

氏名	寺 見 浩 美
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	理 学
学位授与番号	博甲第2364号
学位授与の日付	平成14年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular studies on body-wall and pharyngeal troponin C isoforms in <i>Caenorhabditis elegans</i> (線虫の体壁筋型および咽頭筋型トロポニンCの分子生物学的解析)
論文審査委員	教授 香川 弘昭 教授 鎌田 堯 教授 酒井 正樹

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

トロポニンC(TnC)は、トロポニンI、Tと複合体を形成し、Ca²⁺濃度に応じて筋収縮を調節する。TnCは4つのCa²⁺結合モチーフを持ち、N末端側からサイトI、II、III、IVと呼ばれる。線虫のTnC遺伝子(*tnc-1/pat-10*)は、胚致死変異*pat-10(st568)*と同一遺伝子座に位置づけられ、*pat-10(st568)*変異体のTnCにはサイトIIのアミノ酸置換(D64N)と、C末端Hヘリックスの欠失が起きていた。

本研究では、変異TnCの胚発生致死の原因を分子レベルで調べるため、*pat-10(st568)*変異に2ヶ所ある塩基置換のうちそれぞれ一つを持つTnC発現プラスミドを*in vitro*変異導入により作製した。大腸菌で産生した変異TnCをSDS-PAGE及びWestern解析で調べたところ、変異TnCはサイトIIのアミノ酸置換(D64N)によりCa²⁺濃度に応じた構造変化をしなくなり、Hヘリックスの欠失によりTnIと結合しなくなった。個体レベルで解析を行うため、2つの変異TnCをコードするベクターを*pat-10(st568)*変異体に微注入し、得られた形質転換体を観察した。アミノ酸置換(D64N)を持つTnC形質転換体は正常に発生したが、Hヘリックスが欠失したTnC形質転換体は胚発生致死となり、TnIとTnCの相互作用が筋形成に必須であることが示唆された。

新たに同定したTnC遺伝子*tnc-2*の*lacZ*と*gfp*との融合遺伝子は咽頭筋で発現した。*tnc-2*の発現をRNAiにより阻害した線虫は幼生致死となり、体壁筋と咽頭筋のTnCはいずれも筋形成に必須であることが示唆された。咽頭筋型と体壁筋型のTnCの互換性を調べるため、TnCを異所的に発現させた形質転換体の表現型を解析した。咽頭筋型TnCは体壁筋で部分的に機能したが、体壁筋型TnCは咽頭筋では機能しなかった。

本研究は全生物で初めてのTnC変異体の解析例であり、筋タンパク質の分子間相互作用を個体の胚発生や筋収縮と関係づける系を確立した。

論文審査結果の要旨

本論文は線虫のトロポニンCについて、蛋白質レベルの変化が個体レベルにどのように影響するかを解析した。*pat-10(st568)*変異に2ヶ所ある置換のそれぞれ一つを持つ発現プラスミドを*in vitro*変異導入により作製した。大腸菌で産生した蛋白質をSDS-PAGE及びWestern解析で調べ、変異TnCはサイトIIのアミノ酸置換 (D64N)によりCa²⁺濃度に応じた構造変化をしなくなり、Hヘリックスの欠失によりTnIと結合しない事を見いだした。2つの変異TnCをコードするベクターを*pat-10(st568)*変異体に微注入し、得られたアミノ酸置換 (D64N)を持つTnC形質転換体は正常に発生したが、Hヘリックスが欠失したTnC形質転換体は胚発生致死となり、TnIとTnCの相互作用が筋形成に必須であることを示した。また、新たに同定したTnC遺伝子*tnc-2*の*lacZ/gfp*との融合遺伝子を解析して咽頭筋型であることを見だし、RNAi法の解析により、体壁筋と咽頭筋のTnCはいずれも筋形成に必須であることを示した。また、咽頭筋型と体壁筋型のTnCの互換性を調べるため、2つのTnCを異所的に発現させた形質転換体の表現型を解析して、咽頭筋型TnCは体壁筋で部分的に機能したが、体壁筋型TnCは咽頭筋では機能しない事を見いだした。以上の成果は全生物で初めてのトロポニンC変異体の解析例であり、個体の胚発生と筋収縮と関係づける系を確立し、今後の研究に与える貢献が大なるので、本学自然科学研究科の学位論文に値すると判定した。