

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 秦 勝 志

本論文は、細胞内カルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインの生理機能解明を目的とした解析結果について述べたものである。

第一章では、研究の背景、目的を概説した。カルパインは細胞内で厳密に活性が制御されており、その制御機構が崩れると筋ジストロフィー症、アルツハイマー病、Ⅱ型糖尿病などの重大な疾患を引き起こす一要因となることを過去の知見に基づき説明した上で、カルパインの機能の生体内における重要性を述べた。一方で、生体内における重要性が故に、カルパインの具体的な生理機能解明が遅れている現状を述べた上で、近年同定された組織特異的に発現するカルパインが特定の組織に限定した生理機能解明に有効な材料であると指摘した。そして最後に、生体の維持に必須な消化器系組織である胃における生理機能解明を目的として、胃特異的に発現するカルパイン（nCL-2、nCL-2'）の解析を行った経緯について述べた。

第二章ならびに第三章では、本解析を行うための実検材料及び遺伝学的、生化学的、組織学的実験手法について述べた。

第四章では、nCL-2及びnCL-2'の生化学的、組織学的、遺伝学的解析の結果及び考察を示した。まず生化学的解析の項では、カルパインでは困難とされている大腸菌発現系による両分子の発現・精製を成功させてin vitroでの解析を可能とした上で、酵素学的性質を明らかにした。中でも、一次構造上カルシウム結合領域を含まないはずのnCL-2'がカルシウム依存的活性を示したことから、プロテアーゼ領域にもカルシウムが結合してカルパインの活性を制御している可能性を示した。その他、活性化に必要なカルシウム濃度、細胞内局在の差異を明らかにすることで、両分子の異なる活性化機構ならびに細胞内における機能の可能性も示した。

第二に組織学的解析の項では、ラット胃切片を用いた免疫染色によりnCL-2、nCL-2'が胃粘膜の被蓋上皮細胞（粘液分泌細胞）に局在することを明らかにし、その細胞の性質から両分子が被蓋上皮細胞の移動に関与する可能性について示した。また、組織普遍的に発現するカルパイン（ $\mu$ -カルパイン、m-カルパイン）の局在がそれぞれ胃粘膜の壁細胞（胃酸分泌細胞）そして筋層であることも明らかにすることで、これらのカルパイン分子が胃において機能分担していることも明確にした。

第三に遺伝学的解析の項では、nCL-2、nCL-2'の胃特異的発現機構及び具体的な生理機能解明を目的としたマウスnCL-2/2'遺伝子のクローニング、ターゲティングマウス作製について述べた。遺伝子スクリーニングの結果、全長約50kb、23エクソンからなるnCL-2/2'遺伝子（*Capn8*）を同定した。また5'側上流領域の塩基配列解析の結果、TATA-box、GC-box、CRE（cAMP-responsive-

element) の他に、転写因子GATA-4及びGATA-6のコンセンサス結合配列と考えられる領域を見出した。GATA-4及びGATA-6は、zinc-fingerドメインを持つDNA結合蛋白質GATAファミリーに属し、胃特異的に発現しH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseなどの遺伝子の転写調節を行っている。またCREB (CRE binding protein) はGC-box結合因子であるSp1と共に、ヒスタミン(胃酸分泌刺激ホルモン)分泌制御因子chromogranin Aの遺伝子転写制御を行うことが知られている。以上の結果から、nCL-2及びnCL-2'の発現がこれらの因子によって胃特異的に制御されている可能性を示した。そしてターゲティングマウス作製については、プロテアーゼ活性に焦点を当てた機能解析を目的としてnCL-2及びnCL-2'活性中心変異体を発現するマウスの作製を行ったことについて述べた。Capn8のエクソン3~5を含む約6.3kbの領域を組換え領域に設定し、エクソン3上にコードされている活性中心残基Cys105部分がSerをコードするように変異させることでターゲティングベクターを構築した。相同組換えESクローンの取得、キメラマウス及びヘテロマウス作製までの結果について示した上で、これまでの過程において作製したマウスに外見上異常が見られないことを示した。

第五章では、本研究を総括すると共に、今後の研究について展望した。

以上、本論文は、胃特異的カルパインnCL-2、nCL-2'の多方面からの解析により、胃におけるカルパインの生理機能の全容解明に向けた多くの知見と進展を与えたもので、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値のあるものと認めた。