

学 位 論 文 題 名

Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory
protein gelsolin

(アクチン調節蛋白質ゲルゾリンによるアポトーシスの抑制)

学位論文内容の要旨

アポトーシスは遺伝子によって高度に制御された細胞死であり、生体の恒常性の維持、発生、免疫システムの遂行等に重要な役割を果たしている。近年、アポトーシスを制御するさまざまな遺伝子が同定され、その機能について多くの解析がなされている。例として、インターロイキン-1 β -変換酵素 (ICE) ファミリーを構成する一連のシステインプロテアーゼは種々のアポトーシスにおいていわゆる死刑執行人として機能すると考えられている。一方で、Bcl-2 やその近縁蛋白質である Bcl-xL はアポトーシス抑制機能を有することが知られ、近年これらの蛋白質を細胞に過剰発現することや、ICE ファミリープロテアーゼに対する特異的なインヒビターを用いることで、アポトーシスの分子機構の理解が徐々に深まりつつある。したがって、アポトーシスを広範に抑制する新たなインヒビターの発見は、さらなる分子機構の解明に役立つと期待される。

ゲルゾリンはアクチン調節蛋白質であり、アクチンフィラメントを切断し、その反矢尻末端に結合することでアクチンの脱重合を促進する機能を有している。また、アクチン単量体 (G-アクチン) と結合し重合を促進する働きも有している。これらの機能はカルシウムイオンにより正に、またホスファチジルイノシトールリン脂質 (PPIs) により負にそれぞれ調節されている。ゲルゾリンは細胞内で、カルシウムイオンや PPIs の濃度の変化に対応してアクチン細胞骨格の再構築を制御していると考えられている。従来、細胞運動性の制御がゲルゾリンの *in vivo* における働きの一つである事が示唆されていたが、近年の研究からはゲルゾリンが細胞増殖の調節にも関与することが知られ始めている。

最近の研究から、Bcl-2、Ras、p53 などアポトーシスを調節する機能を有する分子は同時に細胞増殖に影響を及ぼす傾向がみられることから、今回我々は、ゲルゾリンがアポトーシスの調節に関与するか否かを Jurkat 細胞株を系として用い検討した。

Jurkat 細胞におけるゲルゾリンの高発現による影響を調べる目的で、遺伝子導入によりゲルゾリン高発現 Jurkat 細胞株を樹立し、JGF と命名した。コントロールベクター導入細胞株も同時に樹立し、JNF と命名した。ウエスタンブロット法により、JGF は Jurkat 細胞親株 (以下、親株) 及び JNF と比較して 2 倍から 3 倍のゲルゾリンを発現していることを確認した。アクチンの量に変化はみられなかった。位相差顕微鏡による観察ではゲルゾリン高発現による形態の変化は明らかでなく、また F-アクチン染色による解析にても F-アクチンの分布及び量の変化は認められなかった。

抗 Fas 抗体、C2-セラミド及びデキサメタゾンの添加により親株及び JNF-2 にはいずれの場合もアポトーシスが誘導された。これに対して JGF-5 及び JGF-7 はいずれの刺激によるアポトーシスに対しても強く抵抗性を示した。抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシスは用量依存性に誘導されたが、JNF-2 では 100 ng/ml の濃度で 24 時間後にはほぼ全ての細胞が死滅したのに対して、JGF-5 では 1 μ g/ml の濃度にてなお 65 % が生細胞であった。DNA の断片化は、JNF-2 において全ての刺激時に認められたが、JGF-5 では認められなかった。

次にPI染色によりアポトーシス刺激時のJNF-2及びJGF-5における細胞周期の解析を行った。無刺激時には両者の間に差を認めなかったが、抗Fas抗体、C2-セラミド及びデキサメタゾンの添加により、JNF-2ではsub-G₀/G₁分画が増加し、JGF-5ではその増加はほとんど認められなかった。さらに興味深い事にJGF-5では各刺激後に全く異なった細胞周期の変化を呈した。抗Fas抗体刺激ではわずかにS期の減少を認めたのみであったが、C2-セラミド刺激ではG₂/M期の蓄積が著明であり、反対にデキサメタゾンではG₁期の蓄積を認めた。このことからこれら3種の刺激はJurkat細胞株に対して共通にアポトーシスを引き起こすにもかかわらず、非常に異なった生物学的活性を有している事が示唆された。すなわちゲルゾリンは、異なる3種の刺激に共通で、比較的中心に位置する刺激伝達経路に働き、アポトーシス抑制作用を示すと考えられた。

