

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 木村映一

カルパインは Ca^{2+} 依存的に活性を発現するシステインプロテアーゼである。ヒトでは 14 種類のホモログが存在し、細胞内で基質を限定分解することにより、分化、増殖、細胞形態、アポトーシスなど様々な細胞機能に関与する。しかし細胞内での実際の基質や複数の基質の選択機構については不明な点が多い。本研究ではカルパインホモログの中で最も組織普遍的発現を示す、 μ -カルパインに焦点をあてて、これらの点を考察した。 μ -カルパインの新規相互作用タンパク質を同定し、その相互作用様式を解析することで、従来とは違った観点からカルパインの生理機能にアプローチした。

序論において本研究の背景と意義について概説した後、第一章では、酵母ツーハイブリッド系を用い、 μ -カルパイン活性サブユニットを 4 つのドメインに分けて相互作用するタンパク質のスクリーニングを行なった。その結果、自己消化を受けるドメイン I に相互作用する新規分子として、FHL2、FHL3、Mi-2 の 3 種類を同定した。触媒活性をもつドメイン II、C2 様 Ca^{2+} 結合構造をもつドメイン III に相互作用する分子は同定されなかった。また、5 つの EF ハンド構造をもつドメイン IV に相互作用する分子として、カルパイン調節サブユニットに加え、ヘテロ核リボ核タンパク質(hnRNP) K、hnRNP R、mortalin の 3 種類の新規分子を同定した。

第二章ではドメイン IV 相互作用タンパク質についての解析を行った。まず第一章で同定した 3 種類の分子が μ -カルパインの基質となるかどうかを検討した結果、hnRNP K、hnRNP R は基質となるが、mortalin はならないことが判明した。hnRNP K は hnRNP R よりもよい基質であったため、hnRNP K についてさらに解析を進めた。他のカルパインの EF ハンドドメインと hnRNP K との相互作用を解析した結果、ツーハイブリッド系においては hnRNP K は μ -カルパインに特異的であることが明らかとなった。次に μ -カルパインに相互作用する hnRNP K の領域を解析した結果、スクリーニングで得られた hnRNP K の領域がほぼ必要十分であり、その領域を少し短縮しただけで相互作用が弱くなることが判明した。よって、KH2 ドメインと C 末端側の 2 箇所の領域の重要性が明らかとなった。

第三章では細胞内における μ -カルパインと hnRNP K の関係を解析した。実際に hnRNP K と μ -カルパインが細胞内で相互作用するかどうかを、両者を共発現させた COS 細胞の免疫蛍光染色によって調べた。その結果、hnRNP K は主に核に局在しているが、 μ -カルパインと hnRNP K が共発現している細胞では、hnRNP K は核と細胞質の両方に存在しており、両者が細胞質において相互作用し得ることが明らかとなった。さらに細胞内においても hnRNP K が μ -カルパイン

の基質となるかどうかを調べた。Ca²⁺特異的イオノフォアで COS 細胞を刺激した結果、μ-カルパインによる hnRNP K の分解断片が生成したことから、細胞内においても hnRNP K がμ-カルパインの基質となる可能性が強く示唆された。またこの分解断片は、μ-カルパインと強く結合する領域であると推定され、細胞内において生成した hnRNP 切断産物とμ-カルパインが相互作用することが示唆された。hnRNP K は様々なタンパク質を結合し、これらが相互作用するための場を提供する足場タンパク質であることが報告されており、μ-カルパインも hnRNP K を足場として利用することにより基質を選別して切断するという基質選択機構の可能性が示された。

以上、本論文はμ-カルパインの新規相互作用タンパク質を複数同定し、その中でも hnRNP K が細胞内においてμ-カルパインの基質となることを見いだして、切断を受けた hnRNP K を介したμ-カルパインの基質選別機構の存在を示唆したもので、学術上、応用上貢献するところが少ない。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。