

[別 紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 池 順 姫

本研究は、Ca²⁺/calmodulin 依存性 serine/threonine phosphatase である calcineurin が神経細胞において apoptosis を誘導するか否か、また、もし apoptosis を誘導するならばそれはどのような機序によるのかを明らかにするため、calcineurin の catalytic subunit A を adenovirus vector に組み込んで、神経細胞あるいは非神経細胞に導入し発現させ、calcineurin の恒常的な発現による細胞の変化を解析したものであり、下記の結果を得ている。

Calcineurin の恒常的な発現により初代培養神経細胞あるいは神経細胞に分化した PC12 細胞でアポトーシスが誘導された。また、これらのアポトーシスはミトコンドリアからの cytochrome c の放出および caspase-3 の活性化を伴うアポトーシスであることが明らかになった。このアポトーシスは caspase-3 の阻害剤である DEVD-CHO あるいは Bcl-2、CrmA の高発現により抑制された。さらに、calcineurin によるアポトーシス誘導の機序を詳細に調べるために、U87 グリオーマ細胞あるいは mouse embryonic fibroblast (MEF) において calcineurin を強制発現させると野生型 p53 タンパク質の蓄積が認められ、引き続いてアポトーシスが誘導された。U87 細胞に dominant negative p53 mutant cDNA を導入するとこのアポトーシスが抑制された。さらに、p53 ノックアウトマウスから作製した MEF では calcineurin の強制発現によるアポトーシスは著明に抑制された。また、Ser-15

のリン酸化型 p53 に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて Western blot を行なうと、calcineurin の強制発現により蓄積してきているのは Ser-15 のリン酸化型 p53 であることが明らかとなった。Ser-15 のリン酸化により p53 は ubiquitin E3 ligase である MDM-2 と結合できずに分解されずに安定化すると考えられている。

以上、本論文は calcineurin の恒常的な発現による細胞の変化の解析から、calcineurin は p53 の Ser-15 のリン酸化による p53 の安定化を介して、その下流の cytochrome c の放出、caspase-3 の活性化を介してアポトーシスを誘導している事を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、calcineurin による神経細胞死、そしてそのメカニズムの解明に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。