓でも発現量が高く、また、卵巣では1.7 kbの転写産物が多量に発現していた。ファウエスタン法を用いて組織分布を調べた結果、カルシニューリンがホタテガイ組織で普

遍的に発現しているのに対し、CaNBP75の発現は組織特異性が高かった。CaNBP75の発現量は精巣で特に高く、卵巣にも発現が見られたが、カルシニューリン発現量の多い筋組織では全く見られなかった。この結果から、CaNBP75は精子変態、鞭毛の運動といった精巣特有の機能や、生殖細胞の減数分裂に関与する蛋白質である可能性も考えられた。

第5章ではCaNBP75の均質性について論じた。アミノ酸配列分析、およびcDNA塩基配列分析の結果を考慮すると、CaNBP75には少なくとも4種のアイソフォームが存在し、そのうち2種類は蛋白質として翻訳されていることを明らかにした。

第6章ではCaNBP75の生体内での機能について考察を行った。精子形成過程でのカルシニューリンおよびRanの局在に関する知見と、CaNBP75が精巣で高レベルに発現しているという結果から、精子形成過程でカルシニューリンはRanと共同して機能しており、CaNBP75はこれを仲介する形で制御する可能性を示した。また、CaNBP75とRanBP3の相同性から、Crm1を介したカルシニューリンの核外移行機構の可能性を示した。

これまで手がかりのなかった精巣でのカルシニューリンの生理機能解明の研究は、精巣特異的なカルシニューリン結合蛋白質であるCaNBP75の発見により、新しいアプローチの手段を得たことになり、今後大きく進歩すると期待する。

序章

生体を構成する細胞はそれぞれが独立に機能しているわけではなく、互いに情報（シグナル）を交換し、協調して生命活動を維持している。シグナル伝達物質にはホルモン、細胞増殖因子や神経化学伝達物質などが用いられる。これらのシグナル伝達物質（リガンド）が、標的細胞表面にある受容体蛋白質と結合すると、受容体の細胞内ドメインが協調的にコンホメーション変化し、G蛋白質、イオンチャネル、蛋白質リン酸化酵素などの細胞内蛋白質の活性化を引き起こす。これにより、各種の調節物質群が順次連鎖的・段階的に活性化することで、シグナルは増幅されながら情報が伝達されていく。細胞内のシグナル伝達には、酵素の活性化が関与する 경우가多く、不活性型酵素から活性型酵素への変換は、蛋白質リン酸化酵素によるリン酸化やプロテアーゼによる限定分解によって行われる場合が多い。

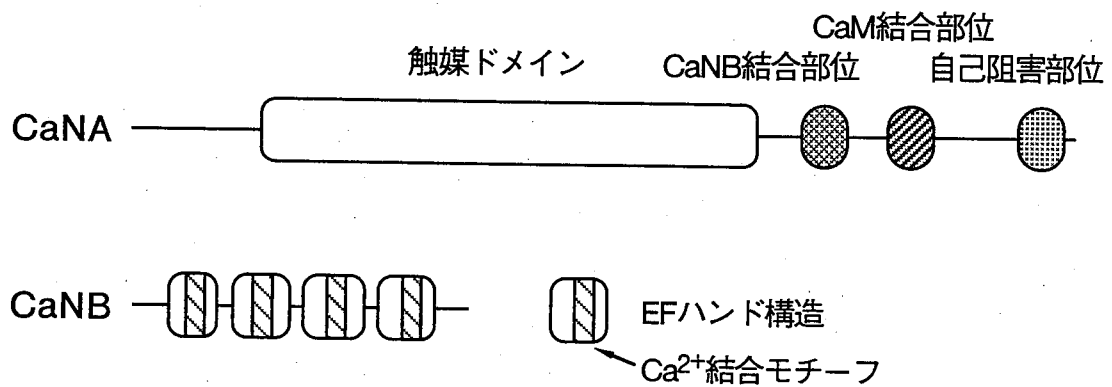
蛋白質リン酸化酵素（キナーゼ）は、基質蛋白質のセリン、スレオニン、あるいはチロシン残基にリン酸基を転移する（リン酸化する）酵素である（図序-1A）。細胞内シグナル伝達ではリン酸化により、細胞内での局在が制御されて活性化される蛋白質も多い。リン酸化は可逆反応であり、リン酸化によって活性化された蛋白質は、脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）によってリン酸エステル結合を加水分解することで元の不活性化状態へ戻すことができる。標的蛋白質の活性を調節するのにリン酸化が用いられるのは、次の利点があるためと考えられる。リン酸化は可逆的であり、標的蛋白質の活性化、不活性化に新規蛋白質合成が必要ない点、キナーゼ、およびフォスファターゼの活性調節を通して標的蛋白質の活性化状態を細かく調節できる点である。標的蛋白質の活性はリン酸化量、すなわちキナーゼとフォスファターゼの活性の比で決まる（図序-1B）。従来、フォスファターゼは基質特異性も低く、常に活性化されていて細胞内の蛋白質のリン酸化量を基礎レベルに下げのためにあり、標的蛋白質のリン酸化量は基質特異性の高いキナーゼの活性によって決定されていると考えられてきた。しかし近年、フォスファターゼの基質特異性および活性を調節するサブユニットや、フォスファターゼの特異的阻害蛋白質が多く見つ

かってきており、フォスファターゼの活性も積極的に調節されているという考えが主流になりつつある。

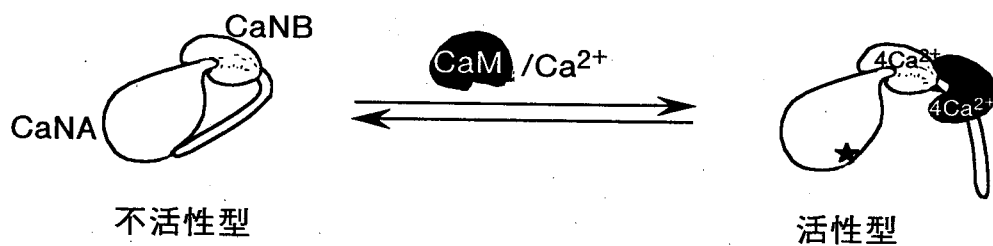
フォスファターゼは基質としてリン酸化セリン、およびスレオニン残基を認識するセリン／スレオニンフォスファターゼ、リン酸化チロシン残基を基質として認識するチロシンフォスファターゼ、およびその両方を認識する二重基質特異性フォスファターゼに区分される。セリン／スレオニンフォスファターゼは耐熱性阻害蛋白質であるインヒビター1、およびインヒビター2によって阻害される1型 (PP1) と、阻害されない2型 (PP2) に分類され、さらにPP2は活性化に金属を必要としないPP2A、 Ca^{2+} およびカルモジュリンによって活性化されるPP2B、 Mg^{2+} によって活性化されるPP2Cにわけられる (1, 2)。このうち、PP2Bはセカンドメッセンジャーによって直接活性化される唯一のフォスファターゼで、別名カルシニューリンともよばれる (3)。カルシニューリンは分子量約6万の触媒サブユニットであるCaNAと、分子量約2万の Ca^{2+} 結合サブユニットであるCaNBの二つのサブユニットで構成されている。この酵素は名前の通り Ca^{2+} によって活性化され、神経系に多く含まれる蛋白質で、当初 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性ホスホジエステラーゼ (PDE) の阻害蛋白質として脳から単離された (4)。PDE阻害作用はCaNAにカルモジュリンが結合し、PDEとカルモジュリンの結合が抑制されるためである。後になって、カルシニューリンは骨格筋で発見されたPP2Bのアイソフォームであること、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存的に脱リン酸化活性を持つことが明らかになった (5)。

CaNAは触媒ドメインとそのC末端側にあるCaNB結合部位、カルモジュリン結合部位、および自己阻害部位からなる (図序-2 A) (6)。ほ乳類ではこれまでに $A\alpha$ 、 $A\beta$ 、 $A\gamma$ の3つのCaNA遺伝子が見つかっており、このうち $A\alpha$ と $A\beta$ は多くの組織で発現しているのに対して、 $A\gamma$ は精巣で特異的に発現していることがわかっている (7)。CaNBはカルモジュリンと相同性があり、 Ca^{2+} を結合するEF-ハンド構造を4つ持つ (図序-2 A)。ほ乳類でCaNBの遺伝子は $B\alpha$ と $B\beta$ が知られており、 $B\beta$ は精巣特異的に発現している (8)。 $B\alpha$ にはオルタナティブスプライシングにより $B\alpha 1$ と $B\alpha 2$ の2つの転写産物が存在することが

A.



B.



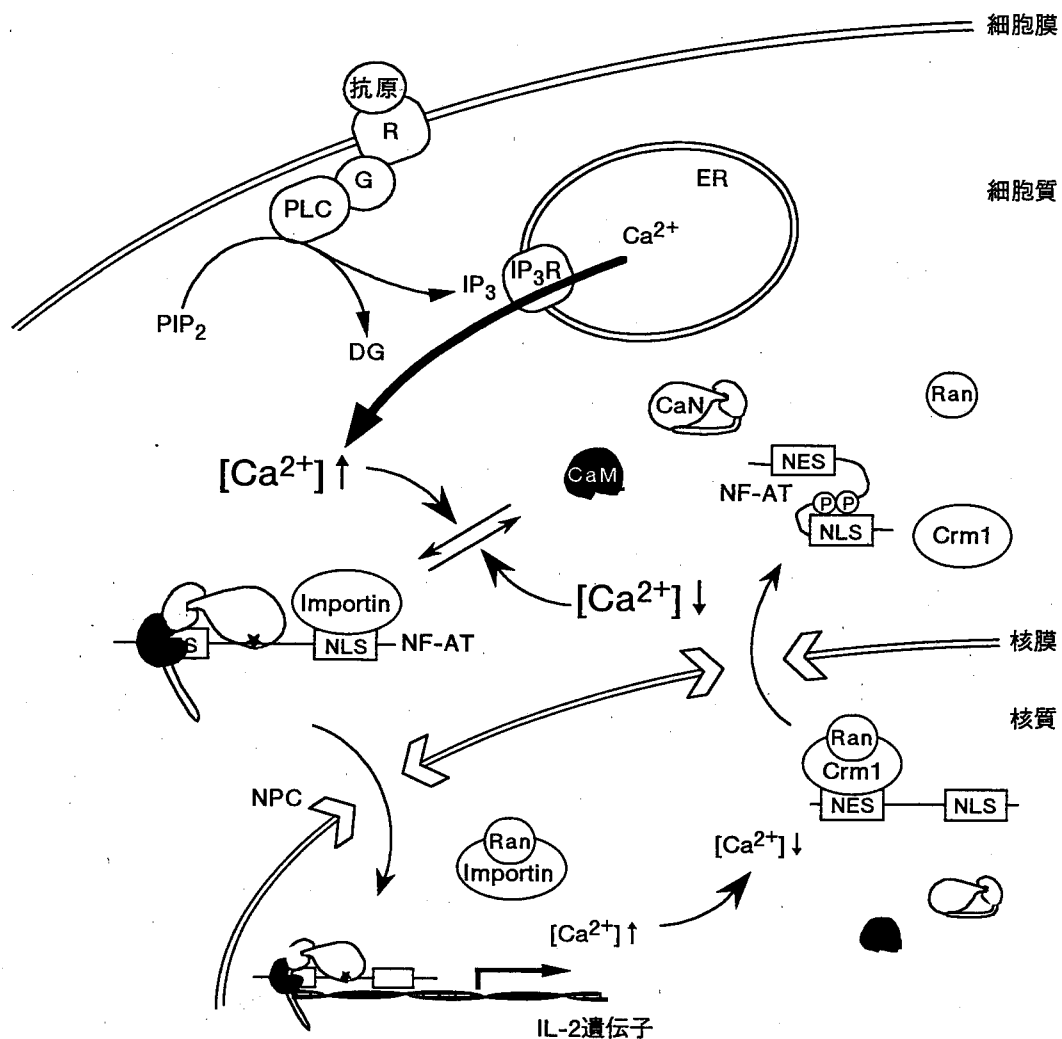
図序-2 カルシニューリンの構造と活性化機構

A. カルシニューリンの構造を模式的に示した。B. Ca²⁺、および活性化されたカルモジュリンが結合することによりカルシニューリンが活性化される。

ラットを用いた研究で報告されており、B α 1は脳を含めたほとんどの組織で発現しているのに対して、B α 2は精巣にのみ特異的に発現していることが明らかになっている(9)。CaNBのCaNAへの結合は不可逆的であるのに対し、カルモジュリンの結合は可逆的であり、Ca²⁺依存的に起こる。外部からの刺激により細胞内Ca²⁺濃度が上昇するのに伴い、4分子のCa²⁺がCaNBに結合し、カルモジュリン-(Ca²⁺)₄がCaNAに結合することにより、カルシニューリンは活性化される。これはCaNBへのCa²⁺の結合により触媒ドメインに構造変化がおり、基質との親和性、最大反応速度が増大し、CaNAへのカルモジュリンの結合により、自己阻害領域が活性中心から解離し、最大反応速度の増大がおこるためである(10)。このカルシニューリンの活性化には μ Mオーダーの細胞内遊離Ca²⁺濃度が必要で、Ca²⁺濃度の低い($\sim$ nM)静止時の細胞ではカルシニューリンは不活性状態である。細胞が外部からの刺激を受けると、細胞外からのCa²⁺の流入および細胞内Ca²⁺小胞からのCa²⁺の放出により細胞質の遊離Ca²⁺濃度が上昇し、カルシニューリンの活性化が引き起こされる(図序-2 B)。

カルシニューリンは先にも述べたように脳、特に神経系において多量に発現している酵素である。しかし、発現分布を調べると、脳以外のすべての組織で発現しており、その発現量は脳について免疫組織、筋肉で高いことわかっている(11)。

免疫系では、免疫抑制剤であるFK506やシクロスポリンAの標的蛋白質がカルシニューリンであることがわかったためにカルシニューリンの研究が進んだ。FK506やシクロスポリンAは内在性の蛋白質であるFKBP12、およびシクロフィリンとそれぞれ複合体を形成し、これがカルシニューリンと結合して脱リン酸化活性阻害能を示す(12)。この特異的阻害の分子機構を明らかにする過程で、免疫系でのカルシニューリンの生理機能はT細胞の活性化を担うシグナル伝達過程に結びつけられて詳細に研究された(図序-3)(13)。まずT細胞レセプターが抗原を認識すると、G蛋白質の活性化を介してホスホリパーゼC(PLC)が活性化される。PLCにより、ホスファチジルイノシトール三リン酸が加水分解されると、生じたイノシトール三リン酸(IP₃)は細胞内のCa²⁺小胞



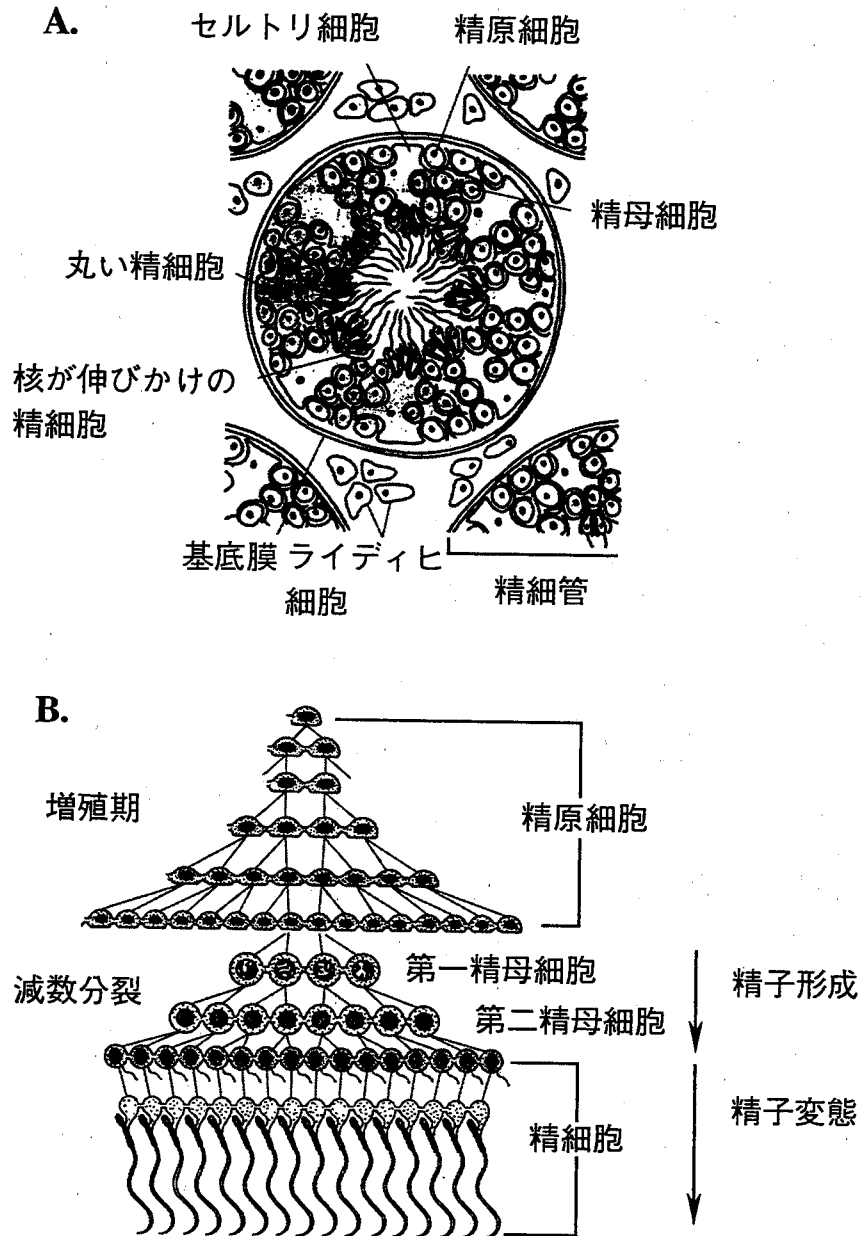
図序-3 カルシニューリンの活性化を介したT細胞の活性化機構

T細胞の活性化におけるシグナル伝達経路を示した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化にともない、カルシニューリンがNF-ATの核-細胞質間輸送を調節していると考えられている。R; T細胞レセプター、G; G蛋白質、PLC; ホスホリパーゼC、 PIP_2 ; ホスファチジルイノシトール二リン酸、 IP_3 ; イノシトール三リン酸、ER; 小胞体、 IP_3R ; IP_3 レセプター、NPC; 核膜孔複合体、NLS; 核内移行シグナル、NES; 核外移行シグナル

(ER) のIP₃レセプターを活性化し、Ca²⁺チャネルを開くのでCa²⁺は細胞質に放出される。Ca²⁺濃度の上昇に伴い、Ca²⁺/カルモジュリンがカルシニューリンに結合する。カルシニューリンは活性化されると、転写調節因子であるリン酸化NF-AT (nuclear factor of activated T-cell) を脱リン酸化し、分子内の核内移行シグナル (NLS) を分子表面に露出させる。これにより、NF-ATは核内に移行し、他の系で誘導されるAP-1などの転写因子と協調してサイトカインであるインターロイキン2 (IL-2) やインターロイキン4 (IL-4) 遺伝子の転写を引き起こし、T細胞を活性化する (14-16)。カルシニューリンはこの時NF-ATに結合したまま、共に核に移行する (17)。Ca²⁺シグナルが消失すると、NF-ATとカルシニューリンは解離し、NF-ATはExportin (Crm1) によって核外に排出されて再利用される (18)。カルシニューリンもこの時核外に移行することが観察されているが、その排出機構は明らかになっていない (17) (図序-3)。

近年では、骨格筋や心筋の細胞でも、カルシニューリンがNF-ATを調節しており、これがGATA-4やMEF-2といった転写因子と協調して働き、筋組織に特異的な遺伝子の発現を調節して、骨格筋のリモデリングや心筋の肥大に関与していることが明らかになった (19-21)。神経系に発現しているカルシニューリンは、シナプス伝達の長期増強 (LTP)、長期抑圧 (LTD) に関与している (22, 23)。

脳、免疫系、筋肉についてカルシニューリンの発現が高いのは精巣である (11)。精巣にはカルシニューリンの精巣特異的アイソフォームが存在することは先にも述べた。精巣は精子分化をおこなう精細管と、ホルモン産生をおこなう間細胞 (ライディヒ細胞) よりなる組織である (図序-4A)。精細管には、体細胞であるセルトリ細胞と、生殖細胞である精子分化過程の各ステージの細胞が存在する。通常、体細胞の分裂 (有糸分裂) では、DNAの複製の後、一度の分裂をおこない、2つの二倍体細胞が生じるが、生殖細胞は減数分裂をおこない、DNAの複製の後、連続して二度分裂し、4つの一倍体細胞を生じる。精巣の生殖細胞である精原細胞は、有糸分裂をくり返して増殖した後、減数分裂を開始して第一精母細胞へ分化し、減数分裂を完了すると丸い精細胞になる (精

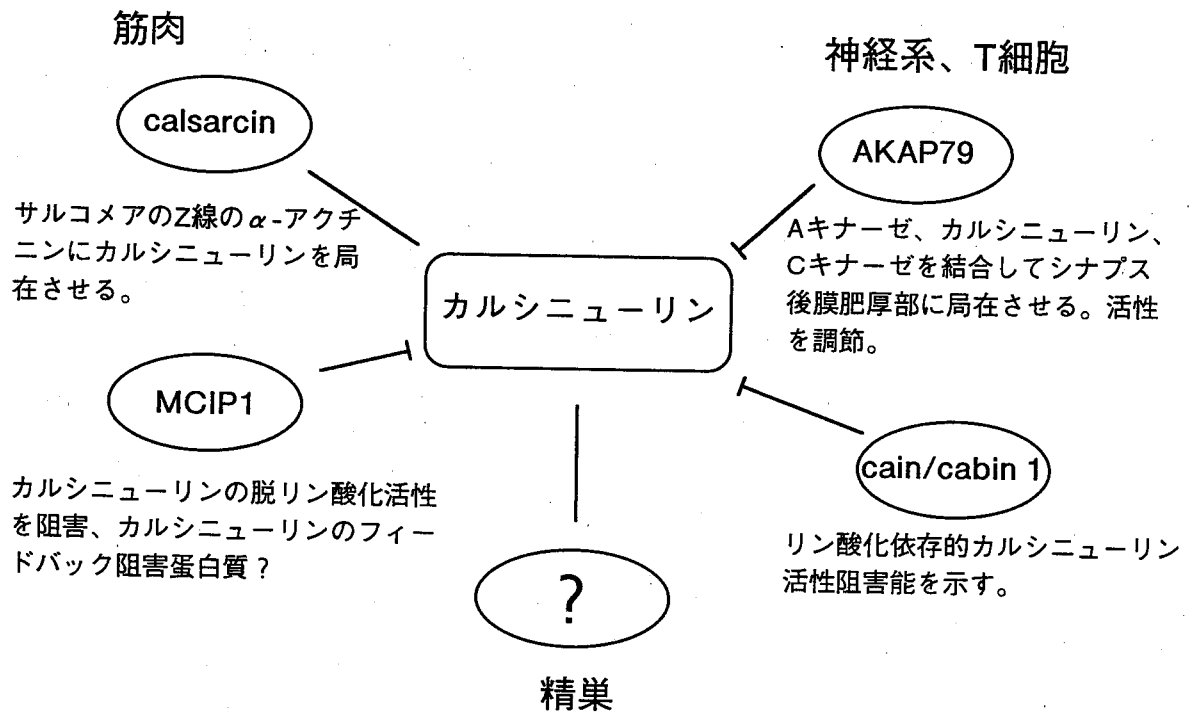


図序-4 精巣の構造と精子分化過程

A. ほ乳類の精巣の構造を模式的に示した。ほ乳類の精巣は精細管というチューブ状の構造とその間を占める間質からなる。間質には血管、リンパ管、ステロイド生産細胞であるライディヒ細胞が存在する。精細管の基底膜に接してセルトリ細胞が伸展し、生殖細胞はその側面に接しながら分化が進むにつれて精細管の中央部の方向へ移動する。 B. 精子分化の過程を模式的に示した。精原細胞は有糸分裂をくり返して増殖し、減数分裂をおこなって丸い精細胞になる。丸い精細胞はその後、形態形成過程を経て成熟精子へと分化する。

子形成)。丸い精細胞はその後、先体の形成、核の凝縮と伸長、ミトコンドリアの集合、鞭毛やその軸糸構造の形成などの複雑な形態形成過程を経て成熟精子へと分化する(精子変態)(図序-4B)。精原細胞、および分化の早い段階の細胞は精細管のいちばん基底膜側に存在するが、成熟過程の進行にともない、精細管の中央部の方向へ移動し、最終的に精子として精細管内腔へ放出される。この精子分化の過程で、カルシニューリンの精巣特異的アイソフォームを構成する2つのサブユニット(CaNA、CaNB)の発現量は、精巣の成熟過程の進行に伴って変化し、減数分裂後に著しく増加することが報告されている(7-9)。また、抗体を用いた研究から、カルシニューリンが減数分裂後の精細胞の核や、精子の先体後部や鞭毛に存在することが報告されている(24, 25)。このため、精巣特異的カルシニューリンは精子分化や、精子の鞭毛運動の調節に関与しているのではないかと推測されているが、詳細は明らかになっていない。

近年、カルシニューリンと特異的に結合するカルシニューリン結合蛋白質がいくつか報告された(図序-5)。神経細胞で見い出されたAキナーゼ結合蛋白質であるAKAP79は、Aキナーゼと同時にカルシニューリンとCキナーゼを結合してシナプス後膜肥厚部に局在させ、これらの活性あるいは基質特異性を調節していると考えられている(26-28)。骨格筋および心筋に発現している calsarcinは、サルコメアのZ線の α -アクチニンにカルシニューリンを局在させ、筋細胞の再構成や分化に関与する可能性が示唆されている(29, 30)。また、筋組織に発現しているMCIP1(CBP1、DSCR1、calsuppressin1、calcipressin1)はカルシニューリンの脱リン酸活性を阻害するが、その発現がNF-ATの転写調節活性により制御されていることから、カルシニューリンのフィードバック阻害蛋白質として機能することが示唆されている(31-36)。マウスのT細胞由来のライブラリー、およびラット海馬由来のライブラリーからtwo-hybrid スクリーニングされたcain/cabin 1は、リン酸化に依存してカルシニューリン活性阻害能を示すことが報告されている(37, 38)。cain/cabin 1とカルシニューリンの結合は Ca^{2+} /カルモジュリンによって解除される。以上に示したカルシニューリン結合蛋白質は、カルシニューリンに結合するのみならず、活性を制御するも



図序-5 カルシニューリン結合蛋白質

カルシニューリンの機能を調節していると考えられている蛋白質を示した。

のが多い。これは Ca^{2+} /カルモジュリン制御系以外にもカルシニューリンの活性を調節する機構が普遍的に存在する可能性を示唆している。また、これらの蛋白質はカルシニューリンの発現が顕著な神経、免疫、筋肉といった組織で見つかり、カルシニューリンの未知の新しい生理機能に関与していると考えられる。カルシニューリンの発現量が多いにも関わらずその生理機能が不明な精巣でも、新規結合蛋白質が存在する可能性は高いと考えられる。

カルシニューリンの生理機能を明らかにするためには、①カルシニューリンの基質を同定する（シグナル伝達系の下流を明らかにする） ②調節因子のネットワークを明らかにする（シグナル伝達系の上流を明らかにする） の双方向からのアプローチが考えられる。フォスファターゼの基質は、リン酸化蛋白質であるため、基質を同定するためにはあらかじめキナーゼを活性化する必要があり、一般に困難が伴うことが予想される。本研究ではカルシニューリンの調節因子を同定していく方法を取った。

本研究では、実験材料としてホタテガイ精巣を用いた。ホタテガイは他の生物種と比較すると構成組織中に占める精巣の割合が大きく、また、北海道では新鮮な個体が入手しやすいこともあり、精巣の研究をおこなうには扱いやすい実験生物であると考えられる。マウス、ラットなど、ほ乳類の精巣は構造が複雑であり、生体ではさまざまなステージの生殖細胞が同時に存在するため、解析が困難である。また、培養細胞系も確立されていない。一方、ホタテガイ精巣は構造も単純であり、1年を1サイクルとした周期的な成熟過程を示す。北海道に生息するホタテガイの精巣の生殖周期に関する組織形態学的研究によると、夏は精原細胞しか見られない休止期、秋に休止期から成長前期へと移行し、冬から春にかけて精子形成がおこなわれ、海水温が上昇する5～6月にかけて精子が放出されて精巣重量も急激に減少することが報告されている(39)。この特徴を用いると、ホタテガイの採取時期を選ぶことである一定の精子形成ステージの細胞をそろえることが可能になり、多量の精巣組織から出発して機能蛋白質を同定し、生理機能を解析することが可能になる。これらの利点を利用し、ホタテガイ精巣抽出物よりカルシニューリン結合蛋白質の単離を試みた。

本研究は新規カルシニューリン結合蛋白質CaNBP75の単離とその分子機能、および生理的意義の解明を目的とした。本論文は本章と、以下に示した6章から構成される。

第1章ではホタテガイ精巣に発現しているカルシニューリンについての知見を得るため、CaNBの配列決定に関する実験結果を示した。アミノ酸配列分析、およびcDNAクローニングの結果、ホタテガイ精巣CaNBはほ乳類のB α 1により近いことが明らかになった。次に、精巣の成熟過程との関連を明らかにするためにその発現量の季節変化を調べた。この結果、ホタテガイ精巣の成熟に伴い、カルシニューリンの発現量が増加することが確認された。第2章では、ホタテガイ精巣抽出物からカルシニューリン結合蛋白質の検出、単離を試みた結果を示した。ファーウエスタン法を用いた分析の結果、ホタテガイ精巣に分子量約7万5千のカルシニューリン結合蛋白質が存在することが明らかになり、この蛋白質をCaNBP75と命名した。この結合蛋白質は、二次元電気泳動で複数のスポットを形成し、単一の分子種ではないことが推測された。第3章では、CaNBP75の部分精製標品を用いてアミノ酸配列分析をおこない、得られた配列情報に基づきcDNAクローニングをおこなった結果を示した。CaNBP75は全長474残基、51,850 Daの蛋白質であることが推測された。CaNBP75のN末端領域に相同性のある蛋白質はデータベース上に存在しなかったが、C末端領域はヒトRan結合蛋白質、RanBP3のC末端領域と高い相同性を示す新規蛋白質であることがわかった。第4章ではCaNBP75変異蛋白質の発現系を構築し、カルシニューリンとの相互作用を解析した結果を示した。CaNBP75のN末端領域が、SDS-PAGEにおける挙動が普通ではないこと、およびカルシニューリン結合能を示すことが明らかになった。また、CaNBP75の組織分布を調べた結果、この蛋白質は精巣、および卵巣に特異的に発現していることが明らかになった。第5章ではCaNBP75の均質性について論じた。アミノ酸配列分析、およびcDNA塩基配列分析の結果を考慮すると、CaNBP75には4種のアイソフォームが存在することが推測された。第6章では現時点で考えうるCaNBP75の生体内での機能について考察を行った。

