

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 加藤 昌彦

本研究はアポトーシスにおいて活性化するカルシウム依存性プロテアーゼ μ -カルパインの活性化機構の解明およびアポトーシス実行に重要なプロテアーゼであるカスパーゼ-3 の基質タンパク質解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. アポトーシスにおけるカルパイン阻害タンパク質カルパスタチンの分解

これまでにアポトーシスにおいてカルシウム依存性プロテアーゼ μ -カルパインが活性化することが報告されていた。カルパイン活性化はカルシウムイオンと細胞内在性カルパイン阻害タンパク質であるカルパスタチンによって厳密に調節されている。そこで本研究では、アポトーシスでの μ -カルパイン活性化機構の詳細を解明する目的で、カルパスタチンの挙動についての解析を試みた。その結果、抗 Fas 抗体によるヒト T リンパ球細胞 Jurkat のアポトーシスにおいてカルパスタチンはカスパーゼ-3 様プロテアーゼによって分解されることが明らかとなった。この分解によって細胞内のカルパスタチン量が減少し、そのカルパイン阻害活性も低下していることが示唆された。アポトーシスにおいて μ -カルパインはカルパスタチンが分解された後に活性化することから、カルパスタチン分解が μ -カルパイン活性化の一因であると考えられた。

2. 切断部位特異抗体によるカスパーゼ-3 基質タンパク質の解析

アポトーシス実行に関与するカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-7 (以下カスパーゼ-3 で代表する) は基質タンパク質に存在する DXXD 配列を主に切断する。この切断によって基質タンパク質の N 末端側切断断片には DXXD-COOH という新たな C 末端配列が露出される。本研究では、この

切断によって生じる C 末端配列に反応する抗体を用いてカスパーゼ-3 の基質検索を試みた。その結果、今回新規カスパーゼ-3 基質タンパク質として非骨格筋型ミオシン重鎖 (A 型) と DNA 依存性プロテインキナーゼの構成要素である Ku80 を同定した。また、同定した基質タンパク質の切断部位を抗体と合成ペプチドを用いて決定した。

以上、本研究はアポトーシスにおいて μ -カルパインの活性化に先んじて阻害タンパク質であるカルパスタチンが分解されることを明らかにし、この分解が μ -カルパイン活性化に関与している可能性を見出した。更に、アポトーシス実行に重要な役割を果たすプロテアーゼであるカスパーゼ-3 の新規基質タンパク質を同定した。アポトーシスにはカスパーゼを始めとする種々のプロテアーゼが関与する。よって、本研究で行われたアポトーシスにおけるプロテアーゼ活性化機構の解析やプロテアーゼの基質タンパク質解析はアポトーシスのメカニズムを解明する上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。