

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	中津海洋一
論文題目	caspase-3と caspase-7の活性の差異を決定する機能的立体構造領域の同定と解析		
(論文内容の要旨)			
アポトーシスは生体の恒常性維持に必須な現象である。アポトーシスのシグナル伝達 の中心を担うのは、システインプロテアーゼファミリーに属する caspase ファミリー分 子群である。特に caspase-3 と caspase-7 は caspase シグナル経路の最下流に位置し、 death substrate と呼ばれる様々な基質を切断するアポトーシスの実行因子である。 caspase-3 と caspase-7 はカエルからヒトまでそれぞれ進化的に保存されている分子であ るが、アミノ酸配列の相同性は 54%以上と高く、立体構造の相似性も高い。また機能的 な差異についてもこれまで明確な違いは明らかにされてこなかった。申請者はこれら 2 つの caspase の細胞内における機能の違いと構造との関係を明らかにすることを目的に 研究を行った。そして、細胞内での酵素活性を詳細に測定する実験系を構築して比較し、 また酵素活性の差異と立体構造の差異との相関を解析した。その結果、<i>in vitro</i>での低分 子合成基質の切断活性について caspase-3 の活性は caspase-7 の活性よりも高く、また 細胞内における内在性基質の切断についても caspase-3 の活性は caspase-7 の活性より も高かった。またアポトーシスにともなう DNA の断片化の誘導能についても比較したと ころ、caspase-3 の方が caspase-7 よりも高い誘導能を有していた。次にこれらの酵素活 性の差の原因となっているアミノ酸配列の領域の同定を試みた。具体的には、caspase-3 と caspase-7 間のキメラ分子を多数作製して細胞に発現させ、その酵素活性等を解析す ることによって、両分子の酵素活性の際を担う 7 つの領域が同定された。これら 7 つの 領域は立体構造における配置から 3 つの構造領域を形成するグループに分類できた。ま た、これら 3 つの構造領域は、基質切断に対してそれぞれ独立に機能していることが示 された。さらに、これらの 3 つの立体構造領域のうち 2 つについては、活性化型 caspase におけるプロテアーゼ活性の差異のみならず、前駆体型におけるホモ二量体形成の会合 相手の選択においても重要な領域であり、caspase-3 と caspase-7 がヘテロ二量体を形成 することを回避するために機能する領域であった。申請者が行ったアミノ酸配列の機能的 な差異の解析から、相同分子である caspase-3 と caspase-7 が、前駆体型から活性化 型にいたる様々な段階において、明確かつ厳密に区別された機能を有していること、そ の機能の違いが立体構造上の限られた領域に担われていることが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

アポトーシスは不要な細胞を除去するシステムであり、多細胞生物の発生や恒常性の維持にとって重要なシステムである。caspase-3 と caspase-7 はアポトーシスの実行において中心的な役割を果たす分子であるが、これらの分子の細胞内での機能の違いや、その違いと立体構造との関連については、明らかではなかった。申請者は本研究において、まず caspase-3 と caspase-7 の細胞内における酵素活性を正しく比較する系を構築して解析している。そして、*in vitro*での低分子合成基質の切断、内在性基質の切断、アポトーシスにともなう DNA の断片化の誘導について caspase-3 は caspase-7 よりも活性が高いことを明らかにした。次に申請者は 2 つの分子間でキメラ分子を多数作成して解析することで、これら酵素活性の違いの原因となっている 3 ヶ所の立体構造の領域を同定している。そのうちの 2 ヶ所は、活性中心付近の基質ポケットの形成に関わる領域と、基質切断を直接担う領域の一部であった。最後の構造領域は、基質の選択と切断において細胞内でのみ機能し、無細胞系での基質切断には機能しない領域であった。これまで caspase の基質選択性は基質ポケットと基質配列のアフィニティでのみ説明されてきたが、3 番目に示した構造領域の機能が明らかになったことで、細胞内においては、未知のメカニズムによって基質が選択され切断されることが強く示唆され、特に興味深い。また本研究は立体構造の知見と酵素活性とを直接繋げることに成功している点でも新規性に富み、独自性も高い。さらに、解析方法において新しいアプローチを提示していることも高く評価できる。本研究において、多大な労力を費やして作製されたキメラ分子とその解析が立体構造の解析と合わさることにより、caspase-3 と caspase-7 の細胞内での活性化と機能に未知のメカニズムの存在することが明らかとなったが、今後はそのメカニズムの詳細と、さらには個体レベルでの意義を明らかとしていくことが強く期待される。申請者による研究によって明らかとされたこれらの成果は高く評価できるものであり、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 22 年 8 月 3 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日