第1章：ホタテガイ精巢カルシニューリン調節サブユニットの化学構造および遺伝子発現の解析

1.1 目的

ホタテガイ精巢に発現しているカルシニューリンの調節サブユニット、CaNBのアミノ酸配列、および塩基配列を決定し、配列の特異性から精巢におけるカルシニューリンの機能を論じる。また、ノーザンハイブリダイゼーションをもちいてCaNB mRNAの発現量変化を調べることで、カルシニューリンの精巢特異的機能への関与を論ずる。

1.2 実験方法

1.2.1 カルシニューリンの調製

カルシニューリンは、ホタテガイ精巢から、藤永らの方法にしたがって、以下の方法により精製した。

ホタテガイ精巢（100 g、 -20°C 保存）を室温で半解凍後、スライスし、5倍容のバッファ-A（20 mM イミダゾール、1 mM EGTA、2 mM MgCl_2 、14 mM 2-ME、pH 7.0）を加えてミキサーで30秒間ホモジナイズした。1/1,000量の0.1 M DFP、0.1 M PMSF、1 M BAを加え、さらに30秒ずつ2回ホモジナイズした後、RPR12-2（日立SCR20 BB）で12,000 rpm、15分間遠心した。上清に容量の0.1992倍量の固形硫酸アンモニウムを加えて35%飽和硫酸溶液（35 SAS溶液）にし、30分間静置した後、RS-6600（クボタKR 400）で4,200 rpm、50分間遠心した。上清に容量の0.1339倍量の硫酸アンモニウムを加えて55 SAS溶液にし、30分間静置したのち、4,200 rpmで50分間遠心した。沈澱の0.729倍量の0 SAS溶液（20 mM イミダゾール、1 mM EGTA、2 mM MgCl_2 、14 mM 2-ME、pH 7.0）を加えてガラス棒でホモジナイズし、30 SAS溶液にした。さらに沈澱の1.139倍容の30 SAS溶液（0 SAS溶液+1.18 M 硫酸アンモニウム）を加えた。RPR20-2（日立SCR20 BB）で15,000 rpmで40分間遠心し、上清を30 SAS溶液であらかじめ平衡化しておいたフェニルトヨパール650 Mカラム

(6.5 cm × 7.5 cm) にアプライした。30 SAS溶液で洗浄した後、15 SAS溶液 (0 SAS溶液+0.59 M 硫酸アンモニウム)、続いて0 SAS溶液で溶出した。波長280 nmの吸光度でタンパク質を検出し、ピーク画分を集め、これに1/40容の0.2 M CaCl₂を加えて5 mM CaCl₂-15 SAS溶液とした (図1-1)。これをあらかじめバッファー-B₁ (バッファー-B (20 mM Tris-HCl、2 mM MgCl₂、14 mM 2-ME、pH 8.0) +0.08 M NaCl、0.2 mM CaCl₂) で平衡化しておいたカルモジュリン-セファロースCL-4Bカラムにアプライした。バッファー-B₂ (バッファー-B+0.5 M NaCl)、バッファー-B₁で洗浄した後、バッファー-B₃ (バッファー-B+0.08 M NaCl、1 mM EGTA) で溶出した (図1-2)。酵素活性 (PNPPase活性) のある画分を集め、あらかじめバッファー-B₃で平衡化しておいたDEAE-セルロースファインA 500カラム (2.4 cm ×11.0 cm) にアプライした。バッファー-B₃で洗浄したのち、バッファー-B₄ (バッファー-B+1 mM EGTA、0.08~0.3 M NaCl 濃度勾配) で溶出した (図1-3)。PNPPase活性のある画分を集め、バッファー-B₅ (バッファー-B+0.08 M NaCl、1 mM EGTA、50%グリセロール) に対して透析して濃縮し、これを精製カルシニューリン標品とし、-20℃で保存した。

1.2.2 カルシニューリンPNPPase活性測定

反応混液650 μl (終濃度 0.1 M NaCl、10 mM MgCl₂、50 mM TrisHCl (pH 8.5)、7 mM 2-ME、0.1 mg/ml BSA、5 mM PNPP、2 μg/ml CaM、0.4 mM CaCl₂、あるいは1 mM EGTA) にフラクション50 μlを加えて反応を開始した。10分後、35 μlの10% SDSを加えて反応を停止した。波長410 nmの吸光度を測定し、生じた*p*-ニトロフェノールを測定した。

1.2.3 CaNBの単離とS-ピリジルエチル化

精製カルシニューリン溶液を8 M 尿素、0.1 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、20 mM Tris-HCl、pH 8.0に対して透析して変性させ、サブユニットを解離させた。6 M尿素、0.1 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、20 mM Tris-HCl、pH 8.0で平衡化したSephacryl S-200 HRカラムでゲルろ過してCaNBを

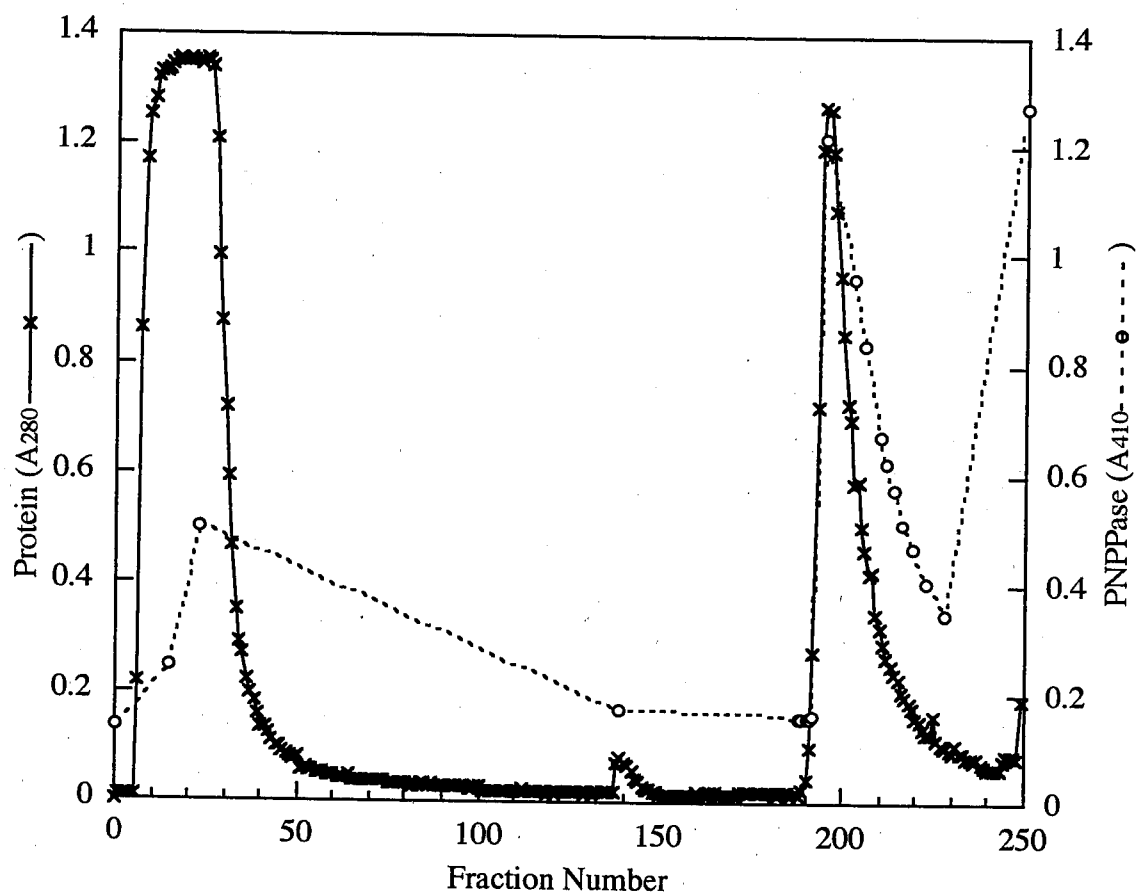


図1-1 ホタテガイ精巣抽出物のフェニルトヨパールカラムクロマトグラフィー

硫酸分画後、30 SASにあわせた抽出液を、30 SAS溶液であらかじめ平衡化したフェニルトヨパール650M (6.5 cm × 7.5 cm) に添加した (フラクション1-25)。同液で洗浄後 (26-175)、15 SAS溶液で溶出し (176-240)、さらに0 SAS溶液で溶出した (241-250)。フラクションは16.4 gずつ、溶出に切り替えてからは9.4 gずつ集めた。カルシニューリンを含むフラクションは、PNPPase活性を測定して検出し、高い活性を示したフラクション193-228を集めてカルモジュリンセファロースカラムクロマトグラフィーに用いた。

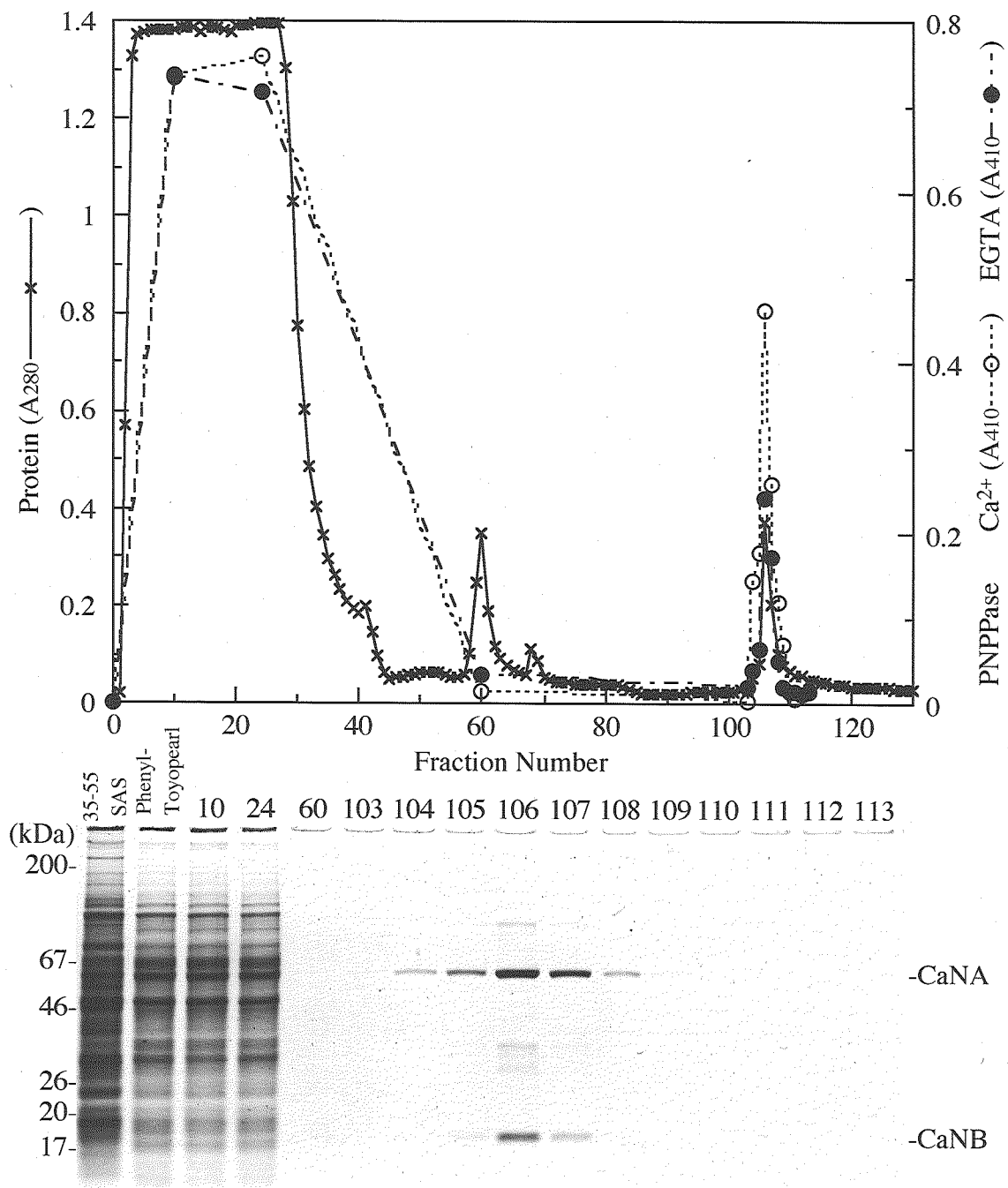


図1-2 カルモジュリン-セファロースCL-4Bカラムクロマトグラフィーにおけるカルシニューリンの溶出曲線

(上) フェニルトヨパールカラムクロマトグラフィーのカルシニューリンを含むフラクションに Ca^{2+} を添加し、バッファーB1で平衡化したカルモジュリン-セファロースCL-4Bカラムにアプライした。バッファーB2 (22-39)、B1 (40-54)、B2 (55-80)、B1 (81-94) で洗浄した後、EGTAを含むバッファーB3でカルシニューリンを溶出した。洗浄液は16.4 g、溶出液は6.4 gずつ集めた。カルシニューリンを含むフラクションは Ca^{2+} 存在下 (○)、非存在下 (●) でのPNPPase活性を測定して検出した。(下) 各フラクションをサンプルとした10%SDS-PAGE。分子量を左に示した。レーンは左より35-55%飽和硫酸画分、フェニルトヨパールカラムクロマトグラフィー後、カルモジュリンセファロースカラムクロマトグラフィーのフラクション10、24、60、103から113。フラクション104から108を集めた。

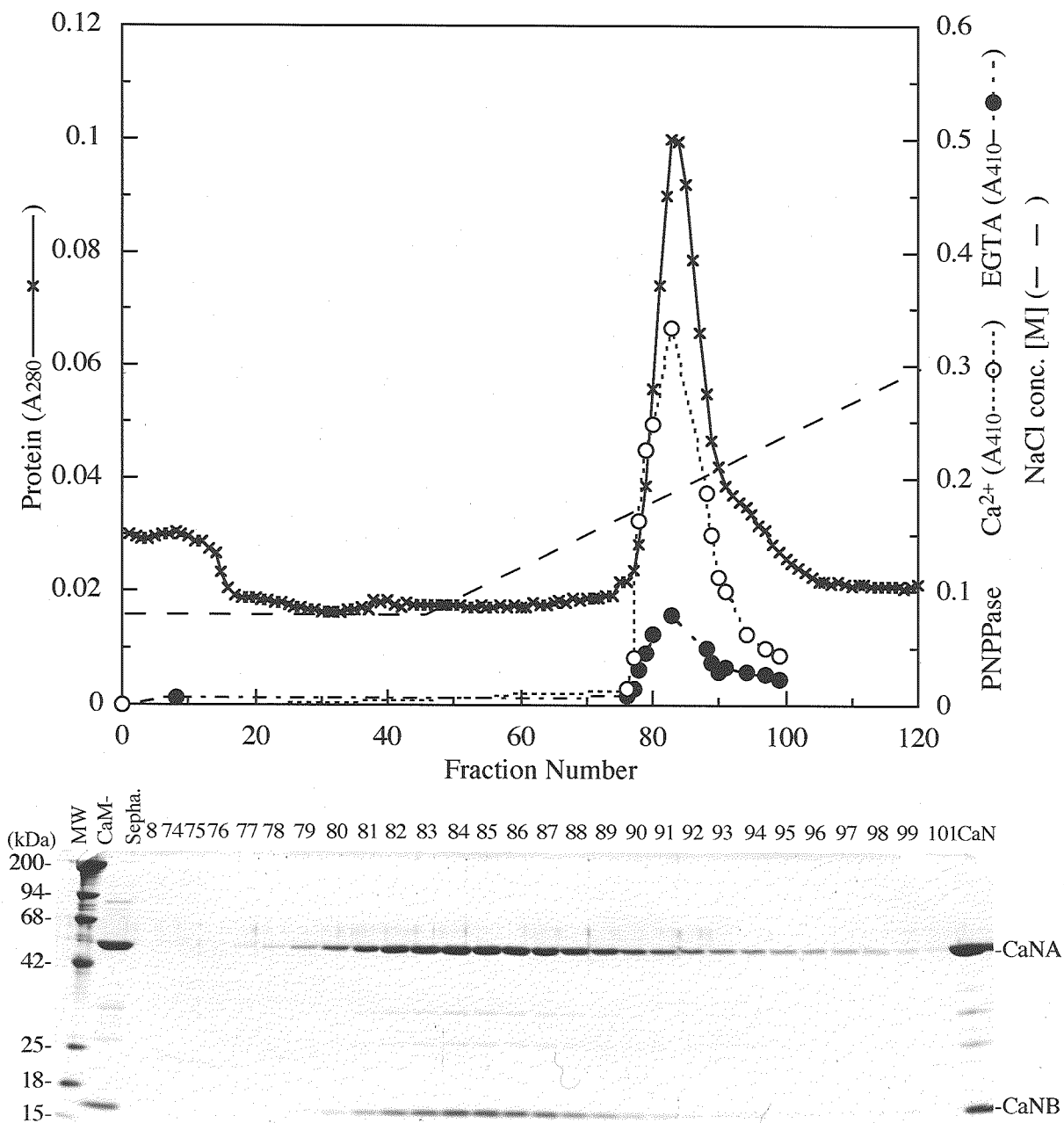


図1-3 DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーにおけるカルシニューリンの溶出曲線

(上) カルシニューリンを含むカルモジュリンセファロースカラムの溶出液をバッファー B₃で平衡化したDEAE-セルロファイン (50 ml) に添加した。同液で洗浄後、0.3 M NaClまでの直線濃度勾配で溶出し、各フラクション5 mlずつ集めた。カルシニューリンを含むフラクションはCa²⁺存在下 (○)、非存在下 (●) でのPNPPase活性を測定して検出した。カルシニューリンを含むフラクション78-87を集め、カルシニューリン標品とした。(下) 各フラクションをサンプルとした10% SDS-PAGE。分子量を左に示した。レーンは左より分子量マーカー、カルモジュリンセファロースカラムクロマトグラフィー後、DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーのフラクション8、74から99、101、最終カルシニューリン標品。

単離した。CaNBを含むフラクションはSDS-PAGEで確認して集めた後、50 mM 炭酸水素アンモニウム、14 mM 2-MEに対して透析し、凍結乾燥した。得られたCaNB乾燥粉末5 mgを7 M塩酸グアニジン、10 mM EDTA、0.5 M Tris-HCl、pH 8.5の溶液300 μ lに溶解し、6 μ lの1 M DTTをくわえて還元した。3時間後、2 μ lの4-ビニルピリジンを加え、25℃で終夜、S-ピリジルエチル化した。溶液を透析チューブに移して100 mlの4M尿素、0.1 M Tris-HCl、pH 8.5に対し透析した。

1.2.4 CaNBのリシルエンドペプチダーゼ消化

S-ピリジルエチル化したCaNB (430 μ l、約30 nmol) に1 μ lの180 pmol/ μ lリシルエンドペプチダーゼ (CaNBに対してモル数で1/200量) を加え、37℃でリシルエンドペプチダーゼによる消化を行った。6時間後、4.3 μ lの0.1 M DFP、4.3 μ lのTFAを加えることで反応を停止した。

1.2.5 CaNBの臭化シアン消化

S-ピリジルエチル化したCaNBを含む溶液をマイクロチューブに取り、濃縮乾固した。このマイクロチューブに100 μ lの1%の臭化シアンを含んだ70%ギ酸を加え、室温で16時間反応させた。その後反応混液を濃縮乾固して反応を止めた。残渣を70%ギ酸で溶解し、濃縮乾固することをさらに二度くり返し、完全に臭化シアンを除いた。

1.2.6 逆相HPLCによるペプチドフラグメントの分離

リシルエンドペプチダーゼ消化物については消化液そのものを、臭化シアン消化物については消化物を濃縮乾固したマイクロチューブに500 μ lの8M尿素、0.1%ギ酸を加えて溶解したものを試料とし、それぞれをサンプルアップ LCR4-LH (Millipore) で濾過した後、濾液を逆相HPLCで分離した。

逆相HPLCは日本分光製のHPLC装置にカラム (COSMOSIL 5C18-AR 4.6 mm $\times$ 150 mm) を接続し、0.1% TFA存在下で行った。消化液を0.1% TFA、5%ア

セトニトリルで平衡化したカラムに吸着させ、同液で洗浄後、60%アセトニトリルまでの濃度勾配（90分間）で溶出した。流速は0.5 ml/min、ペプチド由来の220 nmの吸光度をUV検出器でモニターしフローセルの出口から直接マイクロチューブにペプチドを含む溶出液を受けた。HPLCからの溶出液は遠心乾固し、-20℃で保存した。

1.2.7 アミノ酸配列分析

遠心乾固したペプチドは0.1% TFA-50%アセトニトリルに再溶解してからアミノ酸配列分析を行った。分析は北海道大学機器分析センターに依頼し、492 Potein Sequencer (Applied Biosystems) で行った。

1.2.8 縮重プライマーを用いたPCR法

アミノ酸配列分析で得られた配列に基づいて、縮重プライマーをデザインした。配列はそれぞれB-1s: 5'TIWSIGTNGAYGARTTYATGAC3'、B-3a: 5'ACCATYTTYTTTRTGNACRTCCAT3'である。

ss cDNAはQuickPrep Total RNA Extraction Kit (Amersham Biosciences) を用いて抽出したホタテガイ精巣トータルRNAを鋳型にして、oligo (dT)、プライマーとcDNA Cycle Kit (Invitrogen) を用いて逆転写して調製した。PCR法は2 μ lのss cDNA、各2 μ MのプライマーB-1s、B-3a、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgCl₂、5 U Gene Taq (ニッポンジーン)、1×添付バッファー、総量50 μ lを試料として、95℃ 5分、(95℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 1分) × 30回、72℃ 10分の温度サイクルで行った。

PCR産物を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、目的DNA断片を含むバンドをゲルごと切りだしてすりつぶした後、ゲルの2.5倍容のゲル抽出バッファー（1 mM 酢酸マグネシウム、0.5 M 酢酸アンモニウム、1 mM EDTA、0.1% SDS、pH 8.0）を加えて37℃で終夜攪拌した。遠心してゲル片を除き、上清をフェノール処理した後、エタノールでDNA断片を沈澱させた。回収したDNA断片はOriginal TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いてプラスミド

pCRTMIIにライゲーションし、INV α F' One ShotTM Competent Cellをトランスフォームした。

1.2.9 トータルRNA調製

RNA調製に用いた試薬類には、断りのない限りDEPC処理した水を用いた。トータルRNAの調製にはAGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) 法を用いた。生のホタテガイより切り出した精巢0.25 gを遠心チューブにとり、5 mlのD溶液 (4 M チオシアン酸グアニジン、25 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0、0.5% サルコシル、0.1 M 2-ME) を加えてポリトロンで30秒間、3回ホモジナイズした。0.5 mlの2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) を加え、チューブを数回反転させて混合し、さらに5 mlの水飽和フェノールを加えてチューブを反転させて混合した。1 mlのCHCl₃/IAA (クロロホルム49 : イソアミルアルコール1の混合溶液) を加えて10秒間激しく混合した。氷上に15分間静置したのち、RPR-18 (日立SCR20 BB) で12,000 rpm、4℃で20分間遠心した。透明な上層 (約4 ml) を新しい遠心チューブに移し、2倍容の氷冷エタノールを加えて混合した。−20℃に1時間静置してRNAを凝縮させた後、RPR-18で12,000 rpm、4℃で20分間遠心してRNAを沈澱させた。沈澱を0.3 mlのD溶液に溶解してマイクロチューブに移した。遠心チューブ中を0.1 mlのD溶液で洗浄してこれもマイクロチューブに加えた。2倍容の氷冷エタノールを加えて−20℃で1時間静置した後、4℃、14,800 rpmで20分間遠心した。沈澱に0.2 mlの80%エタノールを加え、チップの先で沈澱を崩して10分間室温に放置後、14,800 rpmで5分間遠心した。沈澱を風乾後、100 μlのDEPC処理水を加え、65℃で溶解した。11 μlの3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.1) 、275 μlのエタノールを加えて混合し、−20℃で保存した。

1.2.10 ポリ(A)⁺RNAの精製

ポリ(A)⁺RNAはOligo (dT) celluloseを用いて精製した。0.1 gのOligo (dT) celluloseを1.5 mlの0.1 N NaOHで懸濁し、室温で2時間膨潤させた。浮遊セルロー

スを除き、Biospinカラム (Biorad) に充填した。カラムを4 mlのDEPC処理水、次に4 mlのBバッファー (0.5 M NaCl, 1× TE) で洗浄し、カラムのpHを約6にした。遠心してエタノールを除いた1 mgのトータルRNAは、800 μ lのDEPC処理水、100 μ lの10× TEを加えて懸濁し、65℃で5分加熱してRNAを溶解した。RNAは14,800 rpmで5分間遠心して不溶性の成分を除いてから、65℃で5分再加熱後、氷上で急冷し、100 μ lの5 M NaClを加えた後、カラムにアプライした。素通り液をカラムに再アプライすることを3回くり返した後、3 mlのBバッファーでカラムに結合しなかったRNAを洗浄した。カラムに結合したポリ(A)⁺RNAはTE-0.05% SDSで溶出し、溶出液は2滴ずつマイクロチューブに集めた。カラムは2 mlのTE-0.05% SDS、つぎに4 mlのBバッファーで洗浄して再生した。RNAを含むフラクションは、溶出液各1 μ lを20 μ lの1 μ g/ml臭化エチジウムに加えて、UVランプで検出した。RNAを含む画分をあわせ、65℃で5分間加熱、氷冷した後1/9容の5 M NaClを加えた。白濁したため、等量のBバッファーを加え、65℃で再加熱、氷冷し、再生したカラムにアプライした。一回目と同様に、素通り液をカラムに再アプライし、Bバッファーで洗浄、TE-0.05% SDSでポリ(A)⁺RNAを溶出した。RNAを含む画分をあわせ、1/9容の3M NaCl、2.5倍容のエタノールを加え、-80℃で保存した。

1.2.11 cDNAライブラリーの構築

ds cDNAの合成にはのTimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences) を利用した。プライマーにはランダムプライマー-oligo (dN)₆を0.74 μ g用い、5 μ gのポリ(A)⁺RNAをキット付属のプロトコルに従って逆転写した。得られたds cDNAの半量にEcoR I/Not Iアダプターをキット付属のプロトコルに従ってライゲーションした。得られたds cDNA/アダプターの半量を3.9 μ gの λ gt10ベクター (STRATAGENE) のEcoR Iサイトにライゲーションし、GIGAPACK II Plus (STRATAGENE) を用いてパッケージングをおこない、400万個の組換え体を得た。

1.2.12 プローブの放射能ラベル

電気泳動法で分離し、ゲルから回収したDNA断片 (1s-3a、またはfrg.4) をRandom Primer DNA Labeling Kit (Takara) と [α - 32 P] dCTPを用いて 32 Pで標識した。

1.2.13 ライブラリーのスクリーニング

スクリーニングは新細胞工学実験プロトコール1-4-1を改良して行った。宿主には大腸菌NM 514株を使用した。NZY培地を使ってプレーティングし、37℃で6時間培養した。プレートを4℃で冷やし、プラークをナイロン膜 Hybond-N+ (Amersham Biosciences) に転写した。変性バッファーは1.5 M NaCl、0.5 M NaOHを、中和バッファーは1.5 M NaCl、0.5 M Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 7.2を用いた。5× Denhardt's溶液を含むハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド、6× SSC、5× Denhardt's溶液、0.5% SDS、100 μ g/ml サケ精巢DNA) でプレハイブリダイゼーションを42℃で2時間行い、4~10 ng/ml のプローブ (比活性 1×10^8 dpm/ μ g) を含むハイブリダイゼーションバッファー中でハイブリダイゼーションを42℃で終夜行った。2× SSC-0.1% SDSを用いて室温で15分3回洗浄し、さらに0.2× SSC-0.1% SDSを用いて50℃ (プローブ1s-3a)、または37℃ (プローブfrg.4) で30分3回洗浄した後、膜を乾燥させた。陽性プラークは、Fujix BAS 2000で検出した。

1.2.14 λ ファージの精製とサブクロニング

丸シャーレのNZYアガロース培地にNZYトップアガロースでファージをまき、コンフルエントになるまで (約8~10時間) 37℃で培養した。プレートを4℃に冷却した後、4 mlのSMバッファーをトップアガロース上にまき、ファージ粒子を拡散させた。 λ ファージの精製はCurrent Protocols in Molecular Biology 7.3.3に従った。 λ ファージは制限酵素EcoR IまたはNot Iで切断し、インサートをゲルより回収し、各酵素で消化したプラスミドpBluescriptII SK⁺にライゲーションした。

1.2.15 プラスミドの精製

プラスミドはMolecular Cloning 1.25のアルカリ-SDS法を一部改良して精製した。Solution 1~3 の処理の後、遠心上清を等量の5 M 塩化リチウムと混合して4℃で30分静置し、遠心してRNAを除いた。上清中に残ったRNAは、5 μ gのRNaseAで処理した。この後、フェノール/クロロホルム処理をし、エタノールを加えてプラスミドDNAを回収した。

1.2.16 塩基配列分析

精製したプラスミドを鋳型に、テキサスレッドで標識されたT7プライマー、T3プライマー、またはM13 reverseをプライマーに用いてThermo Sequenase pre-mixed cycle sequencing kit (Amersham Biosciences) によりジデオキシチエンターミネーション反応をおこなった。これを、DNAシーケンサーSQ 5500 (Hitachi) で分析し、塩基配列を決定した。

1.2.17 DNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動

ゲルは6% アクリルアミド-ビスアクリルアミド (30:1)、1× TBE、0.14% 過硫酸アンモニウム、0.12% TEMEDに調製して用いた。泳動バッファーは1× TBEを用いた。DNAは泳動後、ゲルを1 μ g/mlの臭化エチジウムを含む1× TBEで20分間染色し、UVランプで検出した。

1.2.18 RNAのホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動

20 μ gのトータルRNA、または2 μ gのポリ(A)⁺RNAを3.5 μ lのDEPC処理水に溶解し、5 μ lのホルムアルデヒド、1.5 μ lの10× MOPS、2 μ lのホルムアルデヒドを加えて65℃で5分間加熱した後、氷上で急冷した。3 μ lの5× RNA dye-glycerolを加え、1× MOPS、5.8%ホルムアルデヒド、1% アガロースゲルで、50 V定電圧で1時間泳動した。泳動バッファーには1× MOPSを使用した。ゲルを1 μ g/ μ lの臭化エチジウムで30分間染色し、脱イオン水で15分間2回脱

染色してからUVランプでRNAを検出した。RNAをナイロン膜 (Hybond-N+) にキャピラリーブロットした後、膜を80℃で乾燥させてRNAを固定した。

1.2.19 ノーザンブロッティング

ノーザンブロッティングは新細胞工学実験プロトコール2-1-2を参考に、一部改良して行った。RNAを固定したナイロン膜を50% ホルムアミド、5× SSC、0.05 M リン酸ナトリウム、40 μ g/mlサケ精巢DNA、5× Denhardt's溶液、0.5% SDSを含むバッファーで膜を2時間プレハイブリダイゼーションを行った後、3 ng/mlの放射ラベルしたプローブ1s-3a (1×10^9 dpm/ μ g) を含む新しいバッファーを用いて42℃で終夜ハイブリダイゼーションを行った。2× SSC-0.1% SDSで室温で15分間3回、さらに0.2× SSC-0.1% SDSで37℃終夜洗浄した後、膜を乾燥させた。放射活性のあるバンドはFujix BAS 2000で検出した。

