

# 論文審査の結果の要旨

氏名 森田 明典

本論文は、細胞死指標タンパク質となり得る可能性が示唆されていた放射線誘導タンパク質p41の生成機構の研究について述べられている。

p41は、放射線高感受性のヒトT細胞性白血病細胞株MOLT-4に、X線10Gy照射6時間後から、銀染色した2次元電気泳動ゲルに検出されるようになる分子量41kDa、等電点4.0のタンパク質である。p41のマイクロシーケンスに基づいて作成されたウサギ抗合成ペプチド抗体AM-1によるイムノブロッティングの結果、p41と共に反応し、非照射、照射に関わらず検出される分子量42kDa、等電点4.1のタンパク質p42が新たに見出されていた。

所属研究室で見出されていたp41に関する以上の結果をふまえ、本研究では、p41とp42の関係について研究を進め、p41生成の分子機構を明らかにすることを目標とし、まずX線10Gy照射18時間後のMOLT-4細胞抽出液から精製、分離したp41、p42に対しN末端シーケンスを行った。

p41、p42のN末端シーケンスの結果、p42は白血病細胞の転座点の解析から見出され、がん遺伝子の可能性が示唆されていたSET $\beta$ であること、p41は、SET $\beta$ のN末端から18番目のアスパラギン酸残基のC末端側切断産物であることが明らかになった。このAsp-C切断性は、アポトーシス実行の担い手とされるシステインプロテアーゼ、カスパーゼに特徴的な基質特異性であることから、照射後、p42が活性化したカスパーゼによる切断を受け、p41に変換されるという分子機構が想定された。また、得られたシーケンス結果に基づき、前述のAM-1抗体に加え、p41、p42の検出に有効な3種の抗ペプチド抗体が新たに作成された。

具体的には、p41とp42両方に反応するよう設計したSET $\beta$ <sup>13-28</sup>ペプチド、p42、p41それぞれに特異的に反応するよう設計したN末端部ペプチド（それぞれSET $\beta$ <sup>3-14</sup>、p41<sup>1-10</sup>）をウサギに免疫することにより、抗血清を作成、それぞれの抗原ペプチドカラムによりアフィニティー精製抗体AM-2、-3、-4を得た。なかでもp41特異的抗体AM-4は、アフィニティー精製画分を、更に非切断p42に相当するSET $\beta$ <sup>13-28</sup>ペプチドカラムに通し、p42反応抗体を吸着除去することによりp41反応抗体のみを分離、精製した特殊抗体であり、2次元電気泳動を経ず、1次元の電気泳動（SDS-PAGE）で、p41を検出することが可能な抗体である。イムノブロッティングの結果、計画当初の構想通り、AM-2抗体はAM-1抗体と同様、p41とp42の両方に反応し、AM-3、AM-4抗体はそれぞれp42、p41のみに反応することが、MOLT-4細胞のp41、p42、およびリコンビナントp41、p42を用いて明らかとなり、これら部位特異的抗体によりN末端シーケンス結果を裏付けるイムノブロッティング反応性が示された。

更に、p42切断プロテアーゼの性質を検討するため、カスパーゼ活性や活性化を阻害することが知られていたカスパーゼ阻害剤処理や*bcl-2*遺伝子導入による照射MOLT-4細胞のp42切断阻害効果を調べた。その結果、*bcl-2*遺伝子導入、あるいはカスパーゼ阻害剤を照射後に添加することにより、p42切断および照射後のMOLT-4細胞死が抑制された。これらの結果から、p42切断プロテアーゼおよびMOLT-4放射線細胞死にはカスパーゼが関与していることが示された。

また、リコンビナントp42を作製し、アポトーシスのエフェクターとされるカスパーゼ-3、-6、-7のp42に対する切断活性を*In vitro*で検討し、p42が、カスパーゼ-7に特に切断の感受性が高いことが判明、p42は主としてカスパーゼ-7によって切断されていると結論された。

本研究ではp42/SET $\beta$ がカスパーゼファミリーメンバーの新規基質となることを明らかにした。SET $\beta$ は白血病細胞の転座点の解析から見出され、がん遺伝子の可能性があり、また複製の開始に必要な因子として提示され、クロマチンリモデリング活性、転写との関連が示されているが、本研究では新たに細胞死における関与の可能性を示した。

なお、本研究は、鈴木 紀夫、松本 義久、平野 和也、榎本 敦、朱 瑾、酒井 一夫との共同研究であるが、照射MOLT-4細胞から精製、分離したp41、p42のN末端シーケンスにはじまり、抗体の作成、p42切断プロテアーゼの同定に至るまで本論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断し、博士（理学）の学位の授与を認める。