

氏名 Park Min Woo

本論文は5章からなる。第1章 (chapter 1) はイントロダクションであり、カルパインに関する学問的背景と本研究の実験的背景を述べている。具体的には、哺乳類とショウジョウバエのカルパイン系に関する知見、特にこの二つの生物種のカルパイン系の共通点と相違点を述べ、さらに本研究を行う上で参考となるカルパインの構造と生化学的諸性質、及び内在性カルパイン阻害因子 (カルパスタチン) などについて説明している。第2章 (chapter 2) ではショウジョウバエのカルパイン B の基本的な酵素学的性質、及び、基質特異性を検討している。まずカルパイン B を大腸菌で発現・精製する実験系を構築している。次いでカルパイン B の酵素学的性質を検討し、哺乳類の組織普遍的カルパインのひとつである m-カルパインと類似していることを明らかにしている。中でも、活性化に必要なカルシウム濃度と自己消化のパターンの両方が m-カルパインと類似していることは重要である。さらに基質特異性を検討するため、既知の哺乳類カルパイン基質のショウジョウバエホモログに対するカルパイン B の作用を解析している。基質の候補としてショウジョウバエの Atg5, gelsolin, FAK, p35 を選び、GST タグを N 末端に付加して大腸菌で発現させた。これらの融合タンパク質を精製し、カルパイン B を作用させたところ、ショウジョウバエカルパイン B の切断反応によって、哺乳類カルパインが上記基質を切断した場合と同じような断片が生成した。これらの結果から、ショウジョウバエのカルパイン B は哺乳類の m-カルパインと相同な基質特異性を持ち、類似した生理機能を果たしていることを推測している。第3章 (chapter 3) ではショウジョウバエのカルパイン B の二量体形成の可能性と自己消化機構の検討を行っている。哺乳類の組織普遍的カルパインには必須である小サブユニットがショウジョウバエゲノム中に存在しないため、ショウジョウバエのカルパインでは二量体形成によって小サブユニットを代替している可能性が以前は考えられていた。しかし、非変性 PAGE やゲル濾過クロマトグラフィーでの挙動から、カルパイン B は単量体として存在して活性を持つことを示している。さらに、異なるアフィニティータグを付加した2種のカルパイン B を大腸菌の同じ細胞に共発現させ、一方のタグに対する精製をそれぞれ行った結果においても、ホモ二量体を作る相互作用はないことが示されている。また自己消化についても、活性のない変異カルパイン B を、活性をもつカルパイン B と共存させた反応系を用いて検討している。具体的には、活性をもったカルパインと不活性な変異カルパインを1:1の比率で存在させて自己消化反応を行ったとき、変異カルパインの自己消化だけが明らかに遅延することを見い出している。この実験の結果から、カルパイン B の自己消化反応においては、分子内の切断反応が最初に起こり、その後、分子間の

切断反応が起こることを示している。第4章ではカルパインの内在性阻害因子の存在を、ショウジョウバエにおいて検討した。哺乳類カルパスタチンのDNA情報を用いた相同性検索からは、ショウジョウバエのゲノム中に相同遺伝子を見出すことができないため、本研究では、カルパイン阻害活性を生化学的に同定することを試みている。ショウジョウバエ成体から得た粗抽出画分、その熱安定性画分、イオン交換（Qセファロース）及びゲル濾過クロマトグラフィーのそれぞれにおいて、カルパイン活性を阻害する物質を検出しているが、活性の不安定性などにより完全精製には至っていない。しかし、このカルパイン阻害因子の不安定性とゲル濾過における推定分子量(3~8万)から、ショウジョウバエにおいてもカルパインを阻害する内在性タンパク質が存在することを示唆している。第5章（chapter 5）では本論文全体に対する考察を行っている。具体的には、本研究の結論、カルパインの生理機能、これまでのカルパイン研究において不十分であった点などを述べ、本研究を含むショウジョウバエを用いたカルパイン研究の利点に関して考察している。特に本研究から得られた結果として、ショウジョウバエのカルパインBは構造上だけでなく、一般的な性質や基質特異性に関しても哺乳類組織普遍的カルパインに類似しているという結論が強調され、将来の研究方向が示されている。

なお、本論文第2章の一部と第3章は、榎森康文准教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。