1.2.20 CaNB mRNA 発現量の季節変化の定量

CaNB mRNAの発現量の定量するには、各月のトータルRNAとスタンダード用のトータルRNAを同時にブロッティングし、スタンダードのCaNBのmRNAのバンドの放射活性を基準に各月の各個体のCaNBのmRNAの発現量を相対化した。精巢の成熟度をはかる目安となる生殖巣指数は、以下の計算式

$$\text{生殖巣指数} = \text{精巣重量} / \text{軟体部重量} \times 100$$

から求めた。

1.3 結果

1.3.1 CaNBのアミノ酸配列分析

ホタテガイ精巢から精製したカルシニューリンのサブユニットを解離させ、ゲル濾過によりCaNBを分離した。得られたCaNBを逆相HPLCで精製し、アミノ酸シーケンサーでアミノ末端分析を行ったところ、PTHアミノ酸は検出されなかった。これより、ホタテガイ精巢CaNBのN末端のアミノ基は、ほ乳類のCaNBと同様になんらかの化学修飾を受けていることが示唆された。このため、

CaNBをリシルエンドペプチダーゼ、臭化シアンで消化し、逆相HPLCを用いてペプチドを単離した（図1-4 A、B）。

単離したペプチドについて、アミノ酸配列分析を行った（図1-5）。得られたアミノ酸配列のオーバーラップを考慮して、7本のペプチド断片のアミノ酸配列、149残基が決定できた。これは、哺乳類の脳型CaNBのアミノ酸残基数が170残基であることを考慮すると、全体の88%に相当する。リシルエンドペプチダーゼ消化ペプチドk9では、5番目のPTH-バリリン以降、PTHアミノ酸が回収されなかったことから、このペプチドが一番C末端側に位置すると考えられた。

1.3.2 CaNBのcDNA塩基配列分析

アミノ酸配列分析で得られた配列を、ラットの脳型CaNBと比較し（図1-6）、N末端側とC末端側の配列から縮重プライマーを設計した。ホタテガイ精巢ss cDNAを鋳型に用い、合成したプライマーB-1s、B-3aを使ってPCR法を行った。PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、約350 bpのバンドが特異的に増幅していた（図1-7 A）。このバンド成分を目的物と考え、DNA断片をゲルより回収してTAクローニングベクターにサブクローニングし、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を分析した。得られた配列（343 bp）は、アミノ酸配列分析で決定したCaNBの部分一次構造をコードしていた（図1-7 B）。

PCR法で得られたcDNA断片（プローブ1s-3a）をプローブに用い、ノーザンブロッティングを行った。ホタテガイ精巢、ラット精巢のトータルRNA、またはポリ(A)⁺RNAをホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動法で展開した。ナイロン膜に転写し、放射ラベルしたプローブ1s-3aでハイブリダイゼーションを行ない、膜を乾燥後、放射活性のあるバンドをオートラジオグラフィーで検出した（図1-8）。ラット精巢トータルRNAでは、ラット脳型CaNBのmRNAと推定される約4 kbのバンドがクロスハイブリッドを形成しているのが検出され、これはChangらの結果と一致した(9)。一方、ホタテガイ精巢のRNAでは、

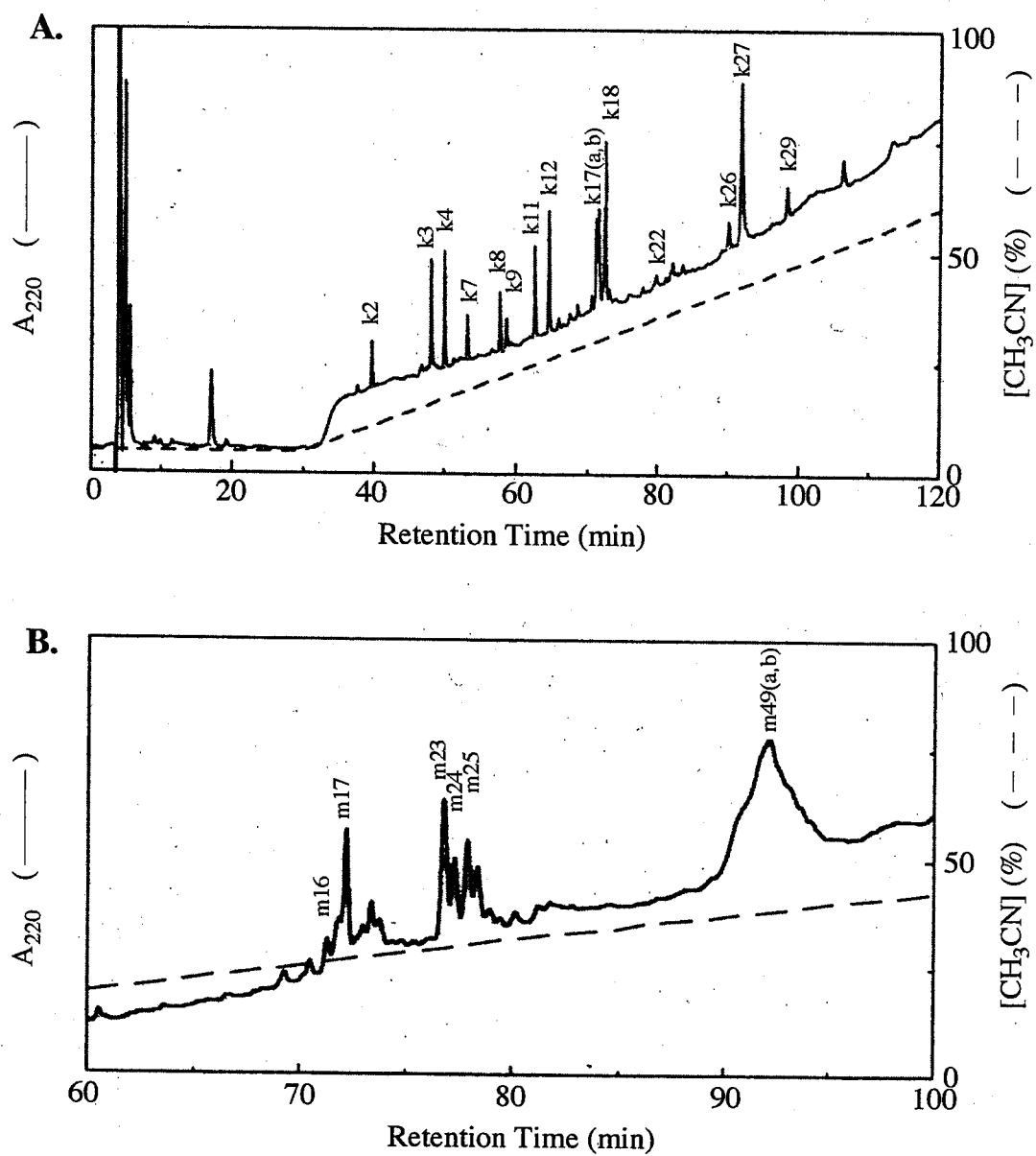


図1-4 CaNB消化物の逆相HPLCによる分離

A. CaNBのリシルエンドペプチダーゼ消化物、B. CaNBの臭化シアン消化物の逆相HPLCの溶出曲線。ペプチドは波長220 nmの吸光度で検出した。

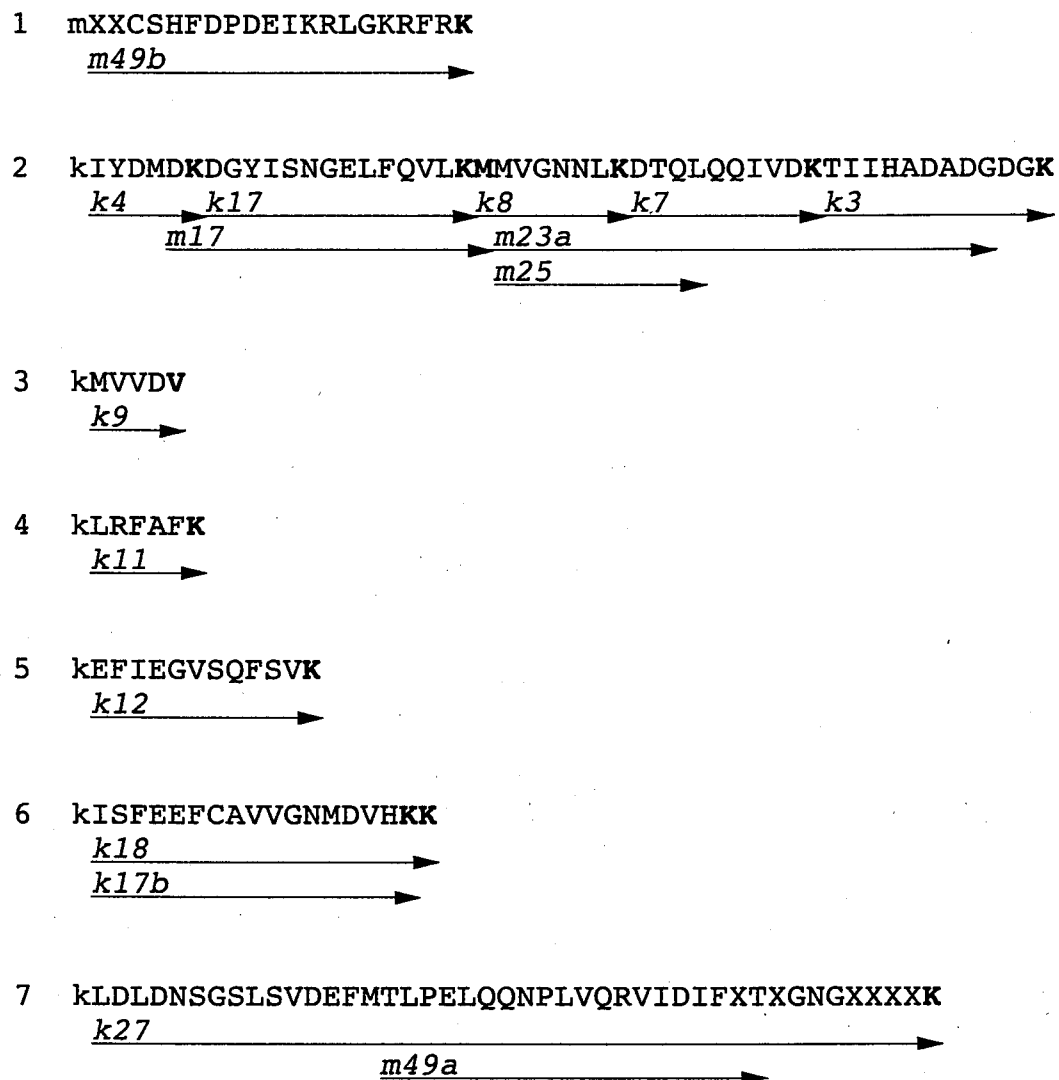


図1-5 CaNB消化ペプチドのアミノ酸配列

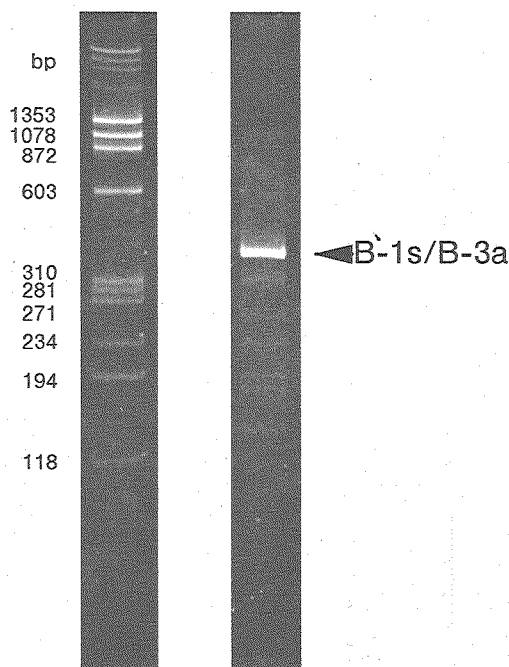
配列の下に示したk3からk27、m17からm49bは図1に示した逆相HPLCで溶出したペプチドのピーク番号に対応する。各ペプチドのアミノ酸配列分析で決定された 基の下に矢印を引いた。太字で示した 基は各アミノ酸配列分析で回収された最後のPTHアミノ酸を示す。

	10	20	30	40	50	60	
a.	MGNEASYPLE	MCSHFDAD	EIKRLGKR	FKKLDL	NSGSLSV	EEFMSLP	ELQ QNPLVQRVID
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
b.	MX	XCSHFDP	DEIKRLGKR	FRKLDL	NSGSLSV	DEFMTLP	ELQ QNPLVQRVID
	70	80	90	100	110	120	
	IFD	TGNGEV	DFKEF	IEGVS	QFSVK	GDKEQ	KLRFAFRIYD
	MDK	DGYISNG	ELFQVLKMMV				
	** * *	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	IFX	TXGNGXX	XXKEF	IEGVS	QFSVK		KLRFAFKIYD
	MDK	DGYISNG	ELFQVLKMMV				
	130	140	150	160	170		
	GNN	LKDTQLQ	QIVDK	TIINA	DKDGD	GRISF	EEFCAVVGG
	DIH	KKMVVDV	/170				
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	GNN	LKDTQLQ	QIVDK	TIIHA	DADGD	GKISF	EEFCAVVG
	DVH	KKMVVDV					

図1-6 CaNBアミノ酸配列の比較と縮重PCRプライマーの設計

アミノ酸配列分析で得られたホタテガイ精巢CaNBの部分アミノ酸配列 (b) を、ラット脳型CaNBのアミノ酸配列 (a) を参考に並べた。N端側、C端側から縮重の少なくなる配列を選んだ (四角でかこった領域)。

A.



B.

t	tta	ccg	gaa	cta	caa	caa	aat	cca	ctg	gtg	cag	aga	gtg	ata	gac	ata	ttc	gac	act	gat
	L	P	E	L	Q	Q	N	P	L	V	Q	R	V	I	D	I	F	D	T	D
gga	aac	gga	gaa	gta	gat	ttc	aaa	gaa	ttc	atc	gag	ggt	gta	tca	caa	ttt	agt	gta	aaa	
	G	N	G	E	V	D	F	K	E	F	I	E	G	V	S	Q	F	S	V	K
gga	gac	aag	cta	tca	aaa	tta	aga	ttt	gca	ttt	aaa	atc	tac	gac	atg	gac	aag	gac	ggg	
	G	D	K	L	S	K	L	R	F	A	F	K	I	Y	D	M	D	K	D	G
tat	att	tcc	aat	gga	gaa	ctg	ttt	caa	gta	cta	aag	atg	atg	gta	ggc	aac	aac	ctt	aaa	
	Y	I	S	N	G	E	L	F	Q	V	L	K	M	M	V	G	N	N	L	K
gat	acg	cag	ctt	cag	cag	ata	gtg	gat	aag	acc	atc	atc	cat	gct	gat	gct	gat	gga	gat	
	D	T	Q	L	Q	Q	I	V	D	K	T	I	I	H	A	D	A	D	G	D
gga	aaa	atc	tcc	ttt	gaa	gaa	ttt	tgt	gct	gtt	gta	gga	aat							
	G	K	I	S	F	E	E	F	C	A	V	V	G	N						

図1-7 縮重プライマーB-1s/B-3aを用いたPCR

A. PCR産物の6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動。左 ϕ X174/Hae III 160 ng、右 プライマーB-1s/B-3a間で増幅させたPCR反応混液の2 μ l。各試料を1×TBE-6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ゲルを臭化エチジウムで染色してUVランプでDNAを検出した。この結果、目的物と見られる約350 bpのバンドが特異的に増幅していることがわかった。このバンドを抽出してサブクローニングした。 B. PCR法で得られたバンド成分B-1s/B-3aの塩基配列。TAクローニングベクターにサブクローニングしたPCR産物をDNAシーケンサーで分析した。分析できた塩基配列（343 bp）を上段に、コードするアミノ酸配列を下段に示した。アミノ酸配列分析で得られたホタテガイ精巢CaNBのアミノ酸配列と一致したアミノ酸は下線で示した。

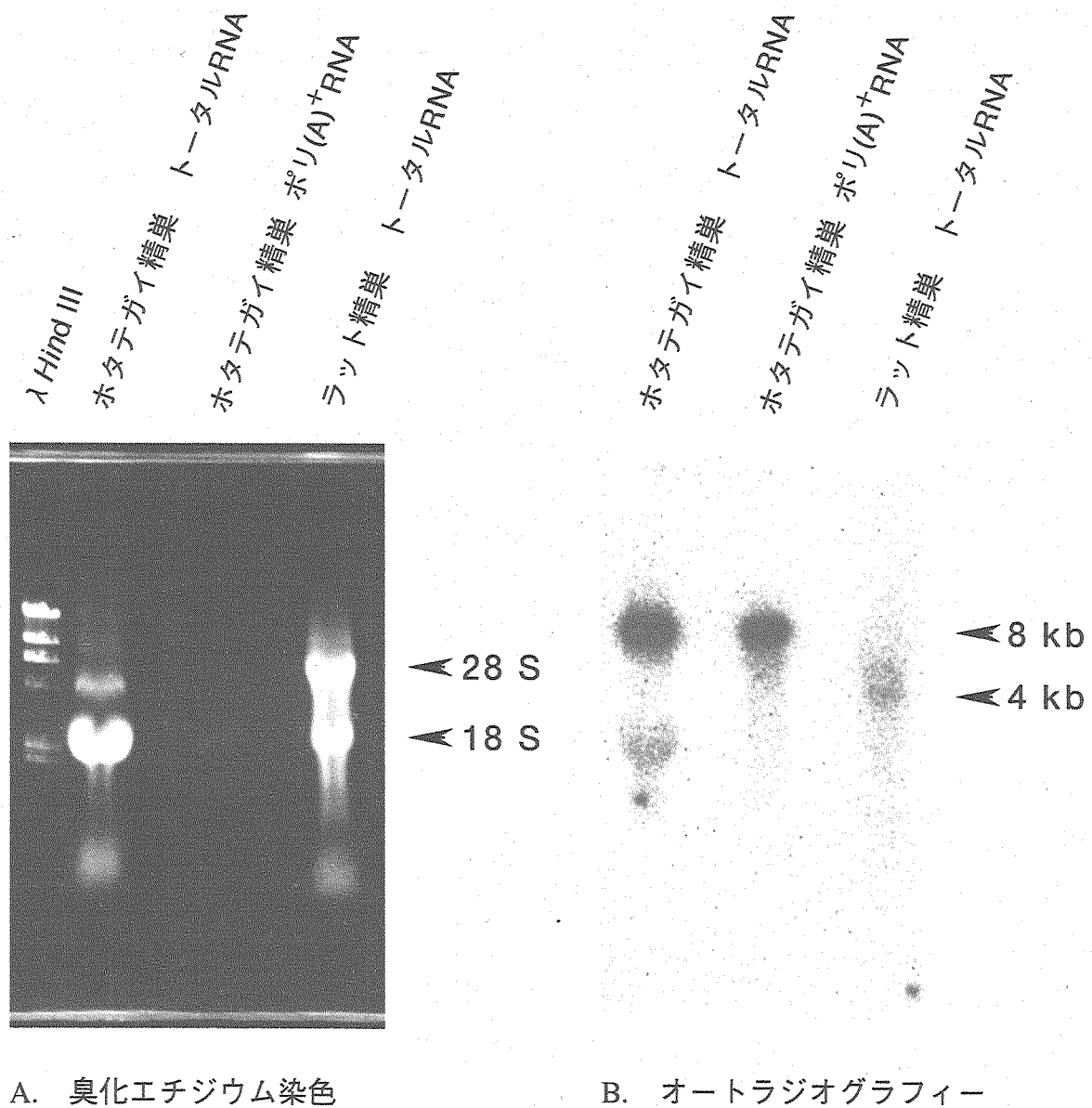


図1-8 ノーザンブローディングによるCaNB mRNAの検出

A. ホタテガイ精巣トータルRNA (20 μ g)、ポリ(A)⁺RNA (2 μ g)、ラット精巣トータルRNA (20 μ g) をホルムアルデヒド変性1.5%アガロースゲル電気泳動法で展開し、臭化エチジウムで染色した。 B. RNAをナイロン膜に転写し、³²Pでラベルしたプローブ1s-3aとハイブリッド形成させ、オートラジオグラフィーで検出した。ホタテガイ精巣RNAでは、約8 kbの位置に、ラット精巣RNAでは約4 kbの位置にバンドが検出された。

約8 kbのバンドのみが検出された。ノーザンブロッティングの結果より、通常のoligo (dT)プライマーを用いた逆転写では、CaNB mRNAの全長8 kbを含むds cDNAを得るのは困難であることが予測された。これは鋳型RNAが高次構造を形成することにより、逆転写反応の進行が止まってしまうためである。また、完全長のcDNAが得られたとしてもファージベクター λ gt10には大きすぎて組み込めないことが予測された。このため、ライブラリー構築にはランダムプライマーoligo (dN)₆をプライマーに用いて逆転写したds cDNAを使用した。ds cDNAをファージベクター λ gt10に挿入して、400万個の組換え体を得た。プローブ1s-3aを用いてライブラリー中の80万個のファージをスクリーニングし、15個の陽性プラークを得た。このうち、8個のプラークのインサートについて、サブクロニングを行い、塩基配列を決定した(図1-9)。

プローブ1s-3aで単離されたクローンで最も3'側に近い配列を持つp21からRsa Iサイトで切り出した800 bpのDNA断片(プローブfrg.4)を用いて、さらに3'側の配列を探索した。50万個のファージをスクリーニングし、7個の陽性クローンを得た。インサートをサブクロニングし、2つのクローンについて塩基配列を決定したところ、クローンs15は5'側はプローブ1s-3aでスクリーニングされた配列と一致したが、プローブfrg.4領域の途中から3'側では配列が異なり、これはクローンs14-1の配列とも異なっていた。これはライブラリー構築時のリンカー部位付加操作で二つのcDNAが結合してしまったアーティファクトである可能性が高いと考えられた(図1-9)。

得られた様々な大きさのクローンについて、配列の重複を考慮して、cDNAの塩基配列を確定した。この結果、CaNBのmRNA全長の半分に相当する約4 kbpの塩基配列が得られ、このうち、オープンリーディングフレーム

(ORF) 510 bpを含む全長約2,000 bpの配列が決定できた(図1-10)。この領域中にはポリ(A)⁺領域は含まれていなかった。ORFの塩基配列から推定されるCaNBのアミノ酸配列170残基はアミノ酸配列分析で決定した149残基と一致した。

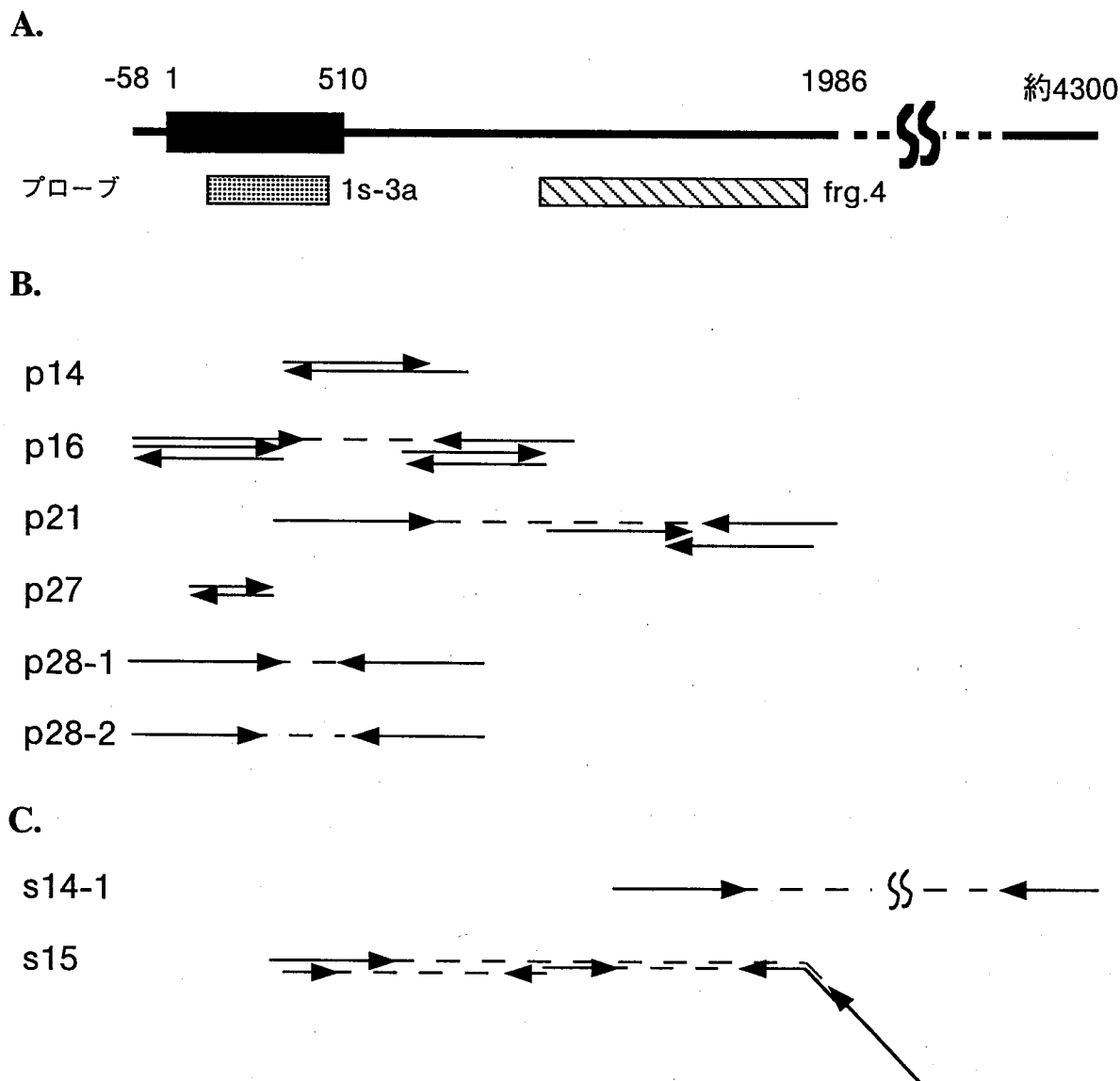


図1-9 プローブに使用したDNA断片の領域と単離されたcDNAクローン

A. ホタテガイ精巢CaNBのcDNAを単離されたcDNAクローンの重複領域を分析して決定した。■はオープンリーディングフレームを、数字は開始コドンからの塩基数を示す。■はプローブ1s-3a、▨はプローブfrg.4の領域を示す。 B. プローブ1s-3aで単離されたクローン。シーケンサーで塩基配列を決定できた部分と向きを矢印付き実線で示した。 C. プローブ1s-3aで単離された領域の3'側配列 (frg.4) をプローブにして単離されたクローン。クローンs14-1は全長約3,000 bpで、塩基配列を決定できた領域中にはポリ(A)⁺領域は含まれていなかった。s15は全長2,066 bpで5'側の1,572 bpは313番から1,884番までの塩基と一致したが、3'側の494bpは他のクローンの配列と一致しなかった。

-58 ctgggccaggaatcgcaatattttac ctgtcgtatttagacacagcaagctacaaaa -1

*

```

1  atgggaaatgaaaattctttgccatggag ttatgctcaaattttgatccagatgagatt aagagattaggcaaacgttttcgtaagctt  90
   M G N E N S L P M E _ _ _ L C S N F D P D E I K R L G K R F R K L
31  gatttggataactctggttcctgagcgta gacgagtttatgactttaccggaactacaa caaatccactggtgcagagagtgatagac  180
   D L D N S G S L S V D E F M T L P E L Q Q N P L V Q R V I D
61  atattcgacactgatggcaacggagaagta gatttcaaagaattcgcgaggtgtatca caatttagtgtaaaaggagacaagctatca  270
   I F D _ T D G N G E V _ _ D F K E F I E G V S Q F S V K G D K L S
91  aaattaagatttgcatttaaaatctacgac atggacaaggacgggtatatttccaatgga gaactgtttcaagtactaaagatgatggta  360
   K L R F A F K I Y D M D K D G Y I S N G E L F Q V L K M M V
121 ggcaacaaccttaagatacgcagcttcag cagatagtggataagaccatccatgct gatgctgatggagatggaaaaatctccttt  450
   G N N L K D T Q L Q Q I V D K T I I H A D A D G D G K I S F
151 gaagaattttgtgctgtttaggaaatag gatgtccacaagaagatggtcgtagatgta tagtcttgtgaaatccagattaaatacatt  540
   E E F C A V V G N M D V H K K M V V D V _ *

```

```

   ttcattttaacttatttccatgacattgca attaatataatgctgcagatgaatccatcg attttcaaaatttgttccagtttgttcat  630
   tgttctgagtattggtgtgagtgcaagct ggtttaacaaatgaccgctgattcagtgtc ttgtctgaggcctctgctacacatatattgt  720
   ataccaagaacctttattgtatcaaatat atatatatacacataataattcaacaaagt taagaaatattgtagaatgaagaaaaatat  810
   tatttgacttcaaaacttccaaacttccat tgtattaaactgtatttgactaccttatt ttcaaatctatcatattatagatttaactg  900
   tcccacaagaatccttcattatgtttttta ttgaatattttgtgtttgagacagaacct tgataccttatatggcttatatttgatatatg  990
   tatagcatgtccaaagttgaactaacctca atctgccattgtatgttagctgagtttagac atttatatatttttagcggaagtaattttca  1080
   ggagtttgatttagcaaaggatatttttat tcagctgcacaaagtacaattctcagacaag acttgaatcattgacgatttcaatatattc  1170
   cctttaaatgactttttcaaaatttaaggta ttatcggaaaaaaaggtaaatctgtatgga ttacaagcactgctcaatctcttattacaa  1260
   acttgatgtttgcagttgttttacttattt gacttatattattctgtctctgtcctgct gacattatagttgtaacaaaaaaatgaacct  1350
   ccatgcataatgggtttaccatgaaatgga agataaccacagttgggtataacgggcagtat tataagaaccaccaagatgtcaagaggact  1440
   tgcgctgatttaaacactgtcattccttgt aaagttgtgtgcttttctaacagtgctcta gatatttttagtgactggttgtatgtgttg  1530
   taaaatttgatccttaaccactttccttaa agtgtttttttgcccttttaacctgaaaag acttogttgcatgttttctgtctaccgtt  1620
   gattaacagaattgtgaggactgtaaaac tcacttcaatatgaatgtatcatgcaaggc taaaattgaacagcaacaaaattgatact  1710
   actgaaagcaagttgaataacaagtaaaaca tccacgstsattatctgtgtatcatcactgc tttccagactgttcatatogaacaaacatca  1800
   acttgcatgaaggaagtttgaagatatat tgtgtgaggttggaaaaaaaggctgacaat tttatgtcaataatgtaaaagatagaaggct  1890
   tatagcattttacatttgattgaagtgagg gtacaaattatttatatatataatatatat atatatatatacatacaaactattttatgct  1980
   gtcaa 1985

```

図1-10 ホタテガイ精巢CaNBのcDNA塩基配列

上段に塩基配列を、下段に推測されるアミノ酸配列を示した。開始コドンには二重下線、終止コドンには星印と二重下線をつけた。左の数字はアミノ酸番号、右の数字は塩基番号である。アミノ酸配列分析で得られた部分には下線を引いた。

