

論文内容要旨

報告番号	甲 先 第 241 号	氏 名	一色 衣香
学位論文題目	Elucidation of Mechanism of Death-associated Protein Kinase-2 (DAPK2)-induced Apoptosis (Death-associated protein kinase-2によるアポトーシス誘導機構の解明)		
<p>Death-associated protein kinase-2(DAPK2)は、抗がん剤のターゲットとして有力視されているタンパク質の一つである。DAPK2の属するDAPKファミリーは、多くのがん細胞においてプロモーター部のメチル化により発現が低下していることや、過剰発現させることによってがん細胞においてもアポトーシスを誘導できることなどから、がん抑制遺伝子とされている。このファミリーにおいて最初に同定されたDAPK1は、様々なアポトーシスシグナルやがん遺伝子の関与が報告されているが、このファミリーがどのようにアポトーシスを誘導するのか、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。特にDAPK2は、研究がほとんど進んでいない。本研究では、DAPK2のアポトーシス誘導メカニズムの解明を目的として、DAPK2の活性制御及びアポトーシスへの関与についての検討を行なった。</p> <p>まず、cGMP依存性プロテインキナーゼ(cGK)の基質として、DAPK2を同定した。cGKは、抗がん剤ターゲットとして有力視されているものの一つであり、様々な抗腫瘍効果を有す。しかしながら、特にそのアポトーシス誘導経路の基質は同定されていなかった。当研究ではこの基質同定を試み、結果としてDAPK2を同定した。DAPK2はcGKによるリン酸化モチーフを3カ所含み、そのいずれもがcGKによってリン酸化されることを明らかにした。そのうち、Ser²⁹⁹のリン酸化は、DAPK2の活性を大きく上昇させることが示唆された。また、DAPK2はカルシウム依存性を有すこと、自己リン酸化による自己抑制機構を持つことが報告されているが、Ser²⁹⁹の擬似リン酸化変異体では、カルシウム非存在下でも高い活性を有すことや、自己抑制を解除できることが明らかとなった。さらに、この擬似リン酸化変異体は、活性のみではなくアポトーシス誘導能をも上昇させた。これらのことから、cGKはDAPK2をリン酸化することでDAPK2の活性を上昇させ、アポトーシスを誘導することが示唆された。</p> <p>次に、さらなる下流メカニズムの解明のため、DAPK2の結合タンパク質同定を試みた。その結果、Tubulinを同定した。DAPK2は、TubulinとC末端を介して結合すること、また内在的にも結合することを確認した。Tubulinは、細胞骨格の一つである微小管の主要構成成分である。微小管はTubulinの重合体であり、この重合速度によって微小管の長さが調節される。微小管は、細胞骨格としての機能の他に細胞分裂の際の分裂装置として機能し、染色体分配に強く関与する。微小管調節の不具合は、細胞周期を停止させ、結果としてアポトーシスを誘導する。これをターゲットとしたアポトーシス誘導剤にノコダゾールがある。ノコダゾールはTubulinの重合を阻害し、結果的にアポトーシスを誘導する。ノコダゾールによるアポトーシスは、DAPK2をノックダウンすることで、大きく減少することが示唆された。また、DAPK2とTubulinの結合は、ノコダゾール処理によって強化されることがあきらかとなった。さらに、DAPK2は通常14-3-3と結合しており、活性が抑制されているが、ノコダゾール処理によって14-3-3と離れ、Tubulinと結合することが示唆された。</p>			

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 先 第 241 号	氏 名	一色 衣香
審査委員	主査 長宗秀明 副査 中村嘉利 副査 辻 明彦		
学位論文題目 Elucidation of Mechanism of Death-associated Protein Kinase-2 (DAPK2)-induced Apoptosis (Death-associated Protein Kinase-2によるアポトーシス誘導機構の解明)			
審査結果の要旨 <p>Death-associated Protein Kinase-2 (DAPK2)は、DAPKファミリーに属するセリン/スレオニンプロテインキナーゼである。このファミリーはアポトーシス（プログラム細胞死）に関与していると考えられているが、これまでDAPK2の生理機能に関する報告例は少なく、その詳細な生理機能や調節機構は依然不明である。</p> <p>一色衣香氏は、cGMPで活性化されるプロテインキナーゼ（cGK）の基質となるタンパク質を、質量分析によって解析し、DAPK2がcGK-Iにより活性化される新規のcGK-Iの基質であること、さらに、DAPK2のcGK-Iによるリン酸化サイトの同定、およびDAPK2の活性化によって乳がん培養細胞のアポトーシスが亢進することを明らかにした。また、DAPK2の活性を負に制御する因子として14-3-3タンパク質を同定した。</p> <p>さらに、DAPK2によって誘導されるアポトーシスの分子メカニズムを明らかにするため、DAPK2に相互作用するタンパク質を質量分析によって解析し、特にDAPK2とチューブリンとの総合がアポトーシスの調節に重要であることを培養細胞での発現実験、RNAiによる発現抑制実験によって明らかにした。</p> <p>以上本研究は、初めてDAPK2の活性調節とアポトーシス制御の分子機構を明らかにし、新たな抗がん剤の開発に大変有用な情報を提供する研究であり、本論文は博士（工学）の学位授与に値するものと判定する。</p> <p>なお、本論文の審査には、湯浅恵造准教授の協力を得た。</p>			