

1. 課程・論文博士の別 論文博士
2. 申請者氏名(ふりがな) 山口 光峰(やまぐち みつね)
3. 学位の種類 博士(薬学)
4. 学位記番号 博薬 第 15935 号
5. 学位授与年月日 平成15年 3月10日
6. 論文題目 単球系腫瘍細胞に存在するグリセルアルデヒド-3-
リン酸脱水素酵素の効率的な分解系に関する研究
7. 審査委員会委員 (主査) 東京大学 教 授 入村 達郎
教 授 堅田 利明
教 授 関水 和久
教 授 三浦 正幸
講 師 東 伸昭
8. 提出ファイルの仕様等

使用文書ファイル 山口光峰 審査結果.pdf

Adobe Acrobat

Mac OS 9.2

審査の結果の要旨

氏 名 山口 光峰

グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) はグリセルアルデヒド-3-リン酸から 1,3-ビスホスホグリセリン酸への反応を触媒する酵素として、解糖経路の要である。チューブリンの重合、膜融合、転写因子の調節などにも関与する多機能酵素でもあることが最近判明した。アポトーシス誘起過程で増減することも示され、細胞内 GAPDH 含量の変動が様々な細胞機能に影響を与えることが提案されはじめている。この酵素の細胞内レベルは生成と分解によって調節されるが、学位申請者は分解経路に注目した。GAPDH はシャペロン介在性オートファジーによって分解されるが、細胞内の GAPDH 含量が他の蛋白質よりも遥かに高いため、これ以外の GAPDH 分解経路があるのではないかと考えた。この推論に至ったのは、細胞内の N 末端アシル化タンパク質の分解に関与するアシルペプチドヒドロラーゼ (ACPH) の阻害剤アセチルロイシンクロロメチルケトン (ALCK) によりヒト単球系 U937 細胞の GAPDH 分解が、シャペロンである hsc73 量が変動すること無く誘導されたことによる。本論文ではまず ALCK により促進される GAPDH の分解のメカニズムを解析する試み、分解に関与する酵素の性状を明らかにする試み、分解経路の生物学的な意義について述べられている。

第一章では、ALCK が白血病細胞株にアポトーシスを誘起することを見だし、その際に細胞内レベルが顕著に減少する蛋白質があることが発見された経緯が述べられている。この分子量 36kDa の蛋白質は ACPH とは異なるので、ユニークな標的分子であると考えてその精製を行い、N 末端のアミノ酸配列解析を行った。その結果、ヒト肝臓由来の cDNA から決定された GAPDH の N 末端付近配列と 100%一致していることが見いだされた。抗 GAPDH モノクローナル抗体を用いた Western blotting 法による GAPDH タンパク質ならびに NADH 生成活性の低下も確認できたことより、ALCK 処理により U937 細胞抽出液中で減少した 36kDa タンパク質は GAPDH であると判明した。ここで認められた GAPDH 分解現象は明らかにシャペロン介在性オートファジーによって行われているとは考えにくく、U937 細胞中にはこれとは異なる GAPDH 分解系が存在することが示唆された。

第二章では、ALCK により促進される GAPDH 分解機序を探るために、GAPDH 活性阻害と分解の経時的変化を観察した結果、酵素活性の阻害が酵素の分解に先行して起こることを明

らかにし、精製した GAPDH を用いて ALCK が直接 GAPDH に影響を与えるか否かを検討した。ALCK による GAPDH の阻害様式は GAP に対しては非拮抗阻害、NAD⁺に対しては拮抗阻害であり、ALCK で GAPDH を処理すると内部蛍光が増加したことなどより ALCK は GAPDH の構造変化を誘起することが示唆された。さらに、ALCK により生じる GAPDH の構造変化はその分解を誘起する上で重要であることを示唆する結果を得た。

第三章では、学位申請者は、ALCK により促進される細胞抽出液中での GAPDH 分解が、セリンプロテアーゼの広域阻害剤である diisofluorophosphate (DFP)の併用で強力に阻害されたため、ALCK 処理 GAPDH の分解には何らかのセリンプロテアーゼが関与することを予想し、これを証明した。すなわち、ALCK 処理 GAPDH を分解する酵素活性は至適 pH が塩基性で幅広く認められることや、GAPDH 中の Trp195-Arg196 間を切断し 23kDa と 17kDa の分解断片を形成することなどを見出した。超高分子量であり、既知のセリンプロテアーゼとは異なる可能性が高く、その精製を試みたが達成されなかった。最後に ALCK により促進される GAPDH 分解系の細胞特異性を検討し、単球系腫瘍細胞である U937 細胞ならびに THP-1 細胞でのみ 23kDa 断片の形成を伴う GAPDH 分解が見られることが示された。

以上の様に、単球系腫瘍細胞中には特徴的な ALCK によって誘導される GAPDH 分解系が存在することが今回の研究で明らかにされた。この GAPDH 分解系の生物学的な意義は明らかでないが、細胞死に伴って起こる可能性、炎症部位で酸化障害時に生成する変性した GAPDH を除去するという可能性などが提案されている。本研究はこれまでほとんど顧みられなかった細胞特異的な GAPDH の調節機構の解明に端緒を開いたものであり、生化学、免疫学の領域で新しい知見を与えるものである。従って、本研究は学位論文として十分な内容を含むと判断し、また本研究を行なった山口光峰は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。