1.3.3 ホタテガイ精巢CaNB mRNA発現量の季節変化

夏から秋の終わりにかけてはホタテガイの精巢は薄くて小さく、透明である。しかし、冬の初めから春にかけて、ホタテガイ精巢は成熟して大きくなり、厚みと丸みを増してくる。ホタテガイは海水温の上昇に伴い、通常5月の初めに放卵・放精する。この精巢の成熟過程において、精巢の生殖細胞は分化、減数分裂、精子変態をおこない、ダイナミックに変化する。カルシニューリンは他のカルシウム／カルモジュリン依存性の酵素と同様に精巢の成熟に伴った機能に関与しているのではないかという可能性を調べるため、ノーザン法でCaNBのmRNAの発現量を定量した。

プローブ1s-3aを用いてノーザンブロッティングを行い、CaNBのmRNA発現量の季節変化をみた(図1-11 A、B)。10月から3月までのホタテガイ精巢から調製したトータルRNAをホルムアルデヒド法で電気泳動し、放射ラベルしたプローブでCaNBのmRNAを検出した結果、すべての月で一本のバンドが検出された。

さらに詳細に調べるため、ホタテガイ産地を固定し、検体量を増やしてmRNA発現量変化を定量した。噴火湾(八雲)産のホタテガイ2年貝について、1997年10月から1998年5月まで、および1998年5月から1999年3月まで、各月10個体のホタテガイ精巢からトータルRNAを抽出し、サンプルとした。プローブ1s-3aを用いてノーザンブロッティングをおこない、バンドの放射活性からCaNB mRNAの発現量を定量した。年間を通じて、ホタテガイ精巢に発現しているCaNB mRNAは8 kbの分子種のみだった。この8 kbのmRNA分子種の発現量は1月から3月にかけて劇的に増加し、その後急速に減少した(図1-11 C)。精巢が一番発達する時期は4月であり、CaNBの発現はそれにひと月先駆けてピークを迎えることがわかった。

1.4 考察

今回決定したcDNA塩基配列から、ホタテガイ精巢CaNBの全アミノ酸配列170残基が推定された。アミノ酸配列分析から得られたホタテガイ精巢CaNBの

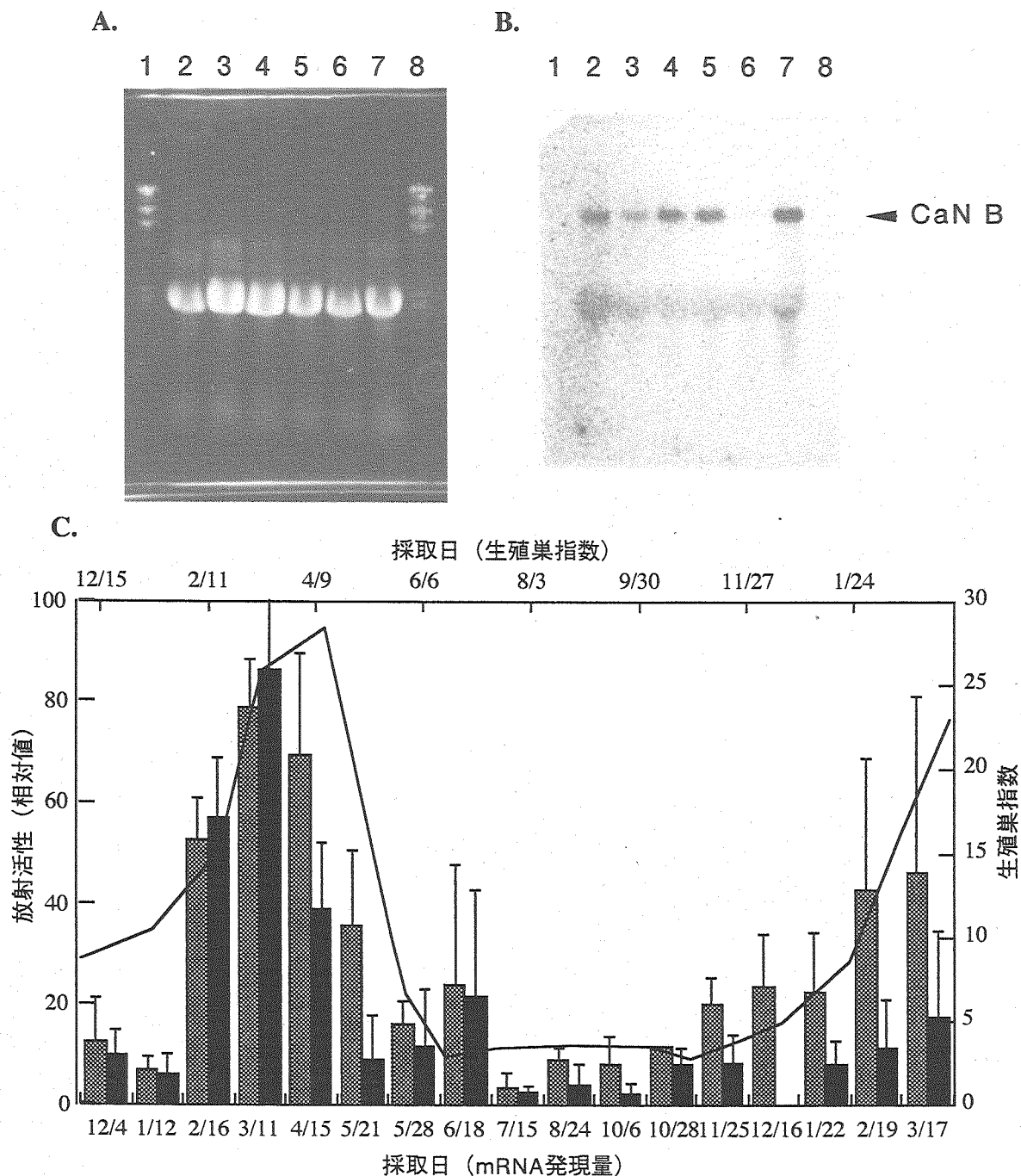


図1-11 ホタテガイ精巣CaNB mRNA発現量の季節変化

ホタテガイ精巣トータルRNA (20 μ g) を1.0 %ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動法で展開し、メンブレンに転写してノーザンハイブリダイゼーション法でCaNB mRNAを検出した。A. アガロースゲルの臭化エチジウム染色。B. 32 P標識したプローブ1s-3aで検出したオートラジオグラム。A、Bともにレーン1, DNAマーカー λ Hind III、レーン2, 10月、レーン3, 11月、レーン4, 12月、レーン5, 1月、レーン6, 2月、レーン7, 3月、レーン8, DNAマーカー λ Hind III。精巣の成熟する冬から春にかけて、CaNB mRNAの発現量が増加する傾向が見られた。

C. 横軸にホタテガイの採取日を、縦軸に生殖巣指数とCaNAおよびCaNB mRNA発現量を示した。mRNA発現量は、発現量のもっとも多いサンプルを100として相対値化し、各月の平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。■CaNA mRNA発現量、■CaNB mRNA発現量。なお、CaNA mRNA発現量の値は瓜生の結果を用いた。

配列149残基は、cDNA塩基配列から推測される配列と完全に一致した（図1-10）。

ホタテガイ精巢CaNBのcDNAをアミノ酸配列分析で同定できたN末端の配列と同じ読み枠で5'側に翻訳すると、-21位に終止コドンが現れた。翻訳開始点は、この終止コドンの下流にある最初のメチオニンであると推定した。ホタテガイ精巢CaNBのC末端は、アミノ酸配列分析からLys-C消化ペプチドk9が一番C末端に近いペプチドであると考えられた。ペプチドk9の最後のバリン残基をコードする塩基配列では直後に終止コドンtagが現れることから、k9がC末端であることが裏付けられた。

アミノ酸配列分析では、未消化のCaNBの配列分析ができなかったことからN末端のアミノ基は修飾を受けていることが推測された。ウシ脳より精製されたCaNBでは、N末端のグリシンがミリストイル化されていることがわかっているが、今回のホタテガイCaNB cDNAから推定されたアミノ酸配列のN末端にもミリストイル化のコンセンサス配列MGXXXS/Tがあった(40)。これより、ホタテガイ精巢CaNBもウシ脳と同様にミリストイル化によってN末端がブロックされていると考えられる(41)。CaNBのミリストイル基の役割については、いまだに良くわかっていない。ミリストイル基は炭素数14の飽和脂肪酸であることから、膜への結合や基質選択などに関与しているのではないかと、いわれてきた。近年、ミリストイル基によってカルシニューリンの熱安定性が高まることが報告され、ミリストイル基の役割の1つの可能性が明らかになった(42)。しかし、低温の海水に住み、高温にさらされることのないホタテガイでもミリストイル基が保存されていることから、熱安定性以外にも何か重要な機能に関与していると考えてもよいだろう。

今回得られたホタテガイ精巢CaNBのアミノ酸配列を他の生物のCaNBと比較した（図1-12）(9, 43)。四角で囲った領域は、EFハンド構造のCa²⁺を結合するモチーフである。カルシニューリンは、CaNBへのCa²⁺結合によって触媒活性が上昇することがわかっているが、4つあるCa²⁺結合サイトのすべてで非常によく保存されていることから、ホタテガイ精巢カルシニューリンも他の生物

のカルシニューリンと同様にCaNBへのCa²⁺結合によって触媒活性が制御されていると考えられる(10)。

カルシニューリンの研究のすすんでいるラット、マウスでは、精巣に特異的に発現しているアイソフォームがCaNA、CaNBともに報告されている。精巣特異型アイソフォームは、精巣の成熟とともに増加することがわかっており、このため、精子形成、減数分裂などに働いているのではないかといわれている(7)。精巣特異型CaNBが脳型と比較して特に異なっている点はC末端の付加配列である。精巣特異型ではラットで6残基、マウスで9残基の付加配列があり、この領域は比較的酸性の残基に富んでいる(8, 9)。この酸性残基領域の役割はわかっていない。ホタテガイ精巣のCaNBではラットで見られたような酸性の付加残基はみられず、C末端は脳型と8残基にわたって同じ配列だった。また、CaNB全体のアミノ酸配列を比較すると、ホタテガイ精巣CaNBはラット脳型CaNBに対して89.4%、精巣特異型に対して76.2%のアミノ酸残基が一致した。以上から、ホタテガイ精巣に発現しているCaNBは、ラットで脳型と呼ばれるタイプに近いことがわかった。

ホタテガイ精巣は、秋までは水分が多く半透明で、小さいが、冬から春にかけて精巣の重量が増すと同時に厚みが増し、密につまって不透明になる。成熟したホタテガイは春に海水温が上昇すると、産卵・放精する。この間、精巣内ではダイナミックな変化がおこっていると考えられる。ノーザンブロッティングの結果から、ホタテガイ精巣に発現しているCaNB mRNAは8 kbの分子種のみであることがわかった(図1-11 A)。また、発現量は精巣の成熟に伴って増加する傾向が見られた。このため、精巣特異型に対する配列の相同性は低くても、ホタテガイ精巣CaNBも精巣の成熟に伴った機能に関与しているのではないかと考えられる。

ホタテガイ精巣の発達とカルシニューリンの発現量の相関を、瓜生によるCaNAの結果もあわせて示した(図1-11 C)。精巣の発達の程度を示す生殖巣指数は、冬の終わりから春先にかけて上昇し、4月にピークを迎えることがわかる。この後、海水温の上昇に伴う放精のため、5月には生殖巣指数は急激に減

少している。一方、カルシニューリンのmRNA発現量は夏から秋にかけては発現量が少ないが、精巣の成熟に伴ってCaNA、CaNBともに発現量は急激に増加し、精巣の最も発達する4月にはCaNA、CaNBの発現量は減少に転じている。この結果は、カルシニューリンは精巣の成熟に伴った機能に関与するが、その時期は精子形成の完成する前であることを示していると考えられる。これは、カルシニューリンの発現量が減数分裂直後に急激に増加するという報告(44)、また、ラット精巣を用いて行った免疫組織染色において丸い精細胞および、伸びた精細胞の核に局在するという報告(24)とよく一致する。

1.5 まとめ

ホタテガイ精巣CaNBについて以下の結果を得た。

1. ホタテガイ精巣に発現しているCaNBのアミノ酸配列、および塩基配列を決定した。ホタテガイ精巣CaNBは、ほ乳類で脳型とよばれるタイプに近いことがわかった。
2. ホタテガイ精巣CaNBのmRNA発現量の季節変化を調べた。ホタテガイ精巣CaNBのmRNA発現量は、精巣の成熟過程と良い相関を示した。
3. ホタテガイ精巣CaNも、ほ乳類のCaNと同様に、精巣の機能に関与していると考えられる。

第2章：新規カルシニューリン結合蛋白質CaNBP75の発見

2.1 目的

ホタテガイ精巣カルシニューリンの生理的機能を解明する糸口として、ホタテガイ精巣カルシニューリン結合蛋白質を探索する。

2.2 実験方法

2.2.1 ホタテガイ精巣抽出液の調製

ホタテガイ精巣(−20℃保存)を室温で半解凍後、スライスし、5倍容のバッファーC (20 mM imidazole-HCl、1 mM EGTA、5 mM MgCl₂、50 mM NaCl、14 mM 2-ME、1 mM BA、1mM PMSF、pH 7.0)を加えてテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。S100-AT4 (日立CS 100GX)で48,000 rpm、60分間遠心分離し、得られた上清を低塩濃度抽出液とした。この残渣に上清と等量のバッファーC₁ (バッファーC、ただし500 mM NaCl)を加えて抽出し、48,000 rpmで60分間遠心分離して得られた上清を高塩濃度抽出液とした。さらにこの残渣にバッファーC₂ (バッファーC₁+1% SDS)を加えて抽出し、98,000 rpmで15分間25℃で遠心分離して得られた上清をSDS抽出液とした。これらの抽出液をSDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜に転写した後ファウエスタンプロット法を用いてカルシニューリン結合蛋白質を検出した。

2.2.2 ホタテガイ精巣抽出液の硫安分画

10倍容のバッファーCで抽出したホタテガイ精巣抽出液3 mlに、0.168 gの硫酸アンモニウムを加えて溶かし、10 SASにした。30分静置した後、S100-AT4で48,000 rpm、15分間遠心分離し、沈澱は100 μ lのサンプルバッファーを加えてSDS-PAGEサンプルとし、10 μ lをSDS-PAGEで展開した。10 SASの上清は1 mlあたり0.057 gの硫酸アンモニウムを加え溶かして20 SASとし、同様の操作をおこなった。30 SAS (+0.059 g 硫酸アンモニウム/ml)、40 SAS (0.062 g/ml)、50 SAS (0.063 g/ml)、60 SAS (0.066 g/ml)についても同

様の操作をおこなった。

2.2.3 ホタテガイ精巢抽出液の等電点分別沈澱

10倍容のバッファ－Cで抽出したホタテガイ精巢抽出液を20から40 SASの間で硫酸分画し、沈澱を抽出に使用した量の1/10容のバッファ－Cで懸濁した（サンプル: pH 7.0）。この懸濁液を2.5 mlあたり100 mlの5 mM MgCl_2 、1 mM EGTA、14 mM 2-MEを含む各種pHのバッファ－に対して透析した。各種pHのバッファ－には、10 mM Na-Pi (pH 6.5)、20 mM MES-NaOH (pH 6.1およびpH 5.7)、20 mM 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 5.3およびpH 5.0) を用いた。透析後のサンプルはS100-AT4で68,000 rpm、20分間遠心分離し、上清は各1/10容の20% SDS、2-ME、BPB-glycerolを加えてSDS-PAGEサンプルに、沈澱は上清と等量のSDS-PAGE泳動バッファ－に懸濁してから各1/10容の20% SDS、2-ME、BPB-glycerolを加え、SDS-PAGEサンプルにした。各10 μl のサンプルをSDS-PAGEで展開し、蛋白質はニトロセルロース膜に転写した後、アミドブラック染色あるいはファウエスタン法で検出した。

2.2.4 CaNBP75の部分精製

ホタテガイ精巢(−20℃保存)を室温で半解凍後、スライスし、10倍容のバッファ－Cを加えてホモジナイズした後、RPR-20-2（日立SCR 20BB）にて12,000 rpmで20分間遠心分離した。上清に容量の0.144倍量の硫酸アンモニウムを加えて20 SAS溶液にし、30分間静置したのち、RPR-20-2にて18,000 rpmで20分間遠心分離した。上清に0.123倍量の硫酸アンモニウムを加えて40 SAS溶液にし、30分間静置したのち、RPR-20-2にて12,000 rpmで20分間遠心分離した。沈澱を抽出に用いた量の1/10容のバッファ－Cを加えてガラス棒でホモジナイズし、バッファ－D (15 mM ピペラジン-HCl、1 mM EGTA、5 mM MgCl_2 、14 mM 2-ME、pH5.7)、あるいはバッファ－E (20 mM NaPi、1 mM EGTA、5 mM MgCl_2 、14 mM 2-ME、pH 5.7) に対して一晩透析した。透析物はS100-AT4（日立CS 100GX）で68,000 rpm、20分間遠心分離し、上清をあ

らかじめバッファーD₁ (バッファーD + 10 mM NaCl)、あるいはバッファーE₁ (バッファーE + 10 mM NaCl) で平衡化しておいたDEAE-セルロファインにアプライした。カラムを同液で洗浄した後、蛋白質を10から310 mMの直線NaCl濃度勾配で溶出した。ファーウエスタン法を用いてCaNBP75を含むフラクションを検出し、集めた後、蛋白質をAmicon 100 (Millipore) を用いておよそ1/10容に濃縮した。

2.2.5 SDS-PAGE

SDS存在下でのPAGEは10%総アクリルアミド、0.1%ビスアクリルアミド (10% T、1% C) ゲルを用いてPorzioとPearsonの方法 (45) か、8% T、2.6% Cゲルを用いてLaemmliの方法 (46) でおこなった。

ゲル上の蛋白質はCBB G-250染色もしくは銀染色 (47) で検出した。

2.2.6 二次元電気泳動

二次元電気泳動はMozdzanowskiらの方法 (48) でおこなった。

一次元目の等電点PAGEは8 M尿素存在下、2% Triton X-100、2% Ampholine Preblended pH 4.0 - 6.5 for IEF (Amersham Biosciences)、4% T、2.6% Cゲル (2.5 mm × 11.0 cm) を用いた。サンプルは、蛋白質溶液1に対し、IEF solubilization buffer (8 M尿素、2% Triton X-100、2% Ampholine Preblended pH 4.0 - 6.5 for IEF、0.7 M 2-ME) を4加えて調製した。なお、サンプルは使用時まで-80℃で保存した。ゲル上層に50 μlのSOS溶液 (8 M尿素、2% Triton X-100、2% Ampholine) を重層し、上層バッファーに20 mM NaOH、下層バッファーに10 mM リン酸を用いてプレ電気泳動を200 Vで15分、300 Vで15分、400 Vで30分おこなった。上層バッファーを除き、サンプル30 μl、SOS溶液20 μlを重層して400 Vで終夜、本泳動をおこなった。pH測定用のゲルも同様の泳動をおこなった。ゲルのpHは、泳動後、ゲルを0.5 cmごとに切断し、1 mlの水を加えて1時間振盪したもののpHを測定して求めた。

二次元目のSDS存在下でのPAGEは8% T、2.6% Cゲルを用いてLaemmliの

方法でおこなった。ただし、一次元目のゲルをSDSを含むバッファーで平衡化しないで二次元目の泳動をおこなうために、4 cmの濃縮ゲルを用い、2%のSDSを含む泳動バッファーで20分間泳動して平衡化し、その後0.1%のSDSを含む泳動バッファーに交換して泳動をおこなった。

泳動後のゲルはCBB G-250で染色するか、あるいは、ウエスタンブロッティング、ファウエスタンブロッティングを用いて蛋白質を検出した。

2.2.7 ウエスタンブロッティング

SDS-PAGEで展開したゲル中の蛋白質を、セミドライブロッティング装置（バイオクラフト）を用いてニトロセルロース膜（PROTRAN BA79、Schleicher & Schuell）に転写した。転写バッファーは、蛋白質を展開する時に用いたSDS-PAGEの泳動バッファーの組成よりSDSを除き、20%メタノールを加えたものを使用した。転写はゲル面積1 cm²あたり1 mAの定電流で60分間おこなった。転写後、膜はTBS（0.2 M NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.5）で軽く洗い、膜上の蛋白質をアミドブラック染色、あるいはPonceau S染色して検出した。Ponceau Sで染色した膜は、水で脱染色した後、ブロッキングバッファー（TBS、5%スキムミルク、1 mM CaCl₂）で10分間、4回振盪し、ブロッキングをおこない、ブロッキングバッファーで1,000倍に希釈したウサギ抗カルシニューリン抗血清 (24) 中で3時間以上25℃で振盪した。ブロッキングバッファーで10分間、4回の洗浄をおこなった後、膜をブロッキングバッファーで3,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ（AP）標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（BioRad）中で1時間、25℃で振盪した。ブロッキングバッファーで10分間、4回の洗浄をおこなった後、膜をTBSで軽くゆすいだ。膜上の蛋白質に結合した抗体はAP発色キット（BioRad）を用いて検出した。

2.2.8 ファウエスタンブロッティング

ブロッキングをおこなう操作まではウエスタンブロッティングで示した方法と同様におこなった。ブロッキング後、膜を0.04 mg/ml (0.5 μM) のカル

シニユーリンのみ (CaN存在下)、カルシニユーリンおよび0.03 mg/ml ($2 \mu\text{M}$) のカルモジュリン (CaN / CaM存在下)、あるいは0.04 mg/ml ($0.9 \mu\text{M}$) カルモジュリン非依存性カルシニユーリン (dCaN存在下) を含むブロッキングバッファー中で25℃にて終夜振盪し、膜上の蛋白質にカルシニユーリンをオーバーレイした。ブロッキングバッファーで10分間、4回の洗浄をおこなった後、ウサギ抗カルシニユーリン抗血清を結合させる手順以降はウエスタンブロッティングで示した方法と同様におこない、膜上の蛋白質に結合したカルシニユーリンを検出した。

2.3 結果

2.3.1 カルシニユーリン結合蛋白質、CaNBP75の検出

ホタテガイ精巢中のカルシニユーリン結合蛋白質を探索する手始めに、ホタテガイ精巢カルシニユーリンをプローブにファウエスタン法を行った。ホタテガイ精巢からの蛋白質抽出の操作は実験方法の項に示した。ホタテガイ精巢抽出液をSDS-PAGEで展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、カルシニユーリン、およびカルモジュリンとインキュベートした後、カルシニユーリンと結合した蛋白質を抗カルシニユーリン抗血清で検出した (図2-1)。カルシニユーリンをオーバーレイしないで抗カルシニユーリン抗血清で検出した時には、抽出液中のCaNAが約55 kDaの位置に検出された (図2-1、レーン2)。カルシニユーリンとカルモジュリンをオーバーレイすると、CaNAのバンドに加えて、およそ75 kDaの位置に新たなバンドが検出された (図2-1、レーン3)。これは、膜上の蛋白質にカルシニユーリンが結合したことにより生じたと考えられ、ホタテガイ精巢中にカルシニユーリン結合蛋白質が存在することが明らかになった。この蛋白質を電気泳動上の分子量から、Calcineurin-binding protein of 75 kDa、CaNBP75と名付けた。

細胞内でのこの蛋白質の局在を見るため、ホタテガイ精巢から蛋白質をイオン強度を変えて抽出し、ファウエスタンブロッティングをおこなった (図2-2 A)。カルシニユーリンは低イオン強度バッファーで抽出した後、さらに

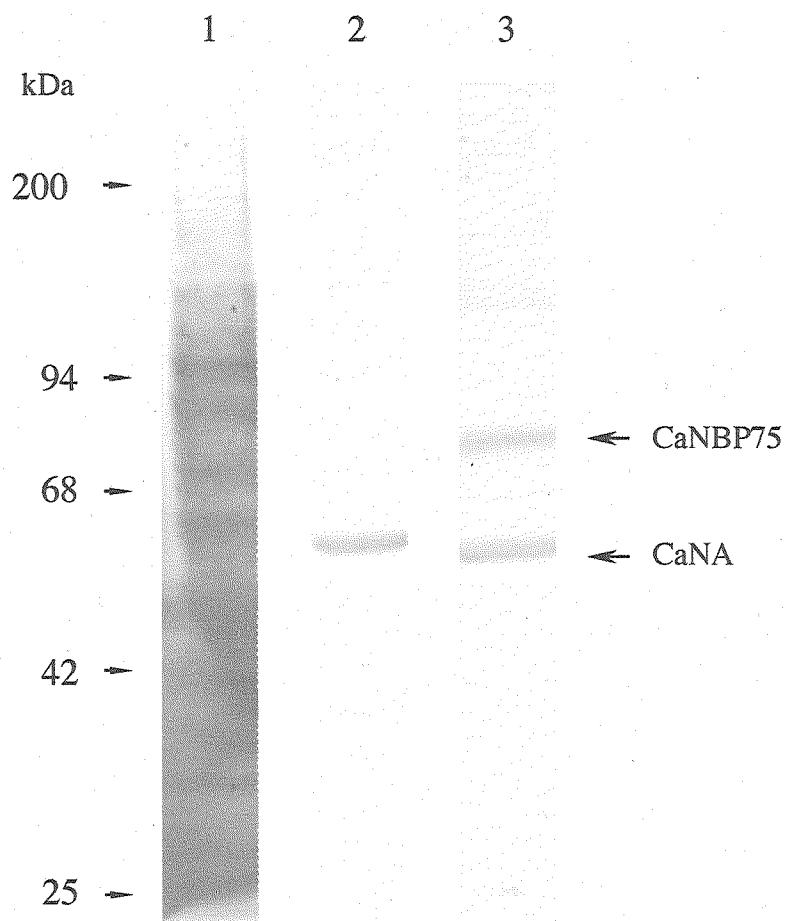


図2-1 ファーウエスタン法を用いたカルシニューリン結合蛋白質の検出

ホタテガイ精巢低イオン強度抽出液 (30 μ g蛋白質) を8% SDS-PAGEで展開した後ニトロセルロース膜に転写し、精製カルシニューリンをプローブに用いてファーウエスタンブロッティングをおこなった。レーン1はアミドブラック染色、レーン2は抗カルシニューリン抗血清を用いたウエスタンブロッティング、レーン3はCaN (0.25 μ M) /CaM (2 μ M) をオーバーレイしたファーウエスタンブロッティングである。約55 kDaのCaNAのバンドに加えて、レーン3ではおよそ75 kDaの位置にカルシニューリンを結合した蛋白質のバンド (CaNBP75) が検出された。

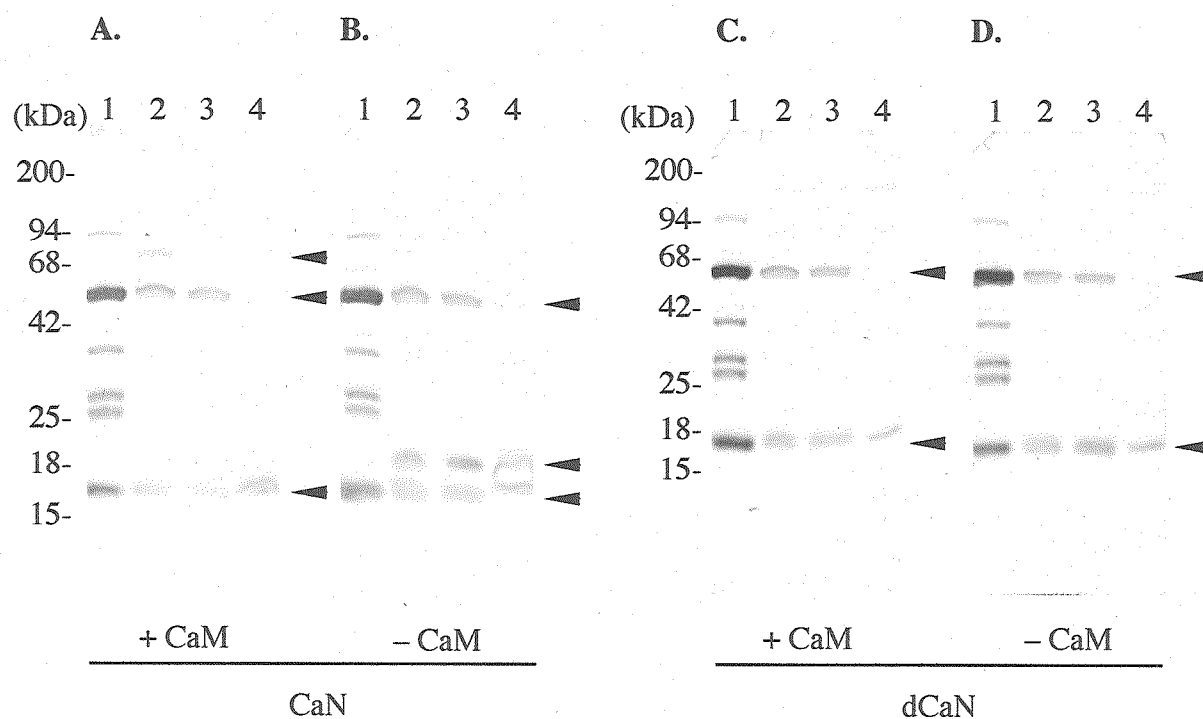


図2-2 ファーウエスタングロッキングを用いたホタテガイ精巣抽出物
カルシニューリン結合蛋白質の検出

精製カルシニューリン（レーン1）、低イオン強度抽出液（レーン2）、高イオン強度抽出液（レーン3）、SDS抽出液（レーン4）を10% SDS-PAGEで展開した後、ファーウエスタングロッキングをおこない、カルシニューリン結合蛋白質を検出した。オーバーレイは、A. $0.5 \mu\text{M}$ CaN+ $2 \mu\text{M}$ CaM、B. $0.5 \mu\text{M}$ CaN、C. $0.5 \mu\text{M}$ dCaN+ $2 \mu\text{M}$ CaM、D. $0.5 \mu\text{M}$ dCaN存在下にておこなった。なお、レーン1でCaNAとCaNBの間に検出されている数本のバンドはCaNAの分解物と考えられる。

高イオン強度バッファーで抽出された。一方、CaNBP75は低イオン強度のバッファーではほぼ全量が抽出された。これは、カルシニューリンが可溶性画分に存在するものと膜局在性の蛋白質と相互作用しているものがあるのに対し、CaNBP75が主として可溶性蛋白質として存在していることを示唆すると考えられる。

カルシニューリンはカルモジュリン依存性脱リン酸化酵素であり、カルモジュリンの結合により構造変化を起こす。カルモジュリン存在下、非存在下でカルシニューリンオーバーレイを行い、CaNBP75とカルシニューリンの結合にカルモジュリンが与える影響を見た（図2-2 A、B）。カルモジュリン非存在下カルシニューリンをオーバーレイした場合には、75 kDaのバンドはほとんど検出されず、かわって約20 kDaの位置に新たなバンドが検出された。カルモジュリン存在下ではCaNBP75にカルシニューリンが結合し、20 kDaのバンドは消失した。これより、カルモジュリン存在下でCaNBP75とカルシニューリンの結合が強まることが示唆された。20 kDaのバンドは、SDS-PAGEにおいて精製カルモジュリンと同じ移動度を示すこと、サンプル中の Ca^{2+} の有無により比移動度が変化すること、およびオーバーレイ溶液中のカルモジュリンと競合してカルシニューリンと結合することから、精巢抽出物中のカルモジュリンであると考えられる。

CaNBP75とカルシニューリンのカルモジュリン依存性の相互作用は、カルモジュリンによるカルシニューリンの活性化により引き起こされるのではないかと考えられた。このため次に、カルモジュリン非存在下でも活性型である、カルモジュリン結合ドメインを欠いたカルシニューリン変異体、dCaNを用いてファウエスタンプロットティングを行った（図2-2 C、D）。当研究室の岩瀬の作成したカルモジュリン非依存性カルシニューリン変異体、dCaNは、CaNAのカルモジュリン結合ドメインよりC末端側を欠損させたHis-タグ融合タンパク質で、カルモジュリン結合部位を持たない。このdCaNのみをオーバーレイした場合には、予想に反してCaNBP75のバンドは検出されなかった。20 kDaのバンドも検出されなかったが、20 kDa蛋白質がカルモジュリンであると考えると矛盾

がないと思われた。カルモジュリン存在下でのdCaNオーバーレイでは、精製カルシニューリン程ではないものの、若干量の75 kDaのバンドが検出された。

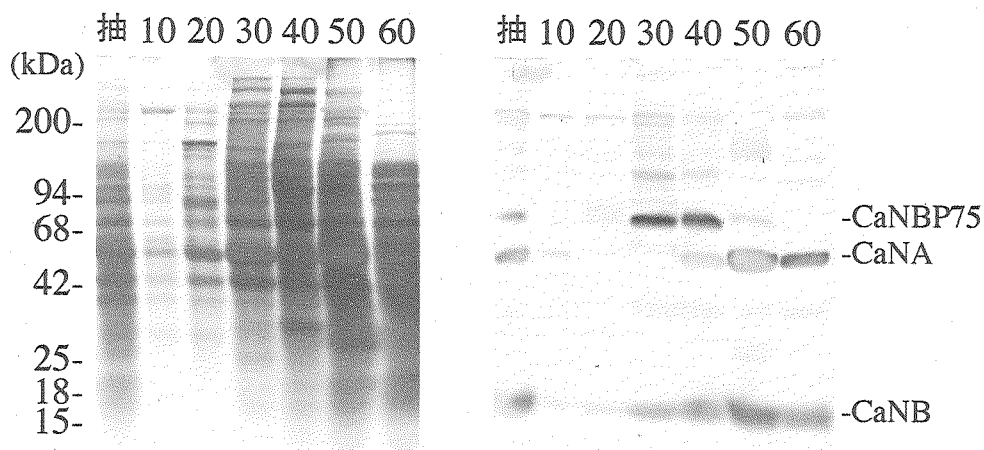
以上の結果、ホタテガイ精巢抽出物中にカルシニューリン/カルモジュリンと共にインキュベートした時に強く検出される分子量およそ75 kDaのカルシニューリン結合蛋白質が存在することがわかった。また、カルシニューリンのみとインキュベートした時には結合が弱いことから、この蛋白質とカルシニューリンの結合にはカルモジュリンが必要であることが示された。

2.3.2 CaNBP75の部分精製

次にこの蛋白質の精製を試みた。ホタテガイ精巢抽出液を10 SAS刻みで硫安分画を行ったところ、カルシニューリンは40 SASから60 SASで沈澱するのに対して、CaNBP75は20 SASから40 SASの間で沈澱した（図2-3 A）。また、ホタテガイ精巢抽出液をpH変化を用いた等電点分別沈澱をおこなったところ、他の多くの夾雑蛋白質が沈澱するpH 5.7においてもCaNBP75は可溶性画分に存在し、pH 5.3から5.0にかけて沈澱することがわかった（図2-4 B）。

これらの情報をもとに、20 SASから40 SASの間で硫安分画、pH 5.7で等電点沈澱を行った後、pH 5.7にてDEAE-セルロファイン陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いてホタテガイ精巢抽出物を展開し、CaNBP75を精製することを計画した。図2-4にDEAE-セルロファイン陰イオン交換カラムクロマトグラフィーの結果を示した。カルシニューリンが170 mMから230 mMのNaCl濃度で溶出するのに対し、CaNBP75は130 mMから230 mMにかけての、幅広いNaCl濃度にわたって溶出した。また、この時のCaNBP75の溶出パターンはカルシニューリンの溶出ピーク近辺に溶出するピーク（分画番号54付近）とそれよりも低いNaCl濃度で溶出するピーク（分画番号48付近）の、二つのピークを持つように見受けられた。なお、それより低いNaCl濃度で溶出している分子量が小さいカルシニューリン結合蛋白質（分画番号42から47）は、精製の初期段階では見られないことから、CaNBP75の分解物と考えられる。

A.



