

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川畑 順子

カルパインは、ある種の細菌から哺乳類の広い生物種に存在する、Ca²⁺によって活性化されるシステインプロテアーゼである。外界からの刺激に対応して細胞内のタンパク質を限定分解し、その機能を調節する「モジュレータープロテアーゼ」であると考えられ、カルパイン分子の活性異常によって引き起こされる疾病として筋ジストロフィー、神経変成、腫瘍形成が報告されているが、生物学的な生理機能や具体的な基質分子に関しては未解明の点が多い。

本論文では、疾患との関連性が明らかなカルパイン分子、すなわち肢帯型筋ジストロフィー-2A型 (LGMD2A) の責任遺伝子産物である骨格筋特異的カルパイン p94 (カルパイン 3) に着目し、その性質と機能の解析を行った。

序論では、これまでに解明された p94 の生化学的性質、及び LGMD2A との関連について概説した。

第一章では、p94 の解析に最適なモデル動物の系、p94:C129S ノックインマウスの作成を行った。LGMD2A 患者で見られる p94 遺伝子変異は 100 種類以上に及ぶが、いくつかの変異体に共通した性質は基質切断活性であり、p94 のプロテアーゼ活性の欠失が LGMD2A 発症の要因となると考えられている。骨格筋の機能維持に必須な p94 の機能を分子レベルで明らかにし、LGMD2A の発症機序を解析することを目的とし、p94 不活性型変異体 p94:C129S のみを発現するノックインマウスの設計、作成を行った。その結果、目的のマウスの系を確立することに成功した。

第二章では、ES 細胞の *in vitro* 分化系を用いて筋細胞発生の初期段階における p94 の機能を解析した。不活性型変異体 p94:C129S のみを発現するホモ接合体 ES 細胞を作成し、ハンギングドロップ法で各種筋細胞へ分化させ、その過程を野生型 ES 細胞と比較した。両者とも心筋、平滑筋、骨格筋細胞を形成し、分化の時期や筋細胞種の割合などに相違は認められず、p94 の活性が骨格筋の初期発生には必ずしも必要ではなく、成熟骨格筋において重要な働きを持つことが示された。このことは、分化過程の ES 細胞における p94 遺伝子転写産物量を定量した結果、細胞同士が融合し、骨格筋特有の多核の筋管細胞が形成される時期から p94 遺伝子の転写量が増加することからも支持された。また、この時期に p94:C129S のみを発現する細胞では野生型よりも p94 遺伝子転写産物量が多く、p94 の活性が自身の転写を負に制御するフィードバック機構の存在が示された。

第三章では、p94 新規スプライスバリエーションの同定を行った。骨格筋特異的分子種として発見された p94 であるが、その後いくつかのスプライスバリエーションが骨格筋以外の組織で発現することが明らかにされ、また造血器官で p94 遺伝子産物が機能することが示唆されていたことから、p94 遺伝子の発現様式を詳細に解明することが必要とされていた。そこで、

フレンド白血病細胞で発現する p94 転写産物を探索した結果、新規の 5' UTR を持つスプライスバリエントの同定に成功した。新規バリエントは、ゲノム上流に位置する α グルコシダーゼ遺伝子の下流エクソンを使用した非常にユニークな構造をとることが判明した。この構造をもつ遺伝子は、組織普遍的に発現することが明らかとなったが、特に造血、免疫組織で発現量が多く、これらの器官で重要な機能を持つ可能性が示された。

以上、本論文は、骨格筋の生理機能に必須の役割を持つカルパイン p94 について、有用な実験系となるモデル動物の確立に成功し、その解析を行うにあたり重要な知見となるスプライスバリエントの同定とその発現機構について解明したものであり、学術上、また、LGMD2A の治療法開発等の応用上貢献するところが少なくない。よって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あるものと認めた。