

論文審査の結果の要旨

氏名 中川 和博

本論文は全六章からなる。第一章は序論であり、本論文の研究対象であるタンパク質分解酵素カルパインについてのこれまでの知見と、本研究の目的が述べられている。第二章には本論文で用いられた実験材料、第三章には実験方法が記述されている。第四章では本論文の結果が述べられており、カルパインの活性化と自己消化やサブユニット解離といった構造変化の起こる順序を明らかとし、自己消化やサブユニット解離によるプロテアーゼとしての性質の変化について解析が行われている。第五章では本研究の結果をもとに、細胞内におけるカルパインの活性化機構と基質選別機構について考察されている。第六章には、引用された論文が記述されている。

カルパインは Ca^{2+} によって活性化される細胞質内プロテアーゼであり、基質の機能・寿命を調節するモジュレーター分子である。しかしその詳細は明確でなく、カルパイン分子種として最も研究されている m -、 μ -カルパインについても、活性化機構についての知見が乏しく、また、基質特異性のメカニズムは不明で、生理的基質に関してもほとんど知見がない。

m -、 μ -カルパインは活性サブユニット(80K)と調節サブユニット(30K)のヘテロダイマーからなり、80K N 末端の自己消化や両サブユニットの解離等が活性化機構として提案されていたが、それらが活性化に必要なとの報告も存在し、活性化との関係は未だ明確でなかった。本論文ではカルパインの活性化と自己消化やサブユニット解離といった構造変化の起こる順序と、自己消化やサブユニット解離によるプロテアーゼとしての性質の変化について解析が行われている。

カルパインの活性化に伴う構造変化を解析するにあたり、 m -カルパインの Ca^{2+} 非存在下での結晶構造が既に明らかとされていた。この m -カルパインの立体構造から、 m -カルパインが Ca^{2+} 非存在下で活性が存在しないのは、活性中心が形成されていないためであることが示された。活性ドメインが 2 つのサブドメインに分かれており、活性中心を形成する Cys と Asn、His が離れていることが明らかとされた。 Ca^{2+} 存在下では 2 つのサブドメインが接近し、活性中心を形成すると予想された。また、自己消化を受ける 80K N 末端(ドメイン I)は、30K

と相互作用していることが明らかとされた。ドメイン I が 30K と相互作用していることから、自己消化によるドメイン I の切断が、30K とのヘテロダイマー形成、更にはサブユニット解離に影響を与えることが予想された。

第四章では、ドメイン I の自己消化とサブユニット解離、更にはカルパイン活性化との関係を明らかとするため、自己消化型と同様に m-カルパインのドメイン I を 9 アミノ酸残基または 19 アミノ酸残基欠失させた自己消化型変異体 m Δ 9、m Δ 19 と、30K との相互作用に重要であると考えられたアミノ酸残基に変異を導入した相互作用部位変異体を作製し、それらの性質を解析している。m-カルパインの Ca²⁺非存在下での結晶構造から、ドメイン I の Lys7 と Arg12 がそれぞれ、30K が 5 つ持つ Ca²⁺結合モチーフ EF-ハンドに存在する Asp154 と Glu260 と塩橋を形成していることが示唆されたため、Lys7 や Arg12 を Leu に置換した mK7L、mR12L、mK7L:R12L を相互作用部位変異体として作製している。

サブユニット解離に関する解析では、活性中心の Cys を Ser に置換した不活性型変異との二重変異体を用いて解析を行っている。その結果、m Δ 9 と mK7L は安定にヘテロダイマーを形成し、Ca²⁺存在下でもサブユニットに解離せず、m Δ 19 と mK7L:R12L は Ca²⁺非存在下においても安定にヘテロダイマーを形成できないことが明らかとなった。m-カルパインはドメイン I が 19 アミノ酸残基まで自己消化し、ドメイン I と 30K 間の塩橋が共に失われると、安定にヘテロダイマーを形成できずサブユニットに解離することが示唆された。また、mR12L は Ca²⁺非存在下では安定にヘテロダイマーを形成したが、Ca²⁺依存的にサブユニットに解離したことから、ドメイン I Lys7 と 30K EF-ハンド間の塩橋は EF-ハンドに Ca²⁺が結合することで破壊されることが示唆された。

次に、ドメイン I の自己消化やサブユニット解離のカルパイン活性化への関与を明らかとするため、ドメイン I 変異体のプロテアーゼ活性発現に必要な Ca²⁺要求性を解析している。結果は、m Δ 9 や mK7L では野生型に比べると Ca²⁺要求性が低下していたが、m Δ 19 や mK7L:R12L では m Δ 9 や mK7L から更なる Ca²⁺要求性の低下は見られなかった。また、Ca²⁺依存的にサブユニットに解離する mR12L の Ca²⁺要求性は野生型と完全に一致したことから、サブユニット解離により Ca²⁺要求性は低下せず、サブユニット解離は活性化には関与しないことが示唆された。また、Ca²⁺要求性が低下する変異体は全て Lys7 と 30K との塩橋が失われた変異体であることから、ドメイン I Lys7 と 30K との塩橋は m-カルパインの活性中心形成を阻害しており、EF-ハンドに Ca²⁺が結合し塩橋が破壊されることで活性中心形成に関与し、ドメイン I の自己消化は m-カルパインの活性化の後に起こることが示唆された。

ドメインIの自己消化やサブユニット解離が活性化の後に起こることが示唆されたため、これらの構造変化によりプロテアーゼとしての性質が変化するかどうかについて、上記の変異体に加え、自己消化部位に変異を導入しドメインIの自己消化のみを抑えた変異体を用いて解析を行っている。これらの変異体の様々な基質への反応性を比較したところ、特定の基質への反応性が異なっていることが明らかとなった。ドメインIの自己消化やサブユニット解離は、m-カルパインの活性化には必要不可欠でないが、これらの構造変化によってプロテアーゼとしての性質が変化する事が示唆された。

また、カルパインの内在性の阻害因子であるカルパスタチンが、カルパイン活性を阻害する機能とは独立にm-カルパインのサブユニット解離を阻害する機能を有していることを明らかとし、カルパスタチンがカルパインの構造変化を制御することで、細胞内においてカルパインの基質特異性決定に関与するというモデルを提案している。

第五章では、本研究から得られた知見とこれまでの知見を総合して、カルパインの活性化機構とそれに伴う構造変化、また、細胞内における基質選別機構について考察がなされている。

なお、本論文の内容は、益本創、反町洋之、鈴木紘一との共同研究であるが、学位申請者である中川和博がその研究を中心的に進めており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。