B.

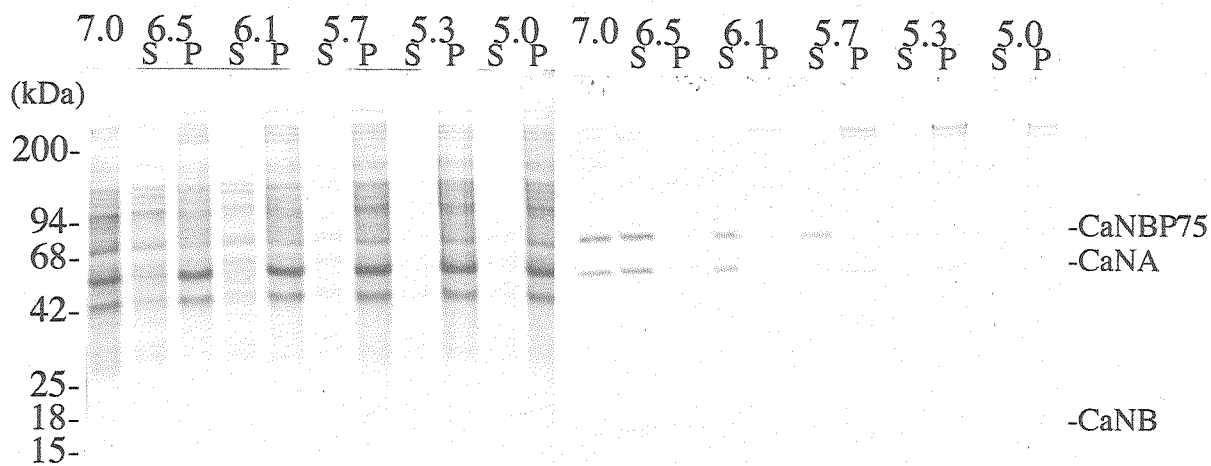


図2-3 ホタテガイ精巣抽出物の硫安分画と等電点分別沈澱

A. ホタテガイ精巣抽出物を10 SAS刻みで硫安分画し、10% SDS-PAGEで分画した後、ファウエスタブロットティングでCaBP75を検出した。 B. ホタテガイ精巣抽出物を20 SASと40 SASの間で硫安分画した後、図に示したpHのバッファーに対して透析し、等電点分別沈澱した。透析物を遠心分離後、上清 (S) と沈澱 (P) をSDS-PAGEで展開し、ファウエスタブロットティングでCaBP75を検出した。 各パネルの左はアミドブラック染色、右はCaN/CaMオーバーレイ。

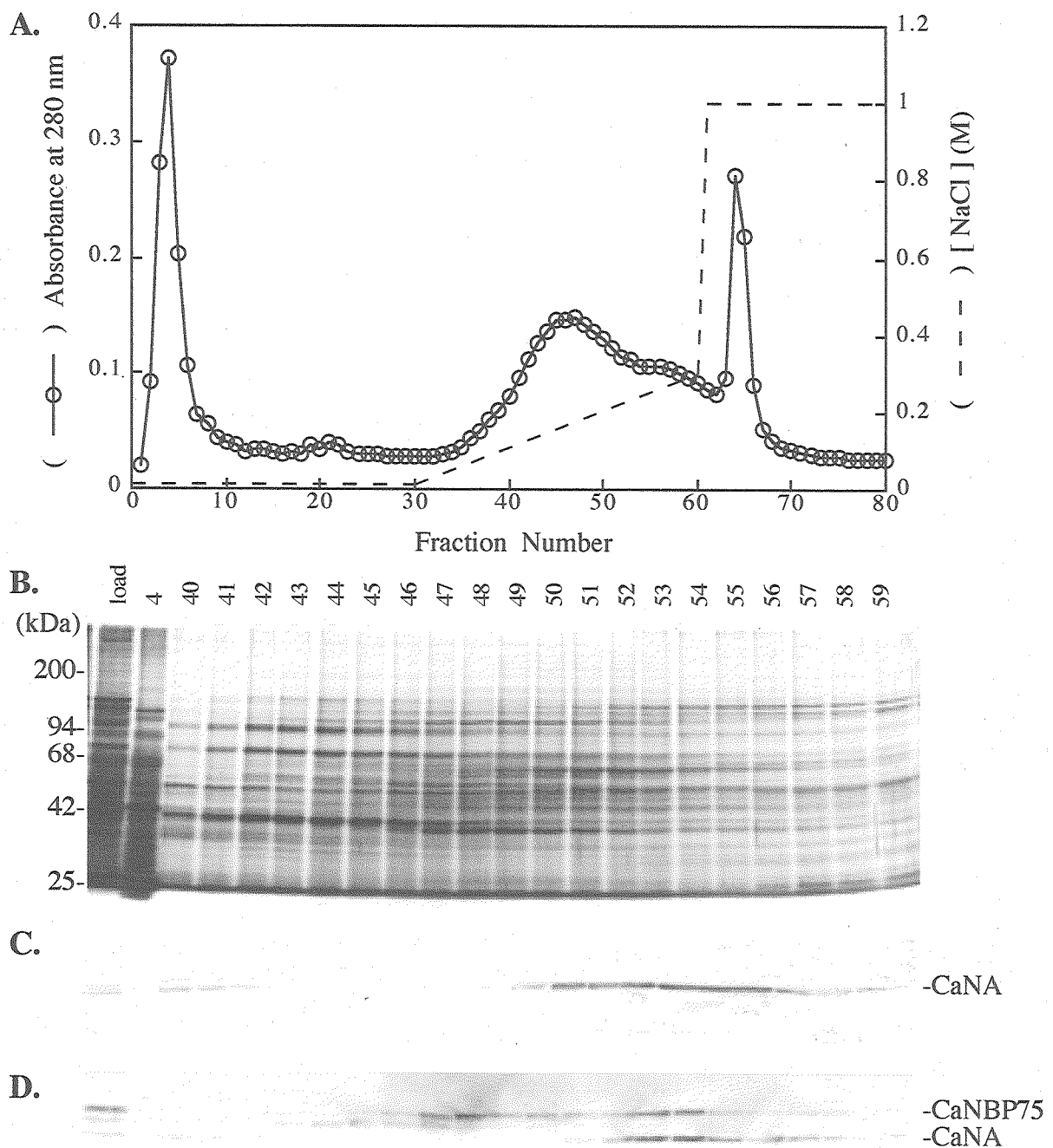


図2-4 ホタテガイ精巢抽出物のDEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィー

ホタテガイ精巢抽出物を硫酸分画、等電点分別沈澱した後、バッファーD (15 mM ピペラジン-HCl、1 mM EGTA、5 mM MgCl₂、10 mM NaCl、14 mM 2-ME、pH 5.7) に対して透析し、同液で平衡化したDEAE-セルロファインカラムに添加した。同液で洗浄後、0.3 M NaClまでの直線塩濃度勾配で溶出した。A. 溶出曲線 B. 各フラクションのSDS-PAGE。レーン上に表示した分画番号のフラクションをLaemmliの方法でSDS-PAGEをおこない、銀染色法で検出した。C. 抗カルシニューリン抗血清を用いたウエスタンブロッティング D. CaN (0.5 μ M) /CaM (2 μ M) をオーバーレイしたファウエスタンブロッティング。

2.3.3 CaNBP75の同一性

DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーによる展開前、後のサンプルについて二次元電気泳動を行った。

クロマトグラフィー前のサンプルを用いた二次元電気泳動の結果を図2-5に示した。ホタテガイ精巢抽出液を硫酸分画、等電点沈澱した後、透析で塩を除き、二次元電気泳動で展開した。夾雑蛋白質が、収束した点状のスポットを形成するのとは異なり、CaNBP75はpI 5.1近辺 (5.0~5.3) の広い領域に拡散して、刷毛跡様のスポットを形成した (図2-5 A、C)。

次に、DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーで溶出した、低イオン強度側 (52 + 53) と高イオン強度側 (57 + 58) のフラクションに含まれる蛋白質を濃縮し、それぞれ二次元電気泳動で展開した (図2-6)。ファーストエスタン法でCaNBP75を検出すると、高イオン強度側のフラクションに含まれるCaNBP75は、低イオン強度側と比較してより等電点が低く、分子量が大きい位置に泳動されているのがわかった。

2.4 考察

ホタテガイ精巢抽出物中に、カルモジュリン存在下でカルシニューリンと結合する分子量およそ7万5千の蛋白質を検出し、CaNBP75と名付けた (図2-1)。

細胞内での局在を見るため、ホタテガイ精巢からイオン強度を変えて蛋白質を抽出した結果、カルシニューリンは低イオン強度画分だけではなく高イオン強度画分からも抽出された。これは、カルシニューリンが主として細胞質だけでなく、膜局在性の蛋白質と相互作用しているものがあることを示唆するが、カルシニューリンが、FKBP12やAKAP79などの結合蛋白質によって膜に局在化されているという報告 (27, 49) と一致すると考えられる。一方、CaNBP75は低イオン強度で抽出され、高イオン強度画分にはほとんど存在しなかった。これより、CaNBP75は可溶性画分に存在するか、あるいは細胞内の膜画分に局在させる因子があったとしてもその結合は弱いものであると考えられる。

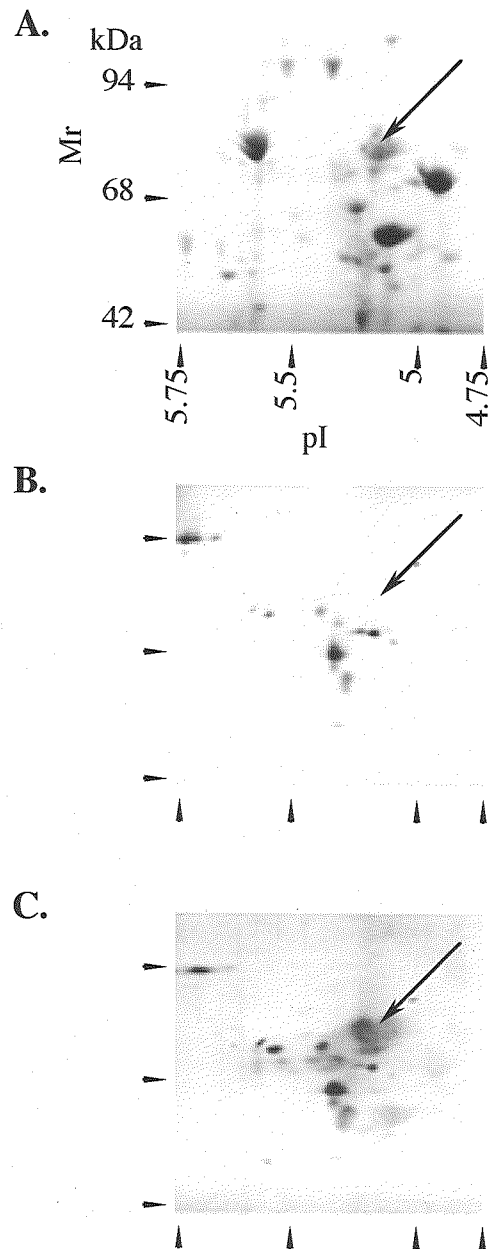


図2-5 ホタテガイ精巢抽出液等電点分別沈澱後サンプルの二次元電気泳動

ホタテガイ精巢抽出物を硫酸分画、等電点分別沈澱し、バッファー (20 mM MES-HCl、1 mM EGTA、5 mM MgCl₂、14 mM 2-ME、pH 5.7) に対して透析した後、Amicon 100で濃縮した。これを二次元電気泳動で展開し、ニトロセルロース膜に転写した。 A. Ponceau S染色 B. 抗カルシニューリン抗血清を用いたウエスタンブロッティング C. CaN (0.25 μ M) /CaM (2 μ M) をオーバーレイしたファーウエスタンブロッティング。各パネル左の矢尻は分子量、下の矢尻は等電点を示す。矢印は同時に展開した泳動の同じ領域 (CaNBP75) を示している。

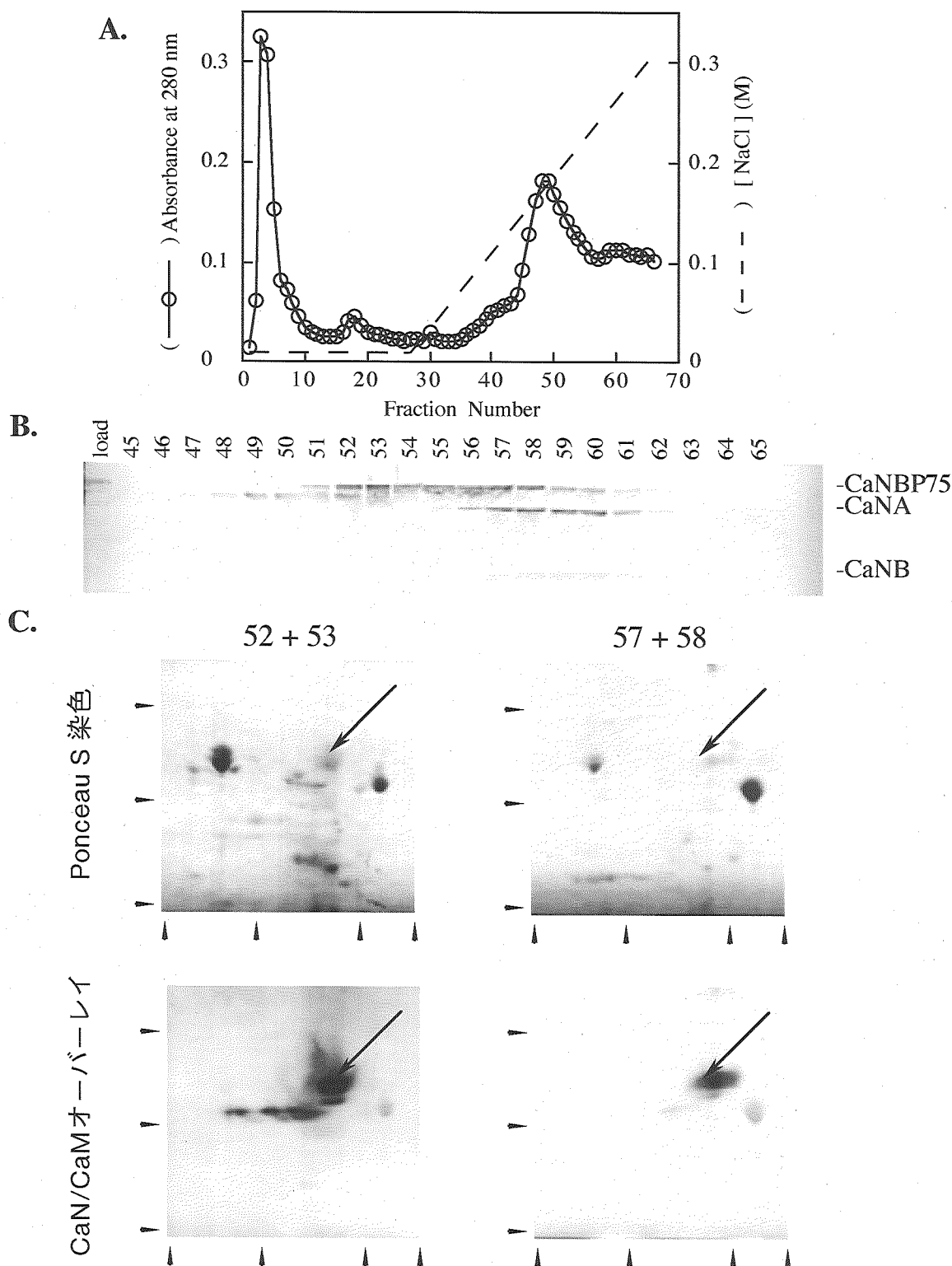


図2-6 DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィー展開後の二次元電気泳動

A. ホタテガイ精巢抽出物を硫酸分画、等電点分別沈澱し、バッファーEに対して透析し、DEAE-セルロファインカラムに添加、展開した溶出曲線 B. 各フラクションのSDS-PAGE。レーン上に表示した分画番号のフラクションをLaemmliの方法でSDS-PAGEをおこない、ファウエスタンプロッキングでCaNBP75を検出した。 C. 分画番号52と53（左）、57と58（右）を濃縮し、二次元電気泳動で展開した後、ニトロセルロース膜に転写した。Ponceau S 染色（上）およびCaN/CaMオーバーレイしたファウエスタンプロッキング。矢尻、矢印は図2-5と同じ。

CaNBP75とカルシニューリンの相互作用にカルモジュリンの与える影響をファーウエスタンプロッティングを用いて検討した結果、CaNBP75とカルシニューリンの結合はカルモジュリン存在下で強められることがわかった（図2-2）。このため、カルシニューリンの活性化がCaNBP75との結合に必要ではないかと考え、カルモジュリン非存在下でも活性をもつdCaNを用いてファーウエスタンプロッティングをおこなったが、カルモジュリン非存在下では結合しなかった（図2-2C）。これより、CaNBP75とカルシニューリンの結合には、カルシニューリンの活性化（自己阻害領域の除去）は必要ではないことがわかった。しかし、カルモジュリンに依存しないdCaNでもカルモジュリン存在下でCaNBP75との結合が強められる理由は説明できない。CaNBP75はカルモジュリン-セファロースCL-4Bに結合しないことから、CaNBP75にはカルモジュリン結合サイトはないと思われる。1つの可能性として、dCaNには活性化に影響のない程度にカルモジュリン結合サイトが残っており、カルモジュリンが結合でき、CaN/CaM複合体がCaNBP75とより強く相互作用できることが考えられる。今後、CaNBP75とカルシニューリン、カルモジュリンの相互作用についてはさらに詳細な検討を加える必要があるだろう。

硫安分画、等電点沈澱、DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーをもちいてCaNBP75の精製を試みた（図2-3、2-4）。DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーでは広い塩濃度にわたってCaNBP75が溶出し、効率良い精製はできなかった。二次元電気泳動では、CaNBP75が一点に収束せず、二次元泳動上の広い領域に泳動されるのが観察された（図2-5）。また、DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーの異なる塩濃度で溶出されたCaNBP75は二次元電気泳動上で異なる移動度を示し、分子量や電氣的性質に差があることが示された（図2-6）。これらの結果は、カルシニューリン結合蛋白質が均質の物ではなく、なんらかの修飾の違いや、アイソフォームなどがあるために不均一な蛋白質となっていることを示唆していると考えられた。

二次元電気泳動の結果、ホタテガイ抽出物中の多くの夾雑蛋白質が、70 kDa近辺の分子量をもち、CaNBP75の等電点であるpI 5.1近辺に等電点を持つ

ことがわかった。これらの結果から、イオン交換カラムクロマトグラフィー、およびゲル濾過カラムクロマトグラフィーでは効率良い精製は難しいと思われた。また、CaNBP75自身も均質な蛋白質ではないと考えられ、これ以上の精製は困難であることが予測された。

2.5 まとめ

1. ホタテガイ精巢にカルシニューリン結合蛋白質、CaNBP75を検出した。CaNBP75の分子量はSDS-PAGEからおよそ7万5千、等電点は5.00～5.25と見積もられた。

2. 硫安分画、等電点分別沈澱、DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーを用いてCaNBP75の部分精製ができることがわかった。

第3章：CaNBP75のアミノ酸および塩基配列の決定

3.1 目的

ホタテガイ精巢で検出された蛋白質CaNBP75の全長のアミノ酸配列を明らかにする目的で、CaNBP75のアミノ酸配列分析をおこなう。得られたアミノ酸配列情報をもとにcDNAをクローニングし、全長の配列を入手する。

3.2 実験方法

3.2.1 CaNBP75のアミノ酸配列分析

CaNBP75の部分精製の項で示したDEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィーの濃縮液を二次元電気泳動で展開し、CaNBP75のスポットを切り出した。なお、CaNBP75のスポットはファウエスタンプロットティングで特定し、CaNBP75に対応するスポットをCBB染色したゲルより切り出した。CaNBP75を含むゲル片は200 μ lの25% 2-プロパノールで10分間振盪して2度洗浄し、ついで200 μ lの45% エタノールで10分間振盪して2度洗浄した後、凍結乾燥した(50)。乾燥したゲル片に5 μ lの0.1 mg/mlのリシルエンドペプチダーゼと195 μ lのバッファーI (50 mM Tris-HCl, pH 9.0、8 M 尿素) をしみ込ませ、37 $^{\circ}$ Cでゲル内のCaNBP75を消化した。6時間後に5 μ lの0.1 mg/mlのリシルエンドペプチダーゼを追加し、さらに消化した。12時間後に遠心分離して上清をマイクロチューブに移した。沈澱のゲル片には200 μ lの0.1% TFAを加え、1時間振盪した後に遠心分離し、上清を先の上清に加えた。リシルエンドペプチダーゼ消化したCaNBP75は、終濃度0.1% になるようにTFAを加え、サンプルアップLCR4-LH (Millipore) で濾過した後、濾液を逆相HPLCで分離した。

逆相HPLCは日立製のHPLC装置 (L-6200) にカラム (COSMOSIL 5C18-AR 4.6 mm $\times$ 150 mm) を接続し、0.1% TFA存在下、流速0.5 ml/minで行った。消化液を0.1% TFA、5%アセトニトリルで平衡化したカラムに吸着させ、同液で洗浄後、60%アセトニトリルまでの濃度勾配 (90分間) で溶出した。ペプチドはペプチド結合由来の220 nmの吸光度をUV検出器でモニターし、フローセ

ルの出口から直接マイクロチューブにペプチドを含む溶出液を受けた。溶出液は遠心乾固し、アミノ酸配列分析まで -20°C で保存した。

遠心乾固したペプチドは0.1% TFA-50%アセトニトリルに再溶解し、アミノ酸配列分析を行った。分析は北海道大学機器分析センターに依頼し、492 Potein Sequencer (Applied Biosystems) で行った。

3.2.2 PCRによるCaNBP75cDNA断片frg68-69の増幅

アミノ酸配列分析で得られた配列に基づき、縮重プライマー、68-F (5'ACNCCNCARAAYCCNTTYGC3')、69-R (5'GTCATNGCNGGCCADATYTT3') を合成した ((株) システムサイエンス)。トータルRNAは第1章に記載したのと同様の方法で調製した。ホタテガイ精巢ss cDNAは、oligo (dT) をプライマーに用いてホタテガイ精巢トータルRNAをFirst-strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciendes) で逆転写して調製した。PCR法は、25 μl の反応混液 (1 $\times$ *Ex Taq* buffer、1 U *Ex Taq*、0.8 mM dNTP、各2 mM 縮重プライマー、1 μl ss cDNA) を用いて、 96°C 1分、(96°C 30秒、 50°C 30秒、 70°C 3分) $\times$ 30回、 70°C 10分の温度サイクルで行った。

PCR産物は1% アガロースゲル電気泳動で展開後、目的DNA断片frg68-69をゲルから切りだし、ガラス法を用いて精製した。回収したDNA断片はpGEM-T Easy Vector (Promega) にライゲーションし、コンピテントセル、INV α F' (Invitrogen) をトランスフォームした。プラスミドは第1章に記載したのと同様の方法で精製した。

3.2.3 DNA塩基配列分析

精製したプラスミドを鋳型に、テキサスレッドで標識されたT7プライマー、M13プライマー、またはM13 reverseプライマーを用いてThermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit (Amersham Biosciences) によりジデオキシチェーンターミネーション反応をおこなった。

これを、DNAシーケンサーLIC-4000 (LI-COR) で分析し、塩基配列を決定した。

3.2.4 ホタテガイ精巢cDNAライブラリー

ホタテガイ精巢CaNBP75のcDNAスクリーニングには、ランダムプライマーを用いた逆転写反応により構築した、第1章で記載したのと同じホタテガイ精巢cDNAライブラリーを用いた。

3.2.5 DIG標識されたDNAプローブの調製

DNAプローブはDIG-DNA Labeling Mixture (Roche Diagnostics) と Gene Taq (ニッポンジーン) を使用してジゴキシゲニン (DIG) 標識した。標識にはまず、プローブに用いるcDNAを、その両端の配列をプライマーに用いてPCR法で増幅/linearizationし、次にこのPCR産物を鋳型に同じプライマーセットでDIG標識をおこなった。反応は25 μ lの反応液 (1 $\times$ Gene Taq buffer、1 U Gene Taq、1.5 μ l DIG-DNA Labeling Mixture、0.2 μ l 鋳型PCR産物、各1.6 mM プライマー) を用いて96 $^{\circ}$ C 1分、(96 $^{\circ}$ C 30秒、45 $^{\circ}$ C 30秒、70 $^{\circ}$ C 3分) $\times$ 30回、70 $^{\circ}$ C 10分の温度サイクルで行った。標識したプローブは使用前に沸騰水中で5分間加熱し、氷上で5分間急冷してから使用した。

CaNBP75の1回目のスクリーニングにはT7プロモーター、およびSP6プロモーターの配列をプライマーに用いて標識したCaNBP75のcDNA断片frg68-69をプローブに用いた。2回目のスクリーニングにはCaNBP75のN末端側断片 (塩基番号36-280; tomC1-18FとtomC245-228Rのプライマーセット) とC末端側断片 (塩基番号1156-1550; 69FとtomD709-602Rのプライマーセット) をそれぞれDIG標識してプローブに用いた。なお、使用したプライマーは以下の配列である。tomC1-18F; 5'CACAGAGTCTTCAGGAGA3'、tomC245-228R; 5'AAGCTGCACCTGGTTGAC3'、69F; AARATHHTGGCCNGCNATGAC、tomD709-602R; 5'AGTCTGACTCGGACCTGA3'。

3.2.6 プラークハイブリダイゼーション

大腸菌C600hflを λ gt10に感染させ、テトラサイクリン100 μ l/mlを加えたLB培地で培養した。プラークはナイロン膜（バイオダインB、Gelman Laboratory）に転写し、第1章に示した方法でDNAを膜に固定した。80℃で乾燥した膜は、次に50 mM NaOH、0.1% SDS溶液に浸して15分間振盪した後、2 $\times$ SSCで中和し、ハイブリダイゼーションバッファー（0.5 M Na-Pi（pH 7.2）、7% SDS、1 mM EDTA）中で65℃にて10分間以上プレハイブリダイゼーションをおこなった。バッファーを捨て、新たなハイブリダイゼーションバッファー（50 ml/膜10枚）にプローブ（7 μ l/50 ml）を加えて65℃で終夜ハイブリダイゼーションをおこない、あらかじめ加温しておいた40 mM Na-Pi（pH 7.2）、1% SDSにて65℃で20分間、3回洗浄した。

