

氏名	安 達 良 太		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	理 学		
学位授与番号	博乙第3880号		
学位授与の日付	平成15年 9月30日		
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)		
学位論文の題目	Revertant analysis on the functional domains of the ryanodine receptor in <i>Caenorhabditis elegans</i> (線虫リアノジン受容体遺伝子の復帰変異体の解析による リアノジン受容体機能部位の同定)		
論文審査委員	教授 香川 弘昭	教授 中島 秀明	教授 鎌田 堯

#### 学位論文内容の要旨

リアノジン受容体は筋収縮や受精、発生に必要な  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネルで、機能を修飾する分子や  $\text{Ca}^{2+}$ 結合領域などの機能部位の生化学的な研究が多く行われている。線虫 *C.エレガンス*ではただ一つのリアノジン受容体が主に筋肉組織で機能している。哺乳類では筋型のアイソフォームを欠くと胚の時期あるいは生後すぐに死んでしまうが、線虫の欠損変異体は運動不良になっても死なないため、線虫はリアノジン受容体の  $\text{Ca}^{2+}$ 伝達機構に関連する詳細な機能の解析に優れたモデル系であると考え、遺伝学的手法を用いて研究した。運動不良を示す欠損変異 *unc-68(e540)*体と麻酔薬ケタミン応答異常を示す点突然変異 *unc-68(kh30)*体から復帰変異体をそれぞれ単離し解析した。

*unc-68(e540)*から単離した復帰変異体は、運動能は回復したが産卵数は回復しなかった。RT-PCRの結果、復帰変異体のリアノジン受容体遺伝子 *unc-68* のイントロン 21 のスプライス異常が明らかとなり、復帰変異体のリアノジン受容体に余分な 15 アミノ酸が付加していた。抗リアノジン受容体抗体を用いたウェスタン解析では野生型とほぼ同じ分子量のリアノジン受容体が確認できたため、エクソン 22 以降は正常に翻訳されていると考えられる。エクソン 21、22 の領域は多くの生物種のリアノジン受容体に保存されている4つの RyR ドメインの3番目に相当する。このドメインの機能については今まで報告されていないが、復帰変異体の表現型から産卵あるいは胚の発生に必要な部位であると考えられる。

また *unc-68(kh30)*から単離したケタミン応答性が回復する復帰変異体について、カフェイン、リアノジン、レバミソール、ウワバインを用いて応答性を調べ、復帰変異が  $\text{Ca}^{2+}$ 伝達機構のどの位置に生じたのかを考察した。5系統の復帰変異体のうち薬剤応答性から2系統はリアノジン受容体の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の修飾に関与し、1系統はケタミン以外の薬剤に対する応答が *unc-68(kh30)*と同じであることから、リアノジン受容体のケタミン応答に関与していると考えた。また別の1系統である *kh52* は *unc-68* と細胞膜上の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルをコードする *unc-36* の二重変異体と似た表現型を示したことから、細胞膜上のチャネルに変異が生じたものと推定し、この変異遺伝子を X 染色体右腕にマッピングした。

リアノジン受容体の胚発生に関わる機能部位の記述は本研究が全生物を通して初めてである。また薬剤応答の異なる復帰変異体は原因遺伝子を同定することにより機能部位や相互作用する分子の推定に役立つ。

## 論文審査結果の要旨

リアノジン受容体は5千アミノ酸から成り、筋収縮や受精、発生に必要な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルで、線虫から哺乳類まで存在する。本研究では遺伝学的手法を用いて、生理機能や薬剤に対する応答性を解析した。

欠損変異 *unc-68(e540)* 体から単離した復帰変異体は、運動能は回復したが産卵数は回復しなかった。RT-PCR の結果、復帰変異体のリアノジン受容体遺伝子 *unc-68* のスプライス異常が明かとなり、復帰変異体のリアノジン受容体に余分な 15 アミノ酸が付加していた。抗リアノジン受容体抗体を用いたウェスタン解析でも野生型とほぼ同じ分子量のリアノジン受容体を確認した。エクソン 21、22 の領域は多くの生物種のリアノジン受容体に保存されている4つの RyR ドメインの3番目に相当し、産卵あるいは胚発生に必要な部位であると考えられる。

ケタミン応答異常変異 *unc-68(kh30)* 体から単離した復帰変異体について、カフェイン、リアノジン、レバミソール、ウワバインを用いて応答性を調べ、復帰変異が  $\text{Ca}^{2+}$  伝達過程のどの段階に生じたのかを解析した。5系統の復帰変異体のうち薬剤応答性から2系統はリアノジン受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の修飾に、1系統はリアノジン受容体のケタミン応答に関与していることがわかった。別の系統 *kh52* は *unc-68* と細胞膜上の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルをコードする *unc-36* の二重変異体と似た表現型を示したことから、細胞膜上のチャネルに変異が生じたものと推定し、この変異遺伝子を X 染色体右腕にマッピングした。

本研究はリアノジン受容体の胚発生に関わる機能部位について全生物を通して初めて同定し、薬剤応答の異なる復帰変異体は機能部位や相互作用する分子の推定に役立つので、本学学位規定により、博士（理学）の学位に値すると判定した。