陽性プラークの検出にはDIG Luiminescent Detection Kit（Roche Diagnostics）を用いた。ハイブリダイゼーション後、洗浄したメンブレンをDIGバッファー1（0.15 M NaCl、0.1 M マレイン酸、pH 7.5）で10分間、2回洗浄し、続いてブロッキング溶液（DIGバッファー1+ 0.5%ブロッキング試薬）に室温で1時間浸し、ブロッキングをおこなった。次にWash溶液（DIGバッファー1+ 0.2% Tween 20）で10,000倍に希釈した抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体で30分間振盪し、Wash溶液で2回洗浄した。発光は3 ml/10枚のDIGバッファー3（0.1 M Tris-HCl（pH 9.5）、0.1 mM NaCl、50 mM $MgCl_2$ ）でメンブレンをアルカリ条件にした後バッファーを捨て、8 μ lのCSPD基質溶液を含む1 mlのDIGバッファー3を加えて、ただちにX線フィルムRX-U（FUJI PHOTO FILM）にて発光を検出した。

3.2.7 5'-Rapid amplification of cDNA ends（5'-RACE）法

ホタテガイ精巣トータルRNAから、リバープライマーtom1bR405-386あるいはtomC245-228Rと、First-strand cDNA Synthesis Kitを用いて調製したホタテガイ精巣 ss cDNAを、70℃で5分間インキュベーション後、氷上で急冷し、RNase Aを加えて37℃で10分インキュベーションした。フェノールクロロ

ホルム抽出を行った後、Microspin S-400 HR (Amersham Biosciences) でゲル濾過し、Terminal deoxynucleotidyl transferase (Takara) を用いてpoly-CをcDNAの3'端に付加した。これを鋳型に、リバープライマーとoligo-dGを用いてPCR法で増幅した。なお、リバープライマーは以下の配列を用いた。
tom1bR405-386; 5'CAGGTAGACCTGAGCTGTTG3'、tomC245-228R;
5'AAGCTGCACCTGGTTGAC3'。

3.2.8 DIG標識されたRNAプローブの調製

DIG標識したRNAプローブはfrg68-69をSP6 RNA polymeraseとDIG-RNA Labeling Mixture (Roche Diagnostics) で*in vitro* transcriptionして調製した。CaNBP75のcDNA断片frg68-69をpGEM T-Easy上のT7プロモーター、およびSP6プロモーター配列のプライマーを用いてPCRで増幅してlinearizationした。このPCR産物1 μ gと2 μ lの10 $\times$ DIG-RNA Labeling Mixture、2 μ lの10 $\times$ Transcription buffer、2 μ lのSP6 RNA polymerase (Roche Diagnostics) を混合し、DEPC処理水で総量20 μ lにして、37℃でインキュベートし、*in vitro* transcriptionをおこなった。2時間後、2 μ lの0.2 M EDTAを加えて反応を停止した。標識したプローブは使用前に沸騰水中で5分間加熱し、氷上で5分間急冷してから使用した。

3.2.9 ノーザンブロッティング

ホタテガイ精巣RNA 20 μ gを第1章に記載したホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動法で展開し、ナイロン膜 (Hybond-N+) に転写した。この膜をDIG標準ハイブリダイゼーションバッファー+50% ホルムアミド (5 $\times$ SSC、50% ホルムアミド、0.1% N-laurylsarcosine、0.02% SDS、2% blocking reagent) を用いてプレハイブリダイゼーションをおこない、DIG標識したRNAプローブを含むDIG標準ハイブリダイゼーションバッファー+50% ホルムアミド中で65℃にて終夜ハイブリダイゼーションをおこなった。膜は2 $\times$ 洗浄液 (2 $\times$ SSC、0.1% SDS) を用いて室温で5分間、2回洗浄した後、0.1 $\times$ 洗浄液

(0.1×SSC、0.1% SDS) で68℃にて15分間、2回洗浄した。

検出にはDIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics) を用い、DIG 標識DNAの検出と同様の方法で検出した。

3.3 結果

3.3.1 CaNBP75のアミノ酸配列分析

第2章で示した様に、ホタテガイ精巢CaNBP75の精製はかなり困難を伴うことが予想された。このため、CaNBP75の性質を明らかにするには、部分精製標品を用いて部分アミノ酸配列を決定し、その情報をもとにcDNAクローニングをおこなう方法が得策であると思われる。

はじめに、DEAE-セルロファインカラムクロマトグラフィー後のサンプル (図2-6の分画番号57 + 58) を二次元電気泳動で展開した後、PVDF膜に転写し、カルシニューリン結合蛋白質のスポットを切り出して直接アミノ酸シーケンサーでアミノ末端配列分析を試みた。しかし、PTHアミノ酸は検出されなかったことから、CaNBP75のN端のアミノ基はなんらかの化学修飾を受けていると考えられた。このため、二次元電気泳動で展開したゲルよりカルシニューリン結合蛋白質のスポットを切り出し、ゲル中でリシルエンドペプチダーゼ消化をおこない、単離したペプチドのアミノ酸配列分析をおこなった。図3-1にリシルエンドペプチダーゼ消化ペプチドを逆相HPLCで展開した溶出曲線を示した。得られたペプチド断片はアミノ酸配列分析を行った。決定できた6つの断片のアミノ酸配列、104残基を図3-2に示した。このうち、KEP 62とKEP 65は1残基目から16残基目までの配列は完全に一致したが、17残基目以降は異なるアミノ酸配列を示した。これら6つのペプチド断片の配列をデータベースで比較したところ、KEP 69のアミノ酸配列はショウジョウバエのAE003744_31 CG10225 gene productと高い相同性を示したが、その他のペプチドについては有意な相同性を示す配列はみつからなかった。

3.3.2 CaNBP75の塩基配列決定

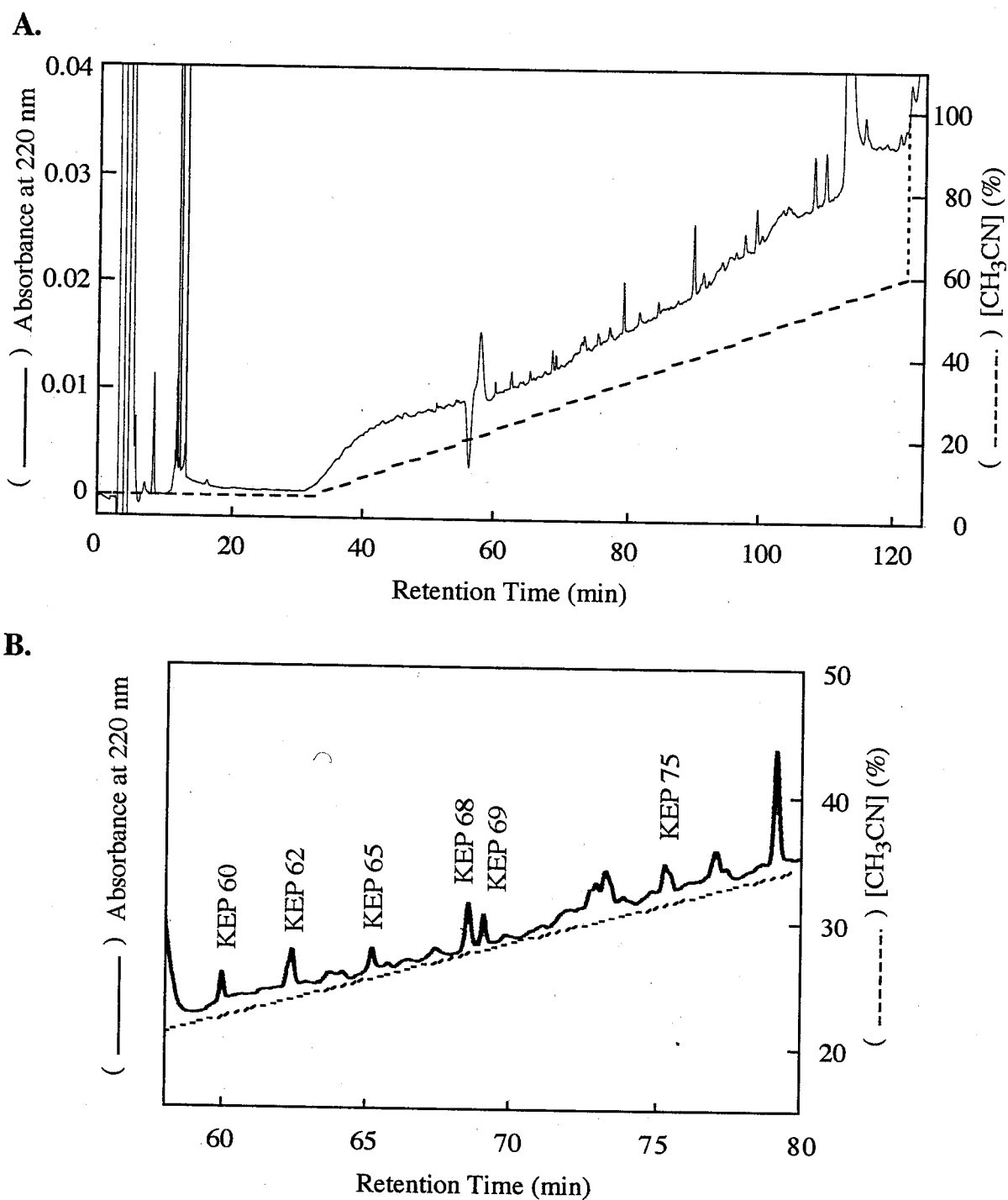


図3-1 CaNBP75の逆相HPLCによる分離

A. CaNBP75のリシルエンドペプチダーゼ消化物の逆相HPLCの溶出曲線。 B. Aの拡大図。消化、分離方法は「実験方法・CaNBP75のアミノ酸配列分析」に示した。Bに示した6つのピーク成分について、アミノ酸配列分析を行った。

KEP 60 ARTLEESAREFQAK

 KEP 62 XXIVSTASHHHHFAPSVHLAPSK

 KEP 65 XXIVSTASHHHHFAPSGTVEXPXXX

 KEP 68 XXSTTPQNPFAPRXALK

 KEP 69 IWPAMTIERASQK

 KEP 75 LXXSTTDAGGGAAAAAAPEFI

図3-2 CaNBP75消化ペプチドのアミノ酸配列

図3-1に示した6つのペプチドのアミノ酸配列分析の結果を示した。Xは同定できなかったアミノ酸を示す。KEP62とKEP65のアミノ酸配列は、下線で示した16残基目まで同一であった。

次に、得られたアミノ酸配列情報をもとにPCRを行い、CaNBP75のcDNAクローニングを試みた。KEP 62、KEP 68、KEP 69のアミノ酸配列をもとに混合プライマーを合成し、ホタテガイ精巢一本鎖cDNAを鋳型にPCRを行った。プライマーを種々に組み合わせたうち、KEP68をフォワードに、KEP69をリバースにデザインした68-F、69-Rのプライマーの組み合わせで塩基数およそ1.1 kbpのPCR産物 (frg68-69) が特異的に増幅した。このfrg68-69をTAクローニングし、塩基配列を決定した。クローニングされたDNA断片はプライマーを含めて1027 bpで、342残基のORFをコードしていた (図3-3)。この342残基の配列中には、アミノ酸配列分析で得られたKEP 68、KEP 62、KEP 75、およびKEP 60のアミノ酸配列が含まれていたことから、クローニングされたcDNAはたしかにアミノ酸配列分析をおこなった蛋白質をコードするものであると考えられた。

このfrg68-69を含む、全長のCaNBP75cDNAをクローニングするために、frg68-69をプローブに用いてホタテガイ精巢cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。ランダムプライマーで逆転写を行って構築したホタテガイ精巢cDNAライブラリーを、DIG標識したfrg68-69をプローブに用いてスクリーニングし、ORFと3'非翻訳領域を含む1.5 kbpのcDNA断片を得た。この1.5 kbpの断片の5'側、3'側の配列をプローブに用いてさらにスクリーニングを行った。総量で 3.6×10^5 個のファージをスクリーニングし、10個の陽性クローンを得た。cDNAライブラリーのスクリーニングでは得られなかった5'非翻訳領域の塩基配列は、5'-RACE法を用いてクローニングした。決定した塩基配列からオーバーラップを考慮して、1,425 bpのORFを含む、全長約1.5 kbの塩基配列が決定された (図3-4)。

ORFの塩基配列から推定された蛋白質は全長474アミノ酸残基からなり、分子量は51,850と見積もられた。ホタテガイ精巢抽出物中のCaNBP75はSDS-PAGE上で計算値よりも大きい分子量7万5千の移動度を示したが、これは電荷を持つ残基の割合が高いため (29%) ではないかと考えられた。等電点の計算値は5.25で、これは二次元電気泳動の結果と矛盾しない。アミノ酸配列分析で

10	20	30	40	50	60
TPONPFAPRPALKTDIVSTASHHHHFAPSVHLAPSKFSQPGAASGDPDSDEDRGSPGHKS					
KEP 68 /		KEP 62 /		/	
70	80	90	100	110	120
SILLPSRLGILNKADTMPSPSKCLLRPSPLAVQVQSMKQKDEKDSKEKENQDTLDREDNH					
/		/	/ / / / /		
130	140	150	160	170	180
NNGSGDPPINSSGLPGPTAENYFATALTGNEKLSDSTTDAGGGAAAAAAPEFIFGQNLIT					
				KEP 75	
190	200	210	220	230	240
DRVTVGVQTSPGNKTSPTSDGGFVFGTNLAERVVKTDGADKKNERKQLDSDDESELSKSTG					
/		/	//	/	/
250	260	270	280	290	300
LEKARTLEESAREFQAKHDDRPEYKEVEVKTGEEDESNVLQSTGKLFVFDGHNQSWIERG					
KEP 60 /		/	/	/	
310	320	330	340		
RGLLRINXQRSQVSSEFQSRLVMRTQGSRLRVILNTKIWPAMT					
				/ KEP 69	

図3-3 PCRで増幅されたfrg68-69にコードされたアミノ酸配列

CaNBP75のアミノ酸配列分析で決定されたペプチドの配列と一致した残基は四角で示した。縮重プライマーのデザインに用いたアミノ酸配列には下線を引いた。斜線はリシルエンドペプチダーゼで切断されと考えられる残基位置をあらわす。

```

-21                                     accactggacaaaatccaat -1
      atggcggatgtttacacagagtcttcaggagacccaccagaagataaacactgtagaagaagagagtgagagataaaacatacagagcag 90
1  M A D V Y T E S S G D P P E D N T V E E E S G E I K H T E Q

      tcatctgggggtggacgactctacaaaagcctggtcaacaacccctcaaaatccatttgacactcgacctgctttgaagacagacattgtt 180
31 S S G V D D S T K A W S T T P Q N P F A P R P A L K T D I V

      tctactgcctcacatcaccaccattcgcaaccatcagtcatttagccccagtaaatcttagtcaaccagggtgcagcttcaggagaccca 270
61 S T A S H H H F A P S V H L A P S K F S Q P G A A S G D P

      gattcagacgaagacagaggtagccctggtcacaagtcttcatactgttaccatccagactaggtatattaataaagctgacaccatg 360
91 D S D E D R G S P G H K S S I L L P S R L G I L N K A D T M

      cctagtccctccaagtgtctactgcggccctcacccttctgcttccaagtcagagtatgaaacagaaggacgagaagactcaaaggag 450
121 P S P S K C L L R P S P L A V Q V Q S M K Q K D E K D S K E

      aaggagaaccaggatcacgttgatagggaggataaccataacaacgggtcaggtgatccgccaatcaacagctcaggtctacctgtccc 540
151 K E N Q D T L D R E D N H N N G S G D P P I N S S G L P G P

      acagcagaaaactatcttgcgactgccctgacagggaatgaaaaattatcagattccacaacagatgctggtggtggtgctggccgccc 630
181 T A E N Y F A T A L T G N E K L S D S T T D A G G G A A A A

      gctgcgcccctgagtttatatttggcacaacacctcacggaccgtgtgacaggtgtacaacatcacctggtaacaaaacctgcgctacg 720
211 A A A P E F I F G Q N L T D R V T G V Q T S P G N K T S P T

      tctgacggtggattgttttggaaacaaatttggcagagcgtgtagtaaaaacagatggtgcagataaaaaaatgaaagaaccagtta 810
241 S D G G F V F G T N L A E R V V K T D G A D K K N E R N Q L

      gactcggatgacgaatctgaattatcaaaatctacaggttttagaaaaagctagaacattggaagagctgcgcgtgaattccaagcaag 900
271 D S D D E S E L S K S T G L E K A R T L E E S A R E F Q A K

      CATGATCGACGGCCAGAGTACAAAGAGGTGGAAGTAAAACTGGAGAGGAGGACGAGTCTAATGTTTTACAGTCCACCGGAAACTGTTT 990
301 H D R R P E Y K E V E V K T G E E D E S N V L Q S T G K L F

      gtatttgatggccacaatcaaagttggatagaacggggaagaggtttactgcgaataaatgatcagaggtcacaagtgatcatcagagttc 1080
331 V F D G H N Q S W I E R G R G L L R I N D Q R S Q V S S E F

      cagtcacgactcgtgatgaggacacaaggtagtctaagggttaataactcaacaccaagatctggcccgccatgactatcgagagagccagt 1170
361 Q S R L V M R T Q G S L R V I L N T K I W P A M T I E R A S

      cagaaaagctctcaggatcactgccactgatggggaggatggagtcagagtgcttctcattatcacaagtcaccaaggactgtgagaacatt 1260
391 Q K S L R I T A T D G E D G V R V F L I I T S P K D C E N I

      ttgcgagctgtggactggcgaatacagcagctcagaatgcgggaggaacaagtaaggacatcaagggaacagagaaacgcaaagctgac 1350
421 L R A V D W R I Q Q L R M R E E Q V K D I K G T E K R K A D

      tcagactccgccacagaggagtcagttgcaaaaaaagcaaggtcttcagacgagtcataacagcacccctgtaatacaaaagagagaaga 1440
451 S D S A T E E S S C K K S K V F R R V I N S T L *

      gtcggatagcagtggttagatcctgaaactgatgtttcatcagaaagctgtacatcatcatccctaacagtcaggtccgagtcagactg 1530
a                                     1531

```

図3-4 ホタテガイ精巢CaNBP75のcDNA塩基配列

上段に塩基配列を、下段に推測されるアミノ酸配列を示した。ストップコドンはアスタリスクで示した。左の数字はアミノ酸番号、右の数字は塩基番号である。CaNBP75のアミノ酸配列分析で決定された配列には下線を引いた。5'-RACE法で用いたリバースプライマーの位置は□で示した。FXFG-、およびFXFX-モチーフは■で示した。

得られた6つのペプチドのうち、5つは塩基配列から推測された配列と一致した。ペプチドKEP 65の配列は、クローニングした配列の1つに見い出され、これはオルタナティブスプライシングによるアイソフォームの配列と考えられた（第5章）。

3.3.3 ノーザンブロッティングによる CaNBP75 mRNA の同定

frg68-69フラグメントをプローブに用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。ホタテガイ精巣トータルRNAをホルムアルデヒド法で電気泳動して展開し、ナイロン膜に転写した。DIGラベルしたfrg68-69フラグメントでハイブリダイゼーションを行い、抗DIG抗体でCaNBP75遺伝子の転写産物を検出した（図3-5）。この結果、約10 kbのバンドが検出され、CaNBP75のmRNAと推定された。また、約5.2 kbのマイナーなバンドが検出された。

3.4 考察

CaNBP75についてcDNAクローニングを行い、1,425 bpのORFを含む、全長約1.5 kbpの塩基配列を決定した。このcDNAの5'側より22番目から始まるATGは、アミノ酸配列分析で得られたシーケンスに基づいたフレームで、一番上流に位置するメチオニンをコードする。得られたシーケンス中のこれより上流には同じフレームでの終止コドンは見られなかったが、異なるプライマーを用いて逆転写して得た5'-RACE法の結果はいずれもこのATGの上流20塩基程度の配列しか与えられなかったこと、このATG近傍の塩基配列が、真核生物でmRNAが効率よく翻訳されるためのコンセンサス配列として知られるKozak配列(51)にほぼ一致していることから、このATGが開始メチオニンであると思われる。コードされる蛋白質の分子量の計算値、5万2千は、抽出液中のCaNBP75のSDS-PAGE上での移動度から見積もった値の7万5千と比較すると小さい。しかし、発現系を用いて作成した、この分子量5万2千の蛋白質は、SDS-PAGE上で実際の分子量と比べて移動度が小さく、ホタテガイ精巣内在性のCaNBP75とほぼ同じ移動度を示した（第4章）。これより、今回クローニング

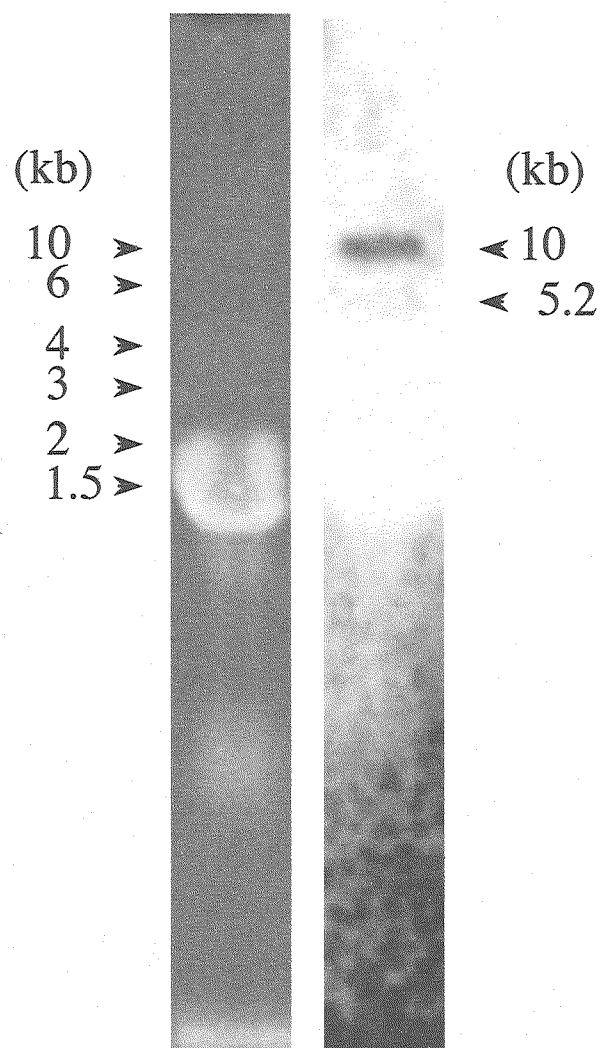


図3-5 ノーザンハイブリダイゼーション法によるCaNBP75 mRNAの検出

ホタテガイ精巢トータルRNA (20 μ g) をホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動法で展開後メンブレンに転写し、ノーザンハイブリダイゼーション法でCaNBP75 mRNAを検出した。A. アガロースゲルの臭化エチジウム染色。B. DIG標識したアンチセンスRNAで検出したCaNBP75の転写産物。左にサイズマーカー、右に転写産物の大きさを示した。ホタテガイ精巢RNAでは、約10 kbのメジャーな転写産物と約5.2 kbのマイナーな転写産物が検出された。

したcDNAは、CaNBP75のコード領域全長を含むと考えてよいと思われる。

今回クローニングできたCaNBP75の配列について、データベース中に登録されている蛋白質のアミノ酸配列に対してBLAST相同性検索をおこなった。この結果、CaNBP75のC末端側の配列は、ヒトで見い出されたRan結合蛋白質であるRanBP3 (52) のC末端領域と高い相同性を示すことがわかった (図3-6)。RanBP3と相同性を示したのはCaNBP75のC末端領域のアミノ酸残基A211からS459までで、この領域には、核膜孔複合体を構成する蛋白質に特徴的な配列であるFXFG-モチーフが2つ、FXFXモチーフが1つ存在した (53)。また、この領域中でもアミノ酸残基E311からI411まではRanBP3のRan結合ドメイン (RanBD) (54) であるE322からS423までと特に高い相同性を示した (図3-6、白枠)。このCaNBP75のRanBD相同領域 (E311からI411) は、RanBP3のRanBDと70%の同一性を示したが、これはオリジナルのRanBDであるRanBP1との間で示した同一性の30%と比べるとはるかに高い値であった。RanBP3はそのRanBDにRanが結合することで機能が調節されていることを考えると、CaNBP75もまた、Ranによる調節を受けることもあり得ると考えられた。一方、N末端側領域はCaNBP75、RanBP3ともに電荷を持つ残基が多く、プロリン含量が高いという共通の特徴を持っていたが、配列に有意の相同性は見られなかった。

CaNBP75のN末端領域 (M1からA210) についても相同性検索をおこなったが、この領域と高い相同性を示すアミノ酸配列は、これまでに報告されている蛋白質の配列中には見出せなかった。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、CaNBP75にはアイソフォームが存在することが示唆された。これはCaNBP75のcDNAクローニング中に、CaNBP75アイソフォームに由来すると思われるクローンがいくつか見つかったことと矛盾しない。これらアイソフォームについては第5章で改めて述べることにする。CaNBP75のコード領域が1.5 kbであること、CaNBP75のヒトホモログと考えられるRanBP3のmRNAは3 kbおよび1.8 kbと報告されていることを考えると (54)、10 kbおよび5.2 kbの転写産物は異常に長いと思われる。

 CaNBP75 211 AAAPFIFGQNLDRVTGVQTS-----PCNKTSPT-----
 RanBP3 187 ATQQAFFVFGQNLDRVKLINESVDEADMENACHPSADTPATNYFLQYISSLENSTNSA

 CaNBP75 239 --SDGGFVFGTNLAERVV---KTDGADKKNERNQLDSDDESELKSTGLEKARTLEESAR
 RanBP3 247 DASSNKFVFGQNMSEVLSPPKLNEVSSDANRENAAAESGSESSQEATPEKGSIAESAA

 CaNBP75 296 EFQAKHRRPEYKEVEVKTGEEDESNVLQSTGKLFVFDGHNQSWIERGRGLLRINDQRSQ
 RanBP3 307 AYTATARKCLLEKVEVITGEEAESNVLMQCKLFVFDKTSQSWVERGRGLLRINDMAST

 CaNBP75 356 VSSEFQSRRLVMRTQGSRLRVILNTKIWPAMTIERASCKSLRITATDGED-GVRVFLIITSP
 RanBP3 367 DDGTLQSRRLVMRTQGSRLRLILNTKLWAQMCKDKASEKSLRITAMTDEQGVKFLISASS

 CaNBP75 415 KDCENILRAVDWRIQQLRMREEQVKDIKGTETKRKADSDSATEESSCKKSKVFRRVINSTL
 RanBP3 427 KDTGQLYAALHHRILALRSRVEQEQEAKMPAPEPGAAPSNEEDDSDDDDVLAPSGATAAG

図3-6 CaNBP75とヒトRanBP3のアミノ酸配列の比較

ホタテガイCaNBP75（上段）とヒトRanBP3（下段）のアミノ酸配列を比較した。一致するアミノ酸は■で示した。RanBDは白枠で囲った。FXFG-、およびFXFX-モチーフはアスタリスクで示した。

しかし、これまでにクローニングされたホタテガイ精巢CaNB、CaNAでも、mRNAは異常に長かった（ともに約8 kb）ことから、これはホタテガイ精巢に発現するmRNAの特徴であるのかも知れず、なんらかの翻訳時調節に関わっている可能性も考えられる。

3.5 まとめ

1. ホタテガイ精巢CaNBP75のアミノ酸配列、およびcDNAの塩基配列を決定した。cDNAクローニングの結果、CaNBP75は全長474残基、51,850 Daの蛋白質であると推測された。
2. CaNBP75のC末端領域はヒトRan結合蛋白質、RanBP3と高い相同性を示した。一方、N末端領域は類似するアミノ酸配列を持つ蛋白質は見い出されなかった。
3. ホタテガイCaNBP75にはいくつかのアイソフォームが存在することが示唆された。

第4章：CaNBP75の機能解析

4.1 目的

アミノ酸配列、および塩基配列から、CaNBP75はこれまでに報告のない新規蛋白質であることがわかった。配列の相同性からCaNBP75のC末端側はRanを結合することが推測されたが、N末端側の領域の機能は不明である。本章ではCaNBP75の各種欠損変異体を構築し、カルシニューリンとの相互作用を解析する。また、CaNBP75のホタテガイにおける組織分布を調べ、CaNBP75の生体内での機能を考察する。

4.2 実験方法

4.2.1 CaNBP75組換え体の構築

CaNBP75の各種組換え蛋白質はHis-tag融合タンパク質、あるいはGST-tag融合タンパク質として発現させた。

CaNBP75のアミノ酸残基1から474を含むcDNAはプライマー5'CCCATGGCGGATGTTTACACA3'および5'GGGATCCTTACAGGGTGCTGTTGAT3'を用いてPCR法で増幅した。PCR産物はプライマー配列中に作成したNco IサイトおよびBamH Iサイト（下線を引いて示した）で切断した。CaNBP75のN末端領域の残基6から296まで、およびC末端領域残基275から474までをコードするcDNA断片は、cDNAのスクリーニングで得られた対応するクローンを用い、EcoR I/Not IアダプターサイトとCaNBP75中のEcoR IおよびNot Iサイトで切断して取り出した。これらのcDNA断片は発現ベクターpET-30b(+) (Novagen) の各制限酵素サイトに組み込んだ。構築した各プラスミドはN端に(His)₆-セグメントおよびS-tagを含めて、45から59残基のタグ配列を含む融合蛋白質をコードしている。His-tag融合蛋白質は大腸菌BL21 (DE3) 株に発現させ、TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を用いて精製した。

CaNBP75のRanBP3相同領域（残基211から474）を含むGST-tag融合蛋白

質は次の手順で構築した。はじめに全長をコードするcDNAをプライマー
5'CGGATCCATGGCGGATGTTTACACA3'および
5'GGGATCCTTACAGGGTGCTGTTGAT3'を用いてPCR法で増幅し、得られた
PCR産物をプライマー配列中に下線で示した*Bam*HIサイトを用いて発現ベクター
pGEX-2T (Amersham Biosciences) に組み込んだ。次にN末端領域をコードす
る領域を欠失させるために、このプラスミドを鋳型に用いてプライマー
5'GGATCCACGCGGAACCAG3'および5'GCTGCCGCCCCTGAGTTT3'でPCR増
幅を行った。得られたPCR産物をランティング後、自己ライゲーションし、
目的の蛋白質を発現するプラスミドを得た。GST-tag融合タンパク質は大腸菌
BL21 (DE3) 株に発現させ、glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences)
カラムを用いて精製した。

精製した各融合タンパク質は20 mM Tris-HCl、2 mM MgCl₂、80 mM
NaCl、50% glycerol、pH 8.0に対して透析し、-20℃で保存した。

4.2.2 ホタテガイ各組織からの蛋白質の抽出

生のホタテガイより各種組織を切り出し、5倍容のバッファーC (第2章)
でホモジナイズした。ホモジネートを520,000 × gで20分間遠心分離して沈澱
を除き、抽出物を得た。

4.2.3 SDS-PAGE

SDS-PAGEは第2章に記載した8%あるいは12%総アクリルアミドを用いた
Laemmliの方法でおこなった。

4.2.4 ノーザンブロッティング

新鮮なホタテガイより各組織を切り出し、第1章に記載したAGPC法を用
いてトータルRNAを調製した。卵巣のみ-80℃にて保存した組織より調製した。
ノーザンブロッティングは第3章に記載した方法で行った。ただし、ハイブリ
ダイゼーション後、膜は2× SSCを用いて室温で5分間、2回洗浄した後、0.5×

SSCで68℃にて15分間、2回洗浄した。

4.2.5 ウェスタンブロッティングおよびファウエスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングおよび精製カルシニューリンをプローブに用いたファウエスタンブロッティングは第2章に記載した方法でおこなった。

CaNBP75のN末端領域の配列を含む組換え蛋白質、His-CaNBP75(N)をプローブに用いたファウエスタンブロッティングは、以下の手順で行った。精製カルシニューリン5 μ gを8% SDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜にブロッキングした。膜をブロッキング後、0.2 mg/ml (5 μ M) のHis-CaNBP75(N)を含むブロッキングバッファー中で25℃にて終夜振盪し、膜上のカルシニューリンにHis-CaNBP75(N)をオーバーレイした。ブロッキングバッファーで10分間、4回の洗浄をおこなった後、ブロッキングバッファーで2,000倍に希釈したHis-probe (G-18) (Santa Cruz Biotechnology) 中で3時間以上25℃で振盪した。ブロッキングバッファーで洗浄後、AP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (BioRad) を結合させる手順以降はウェスタンブロッティングで示した方法と同様におこない、膜上のカルシニューリンに結合したHis-CaNBP75(N)を検出した。

4.3 結果

4.3.1 CaNBP75発現系の構築

カルシニューリンとCaNBP75の相互作用を解析するため、CaNBP75、および各種欠損変異体の大腸菌発現系を構築した。組み換え体構築の詳細な操作は実験方法の項に記した。pET-30b(+)にCaNBP75の残基1-474 (His-CaNBP75 (Full))、N末端領域残基6-296 (His-CaNBP75(N))、あるいはC末端領域残基275-474 (His-CaNBP75(C)) をコードするcDNAを組み込み、His-tag融合タンパク質として発現させた。また、CaNBP75のRanBP3相同領域である残基211-474 (GST-CaNBP75(211-474)) はcDNAを発現ベクターpGEX-2Tに組み込み、GST-tag融合タンパク質として発現させた。構築した組み換え体の模式図を図4-

1に示した。

発現精製した組換え蛋白質をSDS-PAGEで展開した（図4-2 A）。組換え蛋白質の分子質量の計算値は、His-CaNB75(Full)、His-CaNB75(N)、His-CaNB75(C)、GST-CaNB75(211-474)について、それぞれ58.9、39.3、29.3、57.0 kDaであるのに対し、SDS-PAGEから見積もられた値はそれぞれ83、58、31、53 kDaであった（表4-1）。また、クローニングされたcDNAにコードされるCaNB75の分子質量の計算値は51.9 kDaなのに対し、ホタテガイ精巣抽出物中のCaNB75の移動度は予想される値よりも小さく、見積もられた分子質量は75 kDaであり、計算値よりも23 kDa大きな値になった。C末端領域のアミノ酸配列からなる組換え蛋白質、His-CaNB75(C)およびGST-CaNB75(211-474)のSDS-PAGE上での移動度が計算値から予想される値と矛盾しないのに対し、His-CaNB75(Full)およびHis-CaNB75(N)のSDS-PAGEで見積もられる分子質量は、計算値よりもそれぞれ24 kDa、19 kDa大きく、精巣抽出液のCaNB75と同程度高分子量側にバンドが検出された。これよりN末端領域を含む組換え体はSDS-PAGE上で見かけ上実際よりも大きい分子としてふるまうことがわかった。

4.3.2 CaNB75組換え蛋白質とカルシニューリンの結合

精製したこれらCaNB75の組換え蛋白質のカルシニューリンとの結合能を、ファウエスタン法を用いて分析した。

はじめに、CaNB75のどの領域がカルシニューリンと相互作用するかを明らかにするため、精製カルシニューリンをプローブにファウエスタンブロッキングを行った。各組換え蛋白質をSDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜に転写した。この膜をカルシニューリンおよびカルモジュリンとインキュベーションした後、膜上の蛋白質と結合したカルシニューリンを、抗カルシニューリン抗血清を用いて検出した（図4-2 B、C）。His-CaNB75(Full)はホタテガイ精巣抽出物中のnative CaNB75と同様にカルシニューリンと結合するのが確認できた。また、CaNB75のN末端領域を含む欠損組換え蛋白質、His-CaNB75

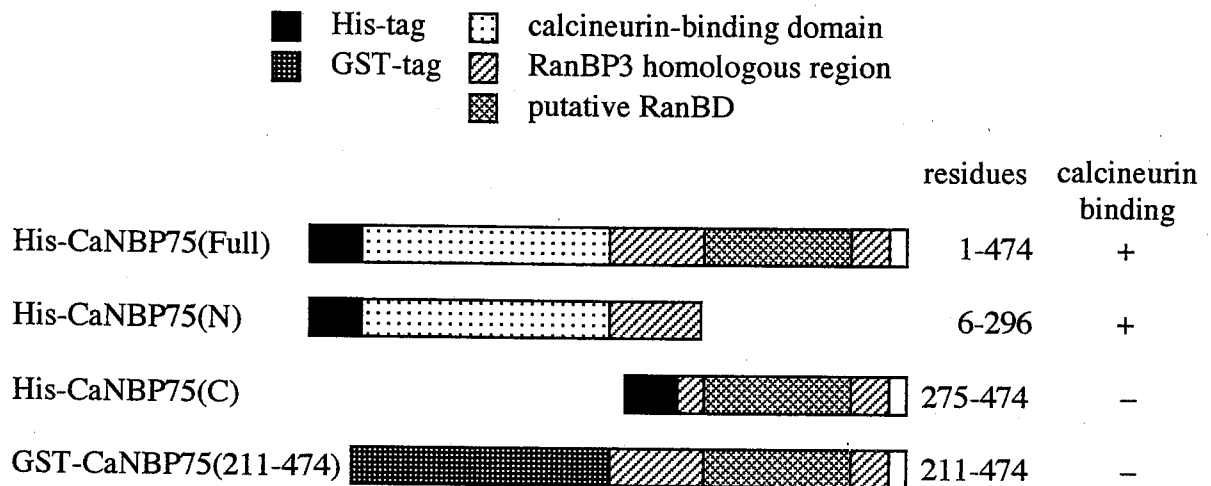


図4-1 CaNBP75変異体の模式図

本実験で用いたCaNBP75の変異体を模式的に示した。

CaNBP75 proteins	Molecular Mass (kDa)	
	calculated	measured
scallop testis native CaNBP75	51.9	75
His-CaNBP75(Full)	58.9	83
His-CaNBP75(N)	39.3	58
His-CaNBP75(C)	29.3	31
GST-CaNBP75(211-474)	57.0	53

表4-1 CaNBP75変異体の分子量

本実験で用いたCaNBP75変異体およびホタテガイ精巢抽出液中のCaNBP75分子量について、アミノ酸配列からの計算値とSDS-PAGEで求めた値を示した。

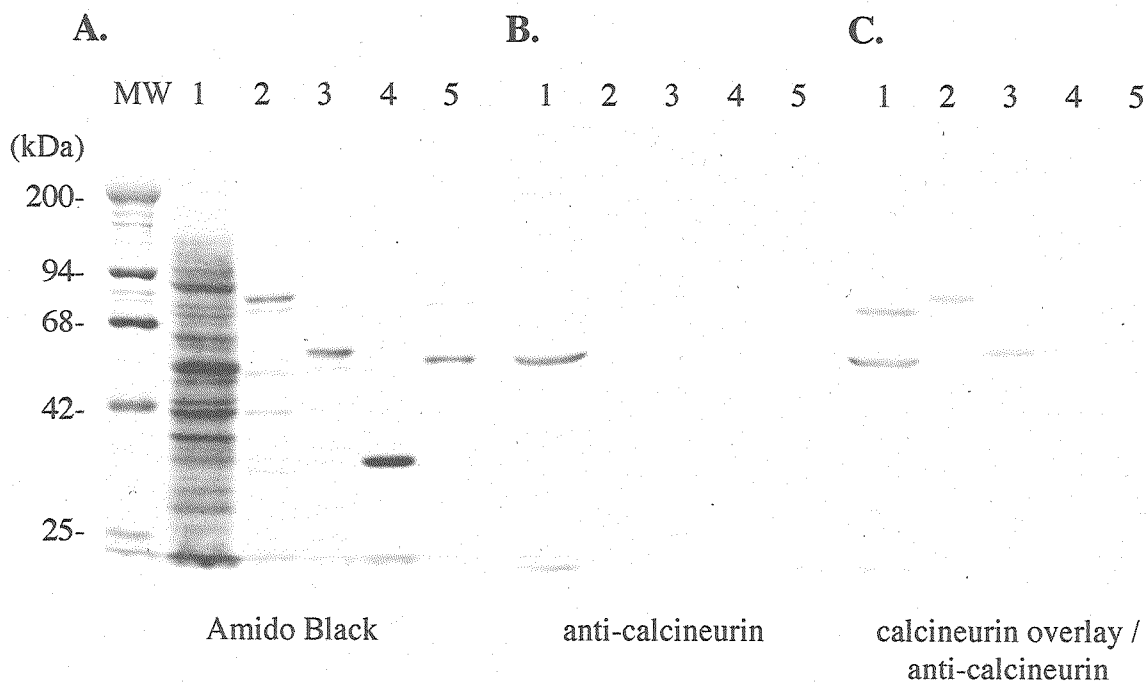


図4-2 CaNBP75の欠損変異体の発現とカルシニューリン結合能の解析

CaNBP75の各種欠損変異体各1 µgを8% SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。これら変異体蛋白質について、精製カルシニューリンをプローブに用いてファウエスタンプロットティングでカルシニューリンとの相互作用を調べた。 A. アミドブラック染色。 B. 抗カルシニューリン抗血清を用いたウエスタンプロットティング。 C. CaN (0.25 µM) / CaM (2 µM) をオーバーレイしたファウエスタンプロットティング。 レーン1、ホタテガイ精巣抽出液 (10 µg) ; レーン2、His-CaNBP75; レーン3、His-CaNBP75(N); レーン4、His-CaNBP75(C); レーン5、GST-CaNBP75(211-474)。

(N)も、カルシニューリンと結合した。一方、CaNBP75のN末端領域を含まない欠損組換え蛋白質であるHis-CaNBP75(C)およびGST-CaNBP75(211-474)はカルシニューリン結合能を示さなかった。以上の結果から、CaNBP75のカルシニューリン結合領域はCaNBP75のN末端領域、残基6から残基210に含まれることが示された。

次に、カルシニューリンのどちらのサブユニットにCaNBP75が相互作用するのかを明らかにするため、His-CaNBP75(N)をプローブに用いてファウエスタンプロットティングを行った(図4-3)。精製カルシニューリンをSDS-PAGEで展開した後ニトロセルロース膜に転写し、His-CaNBP75(N)をオーバーレイした。膜上の蛋白質と結合したHis-CaNBP75(N)は、抗His-tag抗体で検出した。この結果、His-CaNBP75(N)はCaNAと結合し、CaNBとは結合しないことが明らかになった。また、2 μ Mのカルモジュリン存在下でHis-CaNBP75(N)オーバーレイを試みたが、カルモジュリン非存在下での結果と差が見られなかった。

4.3.3 CaNBP75の組織分布

CaNBP75の生理的意義に関する知見を得るために、ホタテガイ組織(図4-4)におけるCaNBP75の発現解析をノーザン法、ファウエスタン法を用いて行った。

ノーザンプロットティングは、ホタテガイ各組織より調製したトータルRNAに対して、DIG標識したCaNBP75アンチセンスRNAをプローブに用いて行った(図4-5)。第3章で確認された10 kbの転写産物は、解析したすべての組織で発現が見られた。この転写産物は特に多く発現していた精巣に加えて、腎臓にも多量に発現していた。5.2 kbの転写産物は精巣に加えて鰓、外套膜、腎臓にも発現が見られた。また、卵巣には1.7 kbの転写産物が検出され、この分子種は精巣にも微量に発現しているのが確認された。

ファウエスタンプロットティングは、精製カルシニューリンをプローブに用いて、生のホタテガイの各種組織から調製した粗抽出液に対して行った(図4-6)。閉殻筋の平滑筋組織であるオパーク部とトランスルーセント部、およ

CaNA- 



CaNB- 

Amido Black anti-His His-CaNB75(N)
 overlay / anti-His

図4-3 His-CaNB75(N)とカルシニューリンの相互作用の解析

ホタテガイ精巢精製カルシニューリン5 μ gを12% SDS-PAGEで展開した後、ニトロセルロース膜に転写した。膜をHis-CaNB75(N) (0.2 mg/ml) 中でインキュベートし、カルシニューリンと結合したHis-CaNB75(N)を抗His-tag抗体で検出した。 左：アミドブラック染色、中央：His-CaNB75(N)オーバーレイなし、右：His-CaNB75(N)オーバーレイ後。

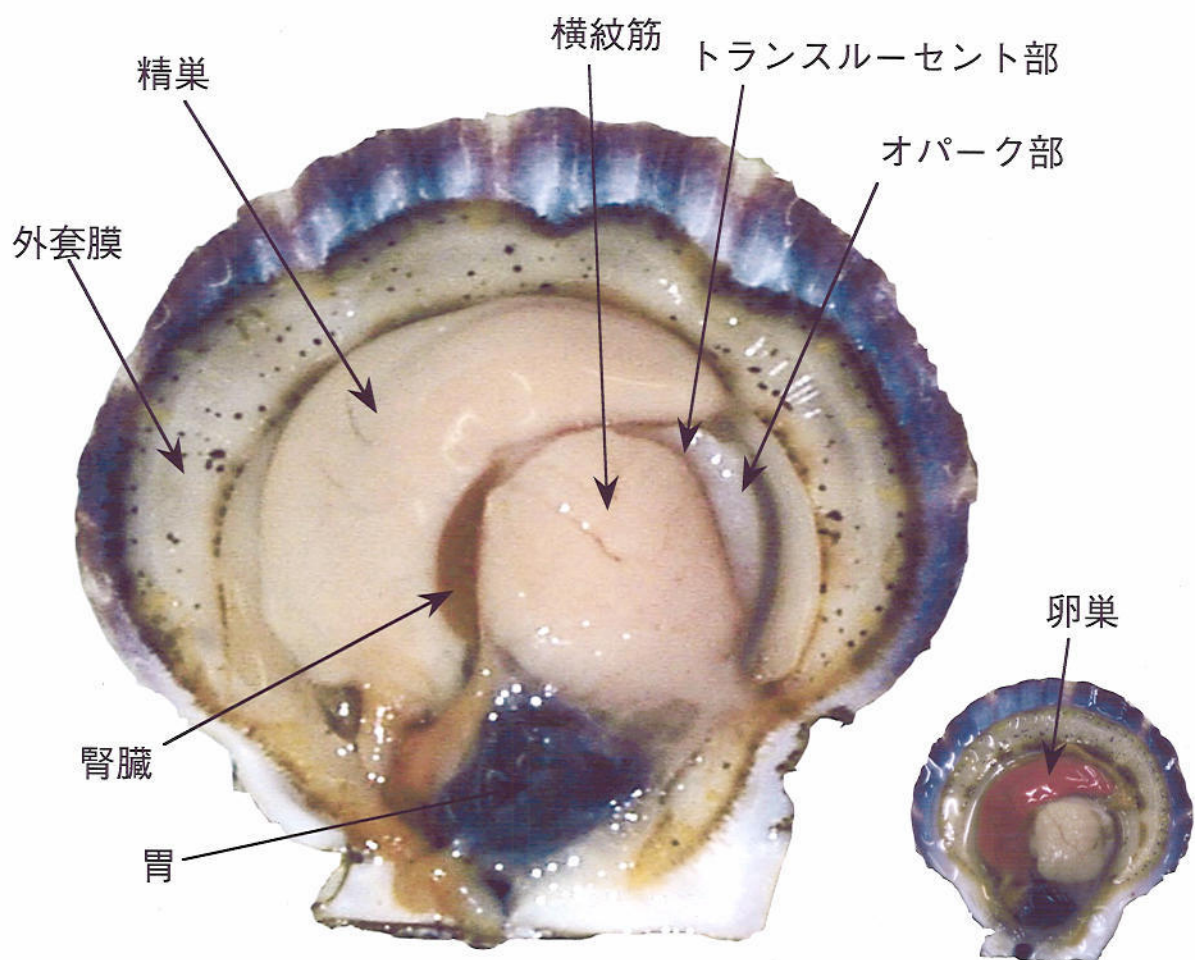


図4-4 ホタテガイの解剖図

右側の貝殻、外套膜ならびに鰓を切断除去して内臓の各部位を示した。

左：雄 図右：雌

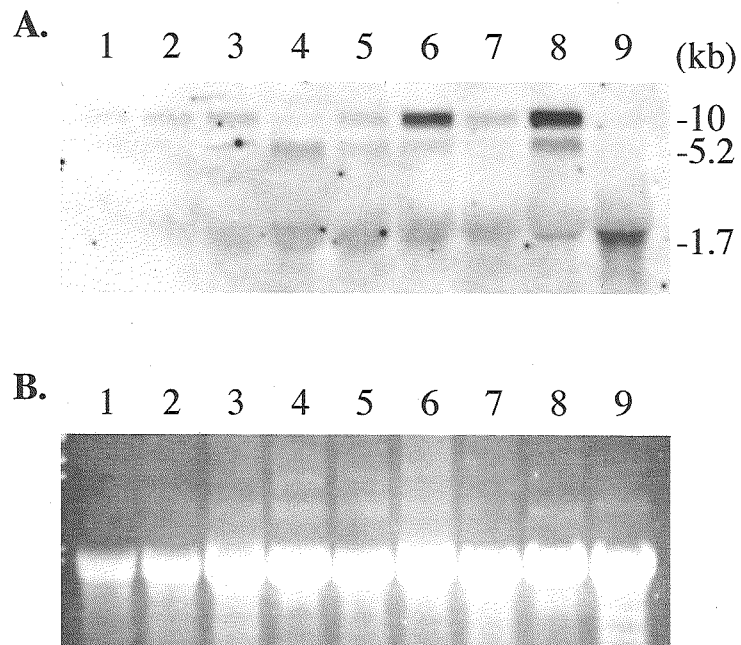


図4-5 ホタテガイ組織におけるCaNBP75 mRNAの発現

種々のホタテガイ組織から調製したトータルRNA25 μ gを1%ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動法で展開し、メンブレンに転写してノーザンハイブリダイゼーション法でCaNBP75 mRNAを検出した。A. DIG標識したCaNBP75アンチセンスRNAで検出したCaNBP75の転写産物。B. アガロースゲルの臭化エチジウム染色。 レーン1、横紋筋; レーン2、平滑筋トランスルーセント部; レーン3、平滑筋オパーク部; レーン4、鰓; レーン5、外套膜; レーン6、腎臓; レーン7、胃; レーン8、精巢; レーン9、卵巣。

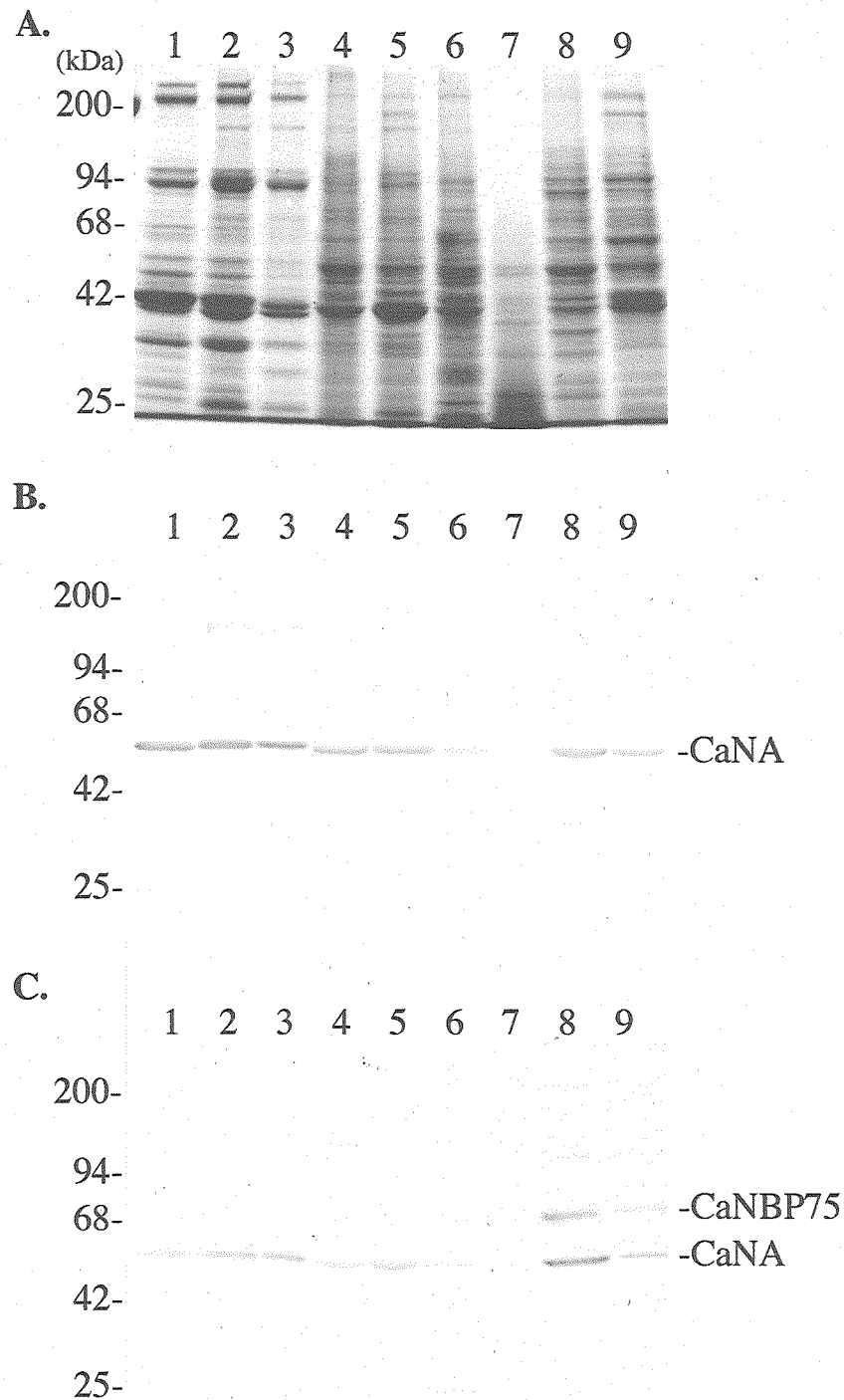


図4-6 ホタテガイCaMBP75蛋白質の組織分布

ホタテガイ組織抽出液（各30 μ g蛋白質）を8% SDS-PAGEで展開した後メンブレンに転写し、CaMBP75およびカルシニューリンの発現を解析した。 A. CBB染色。 B. 抗カルシニューリン抗血清を用いたウエスタンブロッティング。 C. CaN (0.25 μ M) /CaM (2 μ M) をオーバーレイしたファウエスタンブロッティング。 レーン1、横紋筋; レーン2、平滑筋トランスルーセント部; レーン3、平滑筋オパーク部; レーン4、鰓; レーン5、外套膜; レーン6、腎臓; レーン7、胃; レーン8、精巢; レーン9、卵巣。

び横紋筋ではカルシニューリンは顕著に発現しているが、CaNBP75はほとんど検出されなかった。他の組織、鰓、腎臓、外套膜にもカルシニューリンは発現しているが、これらの組織ではCaNBP75はわずかに検出された。また、胃ではカルシニューリン、CaNBP75、共に発現が確認されなかった。一方、精巣にはカルシニューリンと共にCaNBP75も豊富に発現していた。発現量は少ないものの、卵巣にもカルシニューリンとCaNBP75が確認された。

CaNBP75蛋白質の発現は、特に精巣、卵巣での発現量が多い点で、ノーザンブロッティングの結果と良く一致した。

4.4 考察

第3章でクローニングした塩基配列をもとに、CaNBP75の各種変異蛋白質発現系を構築した。発現、精製した各種変異蛋白質のSDS-PAGEから見積もられた分子質量を、配列に基づく計算値と比較すると、N末端領域を含む組換え蛋白質（His-CaNBP75(Full)およびHis-CaNBP75(N)）はSDS-PAGE上で計算値よりも約20 kDa大きな値を示すことがわかった。第3章で示したクローニングで得られたcDNAのORFにコードされた蛋白質の分子量の計算値は51,850であり、第2章でホタテガイ精巣抽出液中に存在することを示したカルシニューリン結合蛋白質、CaNBP75がSDS-PAGE上で75 kDaの移動度を示すことは説明できていなかったが、これはCaNBP75のN末端領域が持つ特性があらわれた結果と考えられた。

CaNBP75の機能を解析するため、CaNBP75のN末端領域、およびC末端領域の組換え体を用いてカルシニューリンとの結合実験をおこなった結果、N末端領域残基6から残基210を含む組換え体がカルシニューリン結合能を持つことがわかった（図4-2）。配列からRanを結合すると予測されたRanBD相同領域を含むC末端領域は、カルシニューリンとの結合に関与していなかった。また、His-CaNBP75(N)をプローブに用いた結合実験から、カルシニューリンの触媒サブユニットであるCaNAとCaNBP75のN末端領域が直接相互作用することが明らかになった（図4-3）。これより、ホタテガイ精巣抽出物に対して精製カル

シニューリンをオーバーレイした実験から検出されたCaNBP75とクローニングされたcDNAがコードする蛋白質が同一のものであることが示された。

このカルシニューリンを結合したN末端領域は、他にホモロジーのある蛋白質が見つかっていないが、プロリン含量が高い（20残基／210残基）、セリン含量が高い（28残基／210残基）という特徴ある配列を持っている。このN末端領域を含むHis-CaNBP75(N)およびHis-CaNBP75(Full)は、数十 μ Mの濃度で反応混液に加えるとカルシニューリンのリン酸化インヒビター1脱リン酸化酵素活性をおよそ20～40%阻害した。しかし、阻害蛋白質としては、あまりに高濃度のCaNBP75が必要であり、このままで生体内で機能しているとは考え難い。N末端領域にはセリン残基も多いことから、リン酸化による修飾、あるいは他の因子による阻害能の増強が行われている可能性もあり得る。今後、ネイティブCaNBP75とリコンビナントCaNBP75のカルシニューリン脱リン酸化活性阻害能の比較、阻害活性化因子の探索など、N末端領域については詳細な解析が必要だと考えられる。

CaNBP75発現の組織分布をみた結果、カルシニューリンがホタテガイ組織で普遍的に発現しているのに対し、CaNBP75は精巣および卵巣で特に多く発現していた。カルシニューリンは筋組織での発現量が多く、ホタテガイの筋組織においてもほ乳類と同様、カルシニューリンの関与するシグナル伝達系が存在することが示唆された。しかし、CaNBP75は筋組織では発現が認められず、CaNBP75が組織特異的な機能を持つ可能性が示唆された。精巣ではカルシニューリンと共にCaNBP75が発現しており、CaNBP75が精巣の機能に関与する可能性が示唆された。また、精巣と比較すると強度は弱いものの、卵巣にもカルシニューリンおよびCaNBP75が発現していることから、CaNBP75は精子変態、鞭毛の運動といった精巣特有の機能だけではなく、減数分裂に関与する蛋白質である可能性も考えられる。今後、精巣および卵巣の成熟過程におけるCaNBP75の発現変化を調べ、精子形成過程のどの段階で働く蛋白質であるのかを明らかにする必要があると思われる。

4.5 まとめ

1. CaNBP75の大腸菌発現系を構築した。CaNBP75のアミノ酸残基6から210までのN末端領域はSDS-PAGE上で普通とは異なる挙動を示した。
2. CaNBP75とカルシニューリンの相互作用点はCaNBP75のアミノ酸残基6から210までのN末端領域、およびカルシニューリン触媒サブユニットに存在した。
3. CaNBP75は精巣、および卵巣に多く発現していた。

第5章：CaNBP75のアイソフォーム

5.1 目的

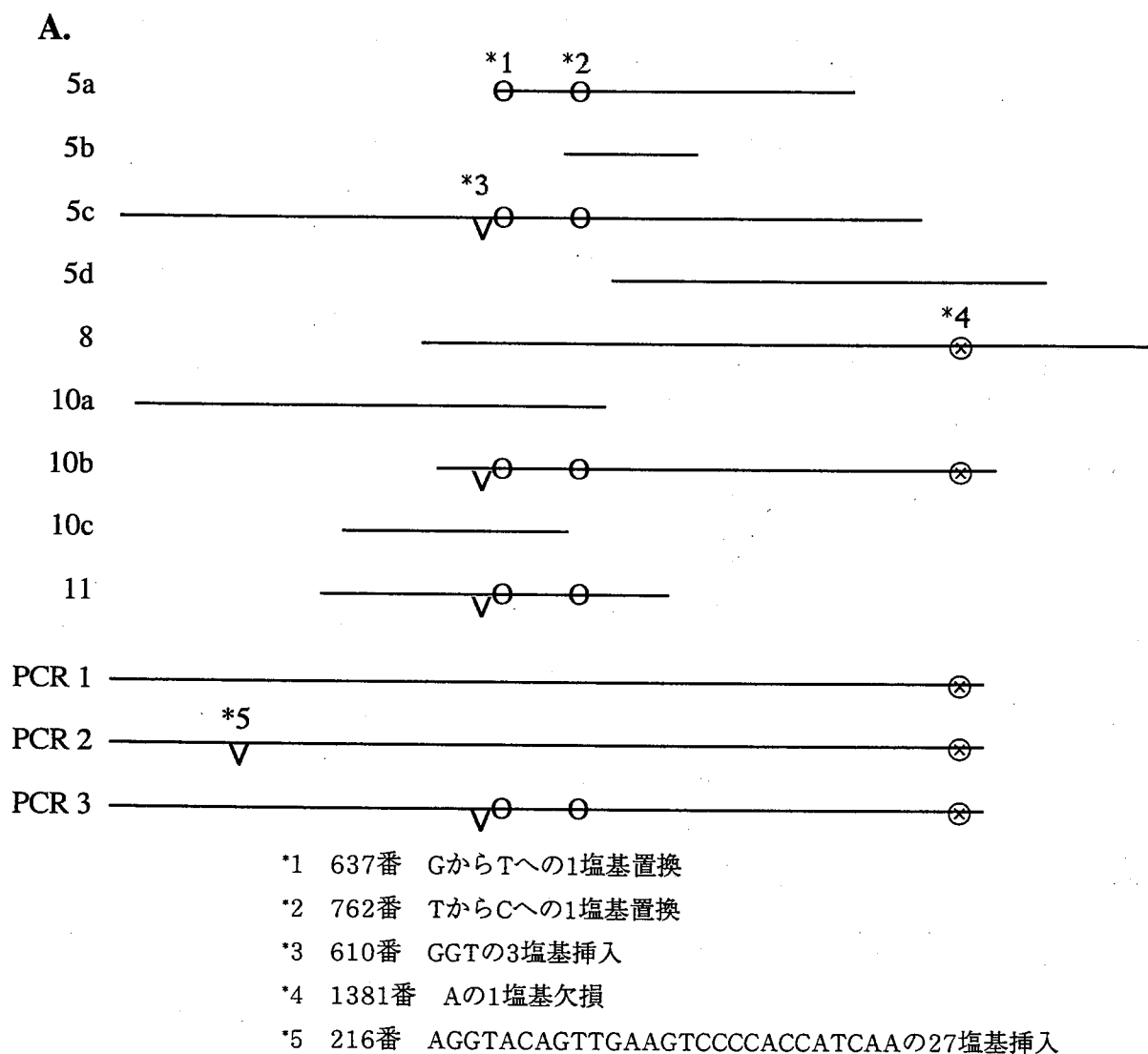
粗抽出液の二次元電気泳動による展開時、CaNBP75のスポットは他の蛋白質のスポットとの挙動は異なり、カーネーション状の拡散したスポットを形成した（第2章）。また、イオン交換カラムクロマトグラフィーでの分離を試みると、CaNBP75はブロードなピークで溶出した。異なるイオン強度で溶出したCaNBP75は、二次元電気泳動上で異なる位置にスポットを生じた（第2章）。これらの点から、CaNBP75にはアイソフォームが存在するか、翻訳後修飾の異なるCaNBP75が存在する可能性が考えられた。実際に、CaNBP75のcDNAクローニングの過程でアイソフォームに由来すると考えられる、いくつかのcDNAが得られた。本章ではこれらについて詳しく考察する。

5.2 結果

ホタテガイ精巢cDNAライブラリーのスクリーニングで得られたCaNBP75のcDNAクローン、および発現系構築のためにおこなったPCRによるcDNA増幅過程で得られたcDNAのクローンを、図5-1Aに図示した。5aから11は第3章でおこなったcDNAライブラリーのスクリーニングで得られたクローンであり、PCR1から3は第4章でおこなったPCRで得られたクローンである。

5.3 考察

ホタテガイ精巢cDNAライブラリーのスクリーニングで得られたクローン、PCRによるcDNA増幅で得られたcDNAのクローンは、図5-1Aに示したようなバリエーションが存在した。これらのクローンは、塩基配列の特徴から4種に分類できることがわかった（図5-1B）。Type 1の配列は第3章で示したものに当たる。Type 2は、1381番目のアデニンが欠損したクローンで、これによりフレームシフトがおこり、終止コドンの位置が3'側に106塩基分シフトした。Type 3はType 2と同じ配列を持ち、216番目に27塩基の挿入があり、オルタナティブスプライシングの結果生じたクローンであると思われた。挿入されたア



B.

CaBP75 isoform	Position				
	216	610	637	762	1381
Type 1					
Type 2					- 1 bp
Type 3	+ 27 bp				- 1 bp
Type 4		+ 3 bp	G→T	T→C	- 1 bp

図5-1 cDNAクローニングで得られたCaBP75のバリエーション

A. クローニングで得られたCaBP75 cDNAのバリエーションを模式的に示した。○は塩基置換、vは塩基挿入、⊗は塩基欠損を表す。5aから11はcDNAライブラリーのスクリーニングで得られたクローン、PCR1から3はPCRで得られたクローンである。 B. 塩基配列の特徴から上記クローンを分類した。

ミノ酸9残基の配列 (GTVEVPTIK) は、アミノ酸配列分析において、KEP 65として分析されたペプチド中の配列と一致した (図5-2)。これにより、Type3は蛋白質として確かに翻訳されていることが示された。Type 4は1381番目の一塩基欠損に加えて610番目に3塩基の挿入があり、この結果グリシンが一残基挿入されると考えられた。また同時に637番目、762番目に1塩基置換があり、このうち637番目についてはアラニンからセリンへのアミノ酸の置換が伴うことが予想された。これら610、637、762番目の配列の変更はすべてセットでおこなっていると推測された。

Type 3の挿入配列について、さらに詳しく見ると、挿入箇所において、AGが重複しているため、挿入位置は3パターン考えられる (Frame 1、2、3) ことがわかる。実際にどの位置で挿入があるのかは現時点では明らかではないが、図5-2に小文字で示したFrame 3の位置で挿入されたとすると、挿入配列は、gtで始まり、agで終わることになる。真核生物のスプライシングでは、イントロンの配列がgtで始まり、agで終わる、GT-AGルールに従っていることが知られている。仮にFrame 3の位置での挿入があったと考え、このエキソンはGT-AGルールに従っていることから、RNAプロセッシングの過程で、本来イントロンとして除去される配列がエキソンとしてスプライシングされ、翻訳されている可能性がある。サザン法を用いてシングルコピーである事が証明できれば、構造的に興味深い遺伝子だと言える。

今回クローニングをおこなったホタテガイはモデル生物ではないため、純系が確立されていない。このため、塩基配列に差があった場合、個体差であることが一般的に考えられる。しかし、本実験においては、ライブラリーの構築、発現系の構築、共に同一個体のトータルRNAを用いたにもかかわらず、これらのバリエーションが観察された。このバリエーションの生じたメカニズムとして、矛盾ない説明は、Type 1、Type 2、Type 3はおなじ遺伝子から生じたスプライシングバリエーション、Type 4はType 1のアレルの違いにより生じたものである、とするものである。あるいは、Type 4はType 1とは異なる遺伝子座に存在する可能性も考えられる。今後ゲノム上での位置をサザン法を用いて解析し、

A.

Type 1

TTCGCACCATCAGTCCATTAGCCCCC
F A P S V H L A P

Type 3

TTCGCACCATCAGgtacagttgaagtccccaccatcaaagTCCATTAGCCCCC
F A P S g t v e v p t i k V H L A P

Frame 1 Frame 2 Frame 3

B.

KEP 62 XXIVSTASHHHHFAPSVHLAPSF

KEP 65 XXIVSTASHHHHFAPSGTVEXPXXX

図5-2 CaNBP75のオルタナティブスプライシング

A. 216番目の挿入箇所 (v) について、挿入なし (Type 1) と挿入あり (Type 3) の塩基配列を示した。それぞれ上段に塩基配列、下段に推定されたアミノ酸配列を示した。挿入配列に塩基の重複があるため、挿入位置が3箇所考えられる。その位置をFrame 1から3で示した。Frame 3で挿入された場合の27塩基の挿入配列を小文字で示した。 B. アミノ酸配列分析で得られたCaNBP75のリシルエンドペプチダーゼ消化ペプチドの配列を示した。KEP 65で下線で示した配列がType 3の挿入配列が翻訳されたと考えられるアミノ酸配列である。

CaNBP75	residue	M _r (calculated)	pI (calculated)
Type 1	474	51850.28	5.25
Type 2	509	55387.64	4.83
Type 3	518	56312.70	4.84
Type 4	510	55460.69	4.83

表5-1 CaNBP75アイソフォームの特性

CaNBP75のアイソフォームについて、残基数、分子量の計算値、等電点の計算値を示した。

詳細な情報が得る必要があると考えられる。

本研究のcDNAクローニングで得られたCaNBP75のType 1から4のアイソフォームについて、翻訳産物の蛋白質の性質を表5-1に示した。表に示したように、CaNBP75はアミノ酸残基数で474から518残基、分子質量は51.9 kDaから56.3 kDaと広い領域に分かれた。また、等電点も5.25から4.83にかけて異なることが推測された。ホタテガイ精巢抽出物の二次元電気泳動の結果、CaNBP75のスポットが一点に収束せず、分子質量75 kDa近辺、等電点5.0～5.3近辺に広がったのは、これらアイソフォームによることが示唆された。二次元電気泳動上のスポットはシームレスに広がっていたことから、アイソフォームはこれら4タイプのみならず、他にもマイナーなものが存在する、また、翻訳後修飾が複数ある可能性が高い。

これらアイソフォームが精巢中で実際にどのように使い分けられているのか、今後解析をおこなう必要があると考えられる。

5.4 まとめ

1. CaNBP75のアイソフォームが少なくとも4種類存在することが明らかになった。

第6章：総合考察

精巣のカルシニューリンは、精巣に特異的な機能をもつといわれているものの、基質の同定を含めた具体的な機能は不明である。本研究は、精巣のカルシニューリンについて新たな知見を得ることを目的としておこなった。

ホタテガイ精巣に発現しているカルシニューリンの調節サブユニットのアミノ酸配列は、ほ乳類の脳に発現しているカルシニューリンと近縁で保存性が高いことを示した。一方、ほ乳類の精巣特異型カルシニューリンと同様に、ホタテガイ精巣カルシニューリンも精巣の成熟過程に同期した発現制御を受けていることを明らかにした。（第1章）

ホタテガイ精巣のカルシニューリン結合蛋白質を探索し、ホタテガイ精巣抽出物中にカルシニューリン結合蛋白質を検出した。SDS-PAGE上で分子量約7万5千の移動度を示すことから、この蛋白質をCaNBP75と名付けた。CaNBP75の単離・精製を試み、部分精製に成功した。（第2章）

部分精製標品を用いて、全体の構造を得るため、CaNBP75のアミノ酸配列と塩基配列を決定した。ホモロジーサーチの結果、CaNBP75のC末端領域が低分子量G蛋白質Ranの結合蛋白質であるRanBP3と高い相同性を示すことがわかった。一方、N末端領域は、既知の蛋白質中には相同性の高い配列は見い出されず、CaNBP75が新規蛋白質であることが判明した。（第3章）

CaNBP75の機能を検討した。CaNBP75の各種変異蛋白質を作製し、N末端領域のアミノ酸残基6から210番目が、カルシニューリンの触媒サブユニットであるCaNAと相互作用することを示した。また、ホタテガイ組織でのCaNBP75発現分布を調べ、CaNBP75の発現は精巣、および卵巣に多いことを明らかにした。（第4章）

CaNBP75のアイソフォームについて述べた。ホタテガイ精巣CaNBP75のアイソフォームは、少なくとも4種類が存在し、そのうち2種類は蛋白質として翻訳されていることを明らかにした。（第5章）

精巣に発現しているカルシニューリンは、精巣の発達につれてmRNAの発現量が大きく変化し、精子発生の後期に発現量が最大になることがわかっている(7,44)。また、抗体を用いた研究から、カルシニューリンは減数分裂直後の精細胞の核に局在すること(24)、成熟精子ではカルシニューリンが精子の先体後部に局在することが報告されている(25)。このため、カルシニューリンは精子形成の制御や、さらに後の過程では精子の鞭毛運動の制御に関与しているのではないかと考えられているが、具体的な機能の解明はその基質や制御蛋白質を含めて、まったく手付かずの状態にある。CaNBP75と相互作用すると考えられるRanは、マウスを用いた実験で、他の体細胞の組織と比較して、精巣ではより多量に発現しているという報告がある(55)。また、ラットを用いた実験では、精子完成過程において、Ranが丸い精細胞中では核内に局在するが、精子変態に伴って核が伸長するにつれてマンチェットの微小管へと移動し、さらにマンチェットの消失する成熟した精細胞では、尾部付根の中心体領域に局在することが報告されている(56)。この局在変化から、Ranは精子形成過程でなんらかの働きをするのではないかと推測されているが、やはり具体的な機能は解明されていない。CaNBP75が精巣および卵巣に特異的に発現していること、また、CaNBP75と相同性の高いヒトRanBP3は心臓と精巣での発現量が多いと報告されていること(52)を考えると、CaNBP75やRanBP3が仲介となり、Ranとカルシニューリンが共同して精子形成過程で機能している可能性が考えられる。この可能性を検討するため、今後、精子形成過程でのCaNBP75の局在変化を明らかにする必要があるだろう。

CaNBP75はC末端領域のアミノ酸配列がRanBP3と相同性が高く、Ran結合ドメインが保存されている。このため、RanBP3と同様にCaNBP75もRanを結合することが予想されることは第3章で述べた。RanBP3はRanと結合すると同時に、核内から細胞質へ分子を運び出すexportinのひとつ、Crm1とも結合し、核外移行シグナル(NES)とCrm1との相互作用を強めるコファクターとして働くことが示されている(57)。このため、CaNBP75もRanBP3と同様に、核外移行

の機構に関与していることが期待される。CaNBP75の標的蛋白質と考えられるカルシニューリンは、T細胞の活性化機構において、NF-ATの脱リン酸化に伴い、核内に移行することが報告されている(17)。細胞内のカルシウム濃度上昇によってカルシニューリンが活性化されると、NF-ATのN末端が脱リン酸化され、核内移行シグナル(NLS)が露出し、同時にカルシニューリンの結合によってNF-ATのNESがマスクされ、NF-ATはカルシニューリンと結合したまま、核内に移行すると考えられている(17)(図6-1)。さらに、カルシウムシグナルが消失してNF-ATからカルシニューリンが解離すると、ExportinであるCrm1がNF-ATと結合し、NF-ATを再び細胞質へ運び出すと考えられている(18)。この時、カルシニューリンも核外に移行することが報告されているが(17)、このカルシニューリンの核外移行機構についてはよくわかっていない。本研究で我々はCaNBP75のN末端領域がカルシニューリンとの結合能を有し、C末端領域がRanBP3と相同性が高いことを示した(図6-2)。我々のデータは、カルシニューリンの核外移行の機構を考えるにあたり、NF-ATがCrm1に認識されて核外へ排出される時に、カルシニューリンも同時にCaNBP75を介してCrm1に結合し、核外へ排出されるという可能性を示すことができる(図6-3)。また、Crm1の基質認識、すなわち核内から細胞質へ運び出される分子の認識をRanBP3が制御しているという報告もあり(58)、他の蛋白質の核外移行機構においても、CaNBP75がCrm1基質認識を制御し、この時、カルシニューリンがCaNBP75を介してCrm1の基質認識を調節する可能性も考えられる。

CaNBP75の発見により、神経系、免疫系、筋肉、精巣といったカルシニューリンの発現が顕著である組織すべてに、カルシニューリン結合蛋白質が報告されたことになる(図6-4)。これは、 Ca^{2+} /カルモジュリンによる制御系以外にも、カルシニューリンの活性を調節する機構が普遍的に存在する可能性を示唆すると考えられる。しかし、現時点では、CaNBP75がカルシニューリンの調節因子として働くのか、逆にカルシニューリンによってCaNBP75が制御されるのかということも含めて、不明な点が多い。今後、CaNBP75に実際にRanは結合するのか、Ranの結合によってCaNBP75の機能、カルシニューリン結合

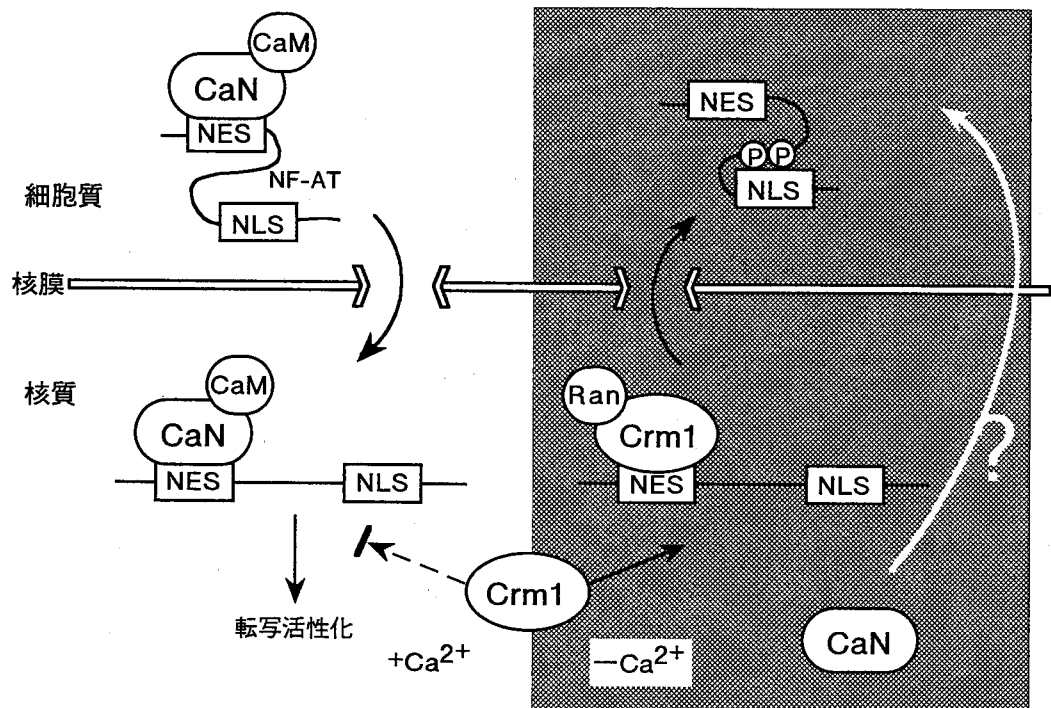


図6-1 カルシニューリンによるNF-ATの核内・核外移行

細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴いカルシニューリンが活性化されると、NF-ATは脱リン酸化され、NLSが露出して核内に移行する。 Ca^{2+} シグナルの消失に伴い、NF-ATよりカルシニューリンが解離すると、露出したNESがCrm1に認識され、NF-ATは核外に排出される。（文献18を改変）

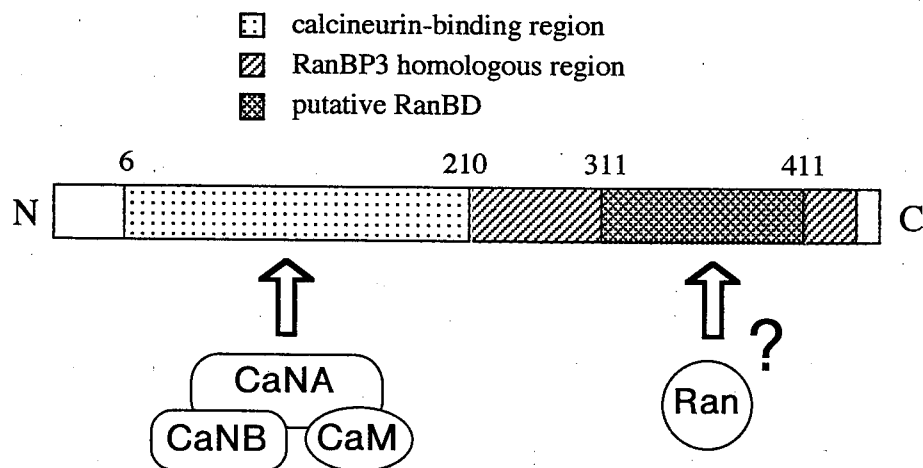


図6-2 CaBP75の機能領域

本研究で明らかになったCaBP75の機能領域を図示した。CaBP75のN末端領域のアミノ酸残基6から210番目がカルシニューリン結合能を示した。またRanBP3との配列の相同性からC末端領域のアミノ酸残基311から411番目がRan結合能を示すと推測された。

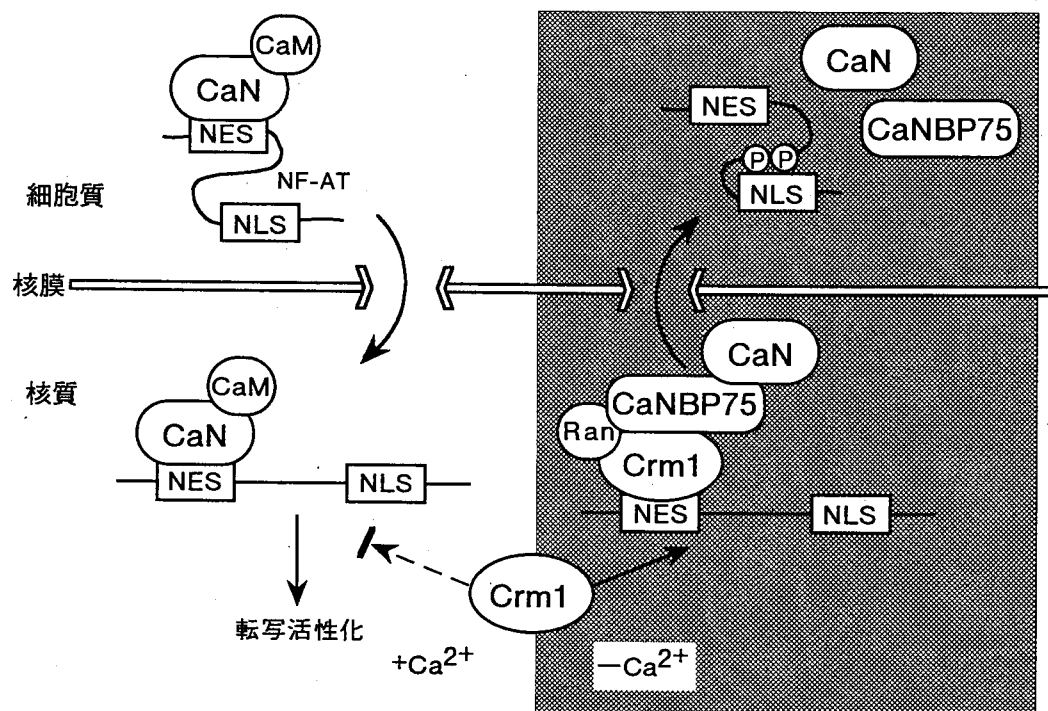


図6-3 Crm1、CaNBP75を介したカルシニューリンの核外移行

NF-ATの核外移行と同時に、Crm1に結合したCaNBP75を介してカルシニューリンが核外に排出される可能性を図示した。

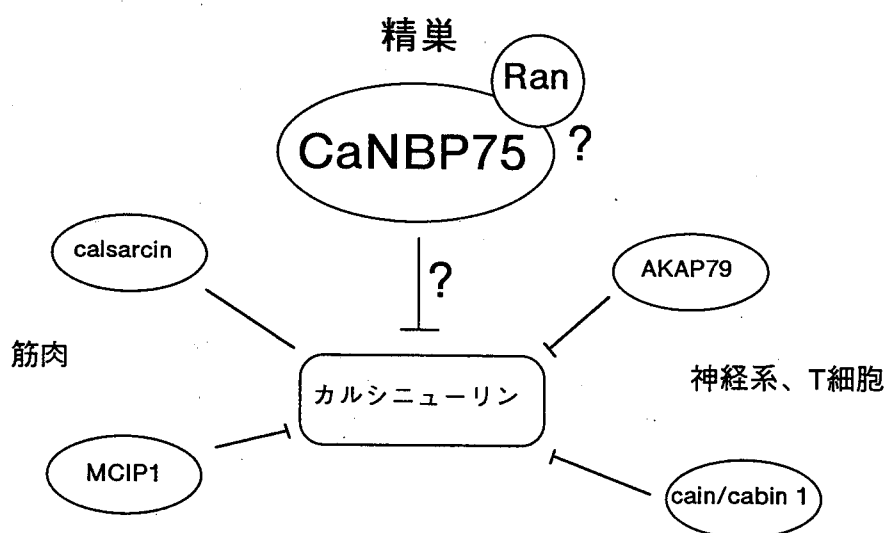


図6-4 CaNBP75によるカルシニューリンの機能調節

精巣におけるカルシニューリンの機能調節因子としてCaNBP75が働く可能性を示した。

能は変化するのかを明らかにしていく必要があるだろう。また、予備実験においてはCaNBP75がカルシニューリンの脱リン酸化活性阻害能をもつことがわかっているが、その阻害機構および調節系の研究もこれからの課題である。ほ乳類でのCaNBP75相同蛋白質の探索も今後の重要な課題である。ほ乳類のCaNBP75相同蛋白質を同定し、ホタテガイで得られた知見を応用することで、高等生物の精巣におけるカルシニューリンの機能解明が期待できる。

手がかりのなかった精巣でのカルシニューリンの機能解明に、精巣特異的なカルシニューリン結合蛋白質であるCaNBP75からのアプローチの果たす役割は大きいだろう。

参考文献

1. Ingebritsen, T. S., and Cohen, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* **132**, 255-261.
2. Ingebritsen, T. S., and Cohen, P. (1983) *Science* **221**, 331-338.
3. Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., and Cohen, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* **132**, 289-295.
4. Wang, J. H., and Desai, R. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 926-932.
5. Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., Manalan, A., Klee, C. B., and Cohen, P. (1982) *FEBS Lett.* **137**, 80-84.
6. Ito, A., Hashimoto, T., Hirai, M., Takeda, T., Shuntoh, H., Kuno, T., and Tanaka, C. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 1492-1497.
7. Muramatsu, T., Giri, P. R., Higuchi, S., and Kincaid, R. L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 529-533.
8. Ueki, K., Muramatsu, T., and Kincaid, R. L. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 537-543.
9. Chang, C.-D., Mukai, H., Kuno, T., and Tanaka, C. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1217**, 174-180.
10. Perrino, B. A., Ng, L. Y., and Soderling, T. R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 340-346.
11. Su, Q., Zhao, M., Weber, E., Eugster, H.-P., and Ryffel, B. (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**, 469-474.
12. Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3686-3690.
13. Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991) *Cell* **66**, 807-815.
14. Clipstone, N. A., and Crabtree, G. R. (1992) *Nature* **357**, 695-697.
15. O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., and O'Neill, E. A. (1992) *Nature* **357**, 692-694.

16. Kubo, M., Kincaid, R. L., Webb, D. R., and Ransom, J. T. (1994) *Int. Immunol.* **6**, 179-188.
17. Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D., and McKeon, F. (1996) *Nature* **382**, 370-373.
18. Zhu, J., and McKeon, F. (1999) *Nature* **398**, 256-260.
19. Molkenstin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., and Olson, E. N. (1998) *Cell* **93**, 215-228.
20. Chin, E. R., Olson, E. N., Richardson, J. A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J. M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2499-2509.
21. Friday, B. B., Horsley, V., and Pavlath, G. K. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 657-666.
22. Bear, M. F., and Malenka, R. C. (1994) *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 389-399.
23. Mansuy, I. M., Mayford, M., Jacob, B., Kandel, E. R., and Bach, M. E. (1998) *Cell* **92**, 39-49.
24. Moriya, M., Fujinaga, K., Yazawa, M., and Katagiri, C. (1995) *Cell Tissue Res.* **281**, 273-281.
25. Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., and Means, A. R. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1625-1633.
26. Coghlan, V. M., Perrino, B. A., Howard, M., Langeberg, L. K., Hicks, J. B., Gallatin, W. M., and Scott, J. D. (1995) *Science* **267**, 108-111.
27. Klauck, T. M., Faux, M. C., Labudda, K., Langeberg, L. K., Jaken, S., and Scott, J. D. (1996) *Science* **271**, 1589-1592.
28. Lester, L. B., Faux, M. C., Nauert, J. B., and Scott, J. D. (2001) *Endocrinology* **142**, 1218-1227.
29. Frey, N., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14632-14637.
30. Frey, N., and Olson, E. N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13998-14004.
31. Miyazaki, T., Kanou, Y., Murata, Y., Ohmori, S., Niwa, T., Maeda, K.,

- Yamamura, H., and Seo, H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 14567-14571.
32. Yang, J., Rothermel, B., Vega, R. B., Frey, N., McKinsey, T. A., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2000) *Circ. Res.* **87**, E61-68.
 33. Fuentes, J. J., Genesca, L., Kingsbury, T. J., Cunningham, K. W., Perez-Riba, M., Estivill, X., and de la Luna, S. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1681-1690.
 34. Strippoli, P., Lenzi, L., Petrini, M., Carinci, P., and Zannotti, M. (2000) *Genomics* **64**, 252-263.
 35. Kingsbury, T. J., and Cunningham, K. W. (2000) *Genes. Dev.* **14**, 1595-1604.
 36. Cao, X., Kambe, F., Miyazaki, T., Sarkar, D., Ohmori, S., and Seo, H. (2002) *Biochem. J.* **367**, 459-466.
 37. Lai, M. M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S., and Snyder, S. H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18325-18331.
 38. Sun, L., Youn, H. D., Loh, C., Stolow, M., He, W., and Liu, J. O. (1998) *Immunity* **8**, 703-711.
 39. Maru, K. (1976) 北海道立水産試験場報告 **18**, 9-26.
 40. Resh, M. D. (1994) *Cell* **76**, 411-413.
 41. Aitken, A., Cohen, P., Santikarn, S., Williams, D. H., Calder, A. G., Smith, A., and Klee, C. B. (1982) *FEBS Lett.* **150**, 314-318.
 42. Kennedy, M. T., Brockman, H., and Rusnak, F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 26517-26521.
 43. Sugimoto, M., Matsui, H., Etoh, S., Shimizu, T., Nishio, H., Moia, L. J. M. P., Tokuda, M., Itano, T., Takenaka, I., and Hatase, O. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1476-1482.
 44. Miyamoto, K., Matsui, H., Tomizawa, K., Kuwata, Y., Itano, T., Tokuda, M., and Hatase, O. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1275-1283.
 45. Porzio, M. A., and Pearson, A. M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **490**, 27-34.
 46. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
 47. Oakley, B. R., Kirsch, D. R., and Morris, N. R. (1980) *Anal. Biochem.* **105**,

361-363.

48. Mozdzanowski, J., Best, S., and Speicher, D. W. (1995) in *Current Protocols in Protein Science*, pp. 10.14.11-30, John Wiley & Sons, Inc., New York
49. Cameron, A. M., Nucifora, F. C., Jr., Fung, E. T., Livingston, D. J., Aldape, R. A., Ross, C. A., and Snyder, S. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27582-27588.
50. Senba, S., Eto, M., and Yazawa, M. (1999) *J. Biochem.* **125**, 354-362.
51. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125-8148.
52. Mueller, L., Cordes, V. C., Bischoff, F. R., and Ponstingl, H. (1998) *FEBS Lett.* **427**, 330-336.
53. Davis, L. I. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 865-896.
54. Beddow, A. L., Richards, S. A., Orem, N. R., and Macara, I. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3328-3332.
55. Coutavas, E. E., Hsieh, C. M., Ren, M., Drivas, G. T., Rush, M. G., and D'Eustachio, P. D. (1994) *Mamm. Genome* **5**, 623-628.
56. Kierszenbaum, A. L., Gil, M., Rivkin, E., and Tres, L. L. (2002) *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 131-140.
57. Lindsay, M. E., Holaska, J. M., Welch, K., Paschal, B. M., and Macara, I. G. (2001) *J. Cell. Biol.* **153**, 1391-1402.
58. Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F. R., Petosa, C., Mattaj, I. W., and Kutay, U. (2001) *Embo Rep.* **2**, 926-932.

謝辞

本研究は、北海道大学大学院 理学研究科化学専攻 矢澤道生教授の御指導の元で行われました。本研究の機会を与えていただき、実験研究について終始、直接の御指導、御鞭撻いただいたことに深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、激励、御助言くださいました盛田フミ教授（現酪農大学）に謹んで感謝いたします。

本研究論文の発表にあたり、御助言、御指導をいただきました北海道大学大学院 理学研究科化学専攻 谷口和彌教授、北海道大学 遺伝子病制御研究所 情報調節分野 菊池九二三教授に深く感謝いたします。

本研究について、御指導、御助言をいただきました加藤剛志博士（現旭川医科大学助教授）、高橋正行助教授、江藤真澄博士（現バージニア大学助教授）、湯浅創博士（現高知大学助手）に心より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、貴重な御助言を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所島礼助教授、遺伝子実験に関して有意義な御指導、御助言していただいた杉本和則教授にお礼申し上げます。

アミノ酸配列分析に御尽力いただきました松本弘子氏、阿部勇吉氏、ホタテガイを御供与くださいました北海道立中央水産試験場の伊藤義三博士、宮園章氏に感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験技術を御指導いただきました瓜生匡秀博士、喜怒哀楽を共にしたチームカルシニューリンの飯島昌彦君、岩瀬正則君、笠谷圭吾君、山下祐理子さんをはじめとする、生物有機化学研究室の皆様心から感謝いたします。

最後に、筆者に理解を示し、長きに渡って御援助いただきました筆者の家族に感謝いたします。