FACS解析の結果、親株、JNF-2、JGF-5における細胞表面のFas抗原の発現量には差を認めなかった。また、ウエスタンブロット法にて、Bcl-2、Bcl-xL及びBax蛋白の発現量を親株、JNF-2、JNF-5、JGF-5及びJGF-7で比較したが、差を認めなかった。このことから、ゲルゾリンによるアポトーシスの抑制は、Fas抗原発現量の減少あるいはBcl-2ファミリー蛋白の発現量の変化による2次的な効果ではない事が示唆された。

次にゲルゾリンがICEファミリープロテアーゼの活性に与える影響を調べる目的で、ICE(-様)プロテアーゼ並びにCPP32(-様)プロテアーゼの活性を抗Fas抗体、C2-セラミド及びデキサメタゾンによって刺激した親株、JNF-2、JGF-5において測定した。その結果、ICE(-様)プロテアーゼ活性はアポトーシスを誘導したJurkat細胞株において全く検出されなかった。また、ノーザンブロット解析及びウエスタンブロット解析ではicemRNA並びにICE蛋白の発現も認めなかった。これに対してCPP32(-様)プロテアーゼ活性は、JNF-2において各刺激によるアポトーシスの早期より著明に上昇した。しかしながらJGF-5においてはCPP32(-様)プロテアーゼ活性の上昇は強く抑制されていた。

CPP32蛋白は32 kDaの非活性型の前駆体として合成され、17 kDa及び12 kDaのサブユニットに切断され活性型の酵素へと変換されることが知られている。ゲルゾリンがCPP32蛋白の切断以前のステップを抑制するのか、切断後の酵素の活性自体を抑制するのかを調べる目的で、抗Fas抗体刺激時の親株、JNF-2、JGF-5におけるCPP32蛋白の切断をウエスタンブロット法により解析した。親株及びJNF-2においては2時間後にCPP32の32 kDa前駆体はほぼ消失したのに対し、JGF-5においては切断されずに残存した。これらのことからゲルゾリンは、異なる刺激がJurkat細胞株にアポトーシスを誘導する際に、CPP32(-様)プロテアーゼの活性化にいたるまでの共通の上流の経路を抑制すると考えられた。

次にICEファミリープロテアーゼのJurkat細胞株のアポトーシスにおける重要性を調べる目的で、CPP32プロテアーゼ特異的インヒビター、Ac-DEVD-CHOまたはICE特異的インヒビター、Ac-YVAD-CHOの存在下にJurkat親株を抗Fas抗体、C2-セラミド、デキサメタゾンにより刺激し、生細胞率を算定した。その結果、Ac-DEVD-CHOは抗Fas抗体刺激によるアポトーシスを強く抑制したが、Ac-YVAD-CHOはほとんどアポトーシス抑制効果を示さなかった。このことはJurkat細胞株におけるFas依存性アポトーシスにはCPP32(-様)プロテアーゼが必須であることを示している。一方、C2-セラミド及びデキサメタゾン刺激によるアポトーシスに対してはAc-DEVD-CHOの抑制効果は部分的であった。このことはC2-セラミド及びデキサメタゾン刺激によるアポトーシスにおいてはCPP32(-様)プロテアーゼの関与は部分的であり、上記インヒビターによって抑制されないその他のプロテアーゼあるいは他の重要なステップが必須な役割を演じていると考えられる。以上より、CPP32(-様)プロテアーゼの活性化より上流に位置し、異なる刺激によるアポトーシスにおいても必須でかつ共通のターゲットをブロックすることで、ゲルゾリンはアポトーシスを抑制すると考えられた。

ゲルゾリンが種々の刺激により誘導されるアポトーシスを抑制するという今回の我々の研究結果は、アクチン調節蛋白質がアポトーシスの制御にも関与するという新たな知見を提供するものとして意義深いと思われる。また今回の系は、アポトーシスの分子機構の解明に寄与する事が期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin

(アクチン調節蛋白質ゲルゾリンによるアポトーシスの抑制)

アポトーシスは遺伝子によって高度に制御された細胞死であり、生体の恒常性の維持、発生、免疫システムの遂行等に重要な役割を果たしている。近年、アポトーシスを制御するさまざまな遺伝子が同定され、その機能について多くの解析がなされている。例えば、インターロイキン-1 β -変換酵素 (ICE) ファミリーを構成する一連のシステインプロテアーゼは種々のアポトーシスにおいて死刑執行人として機能すると考えられ、Bcl-2 やその近縁蛋白質である Bcl-xL はアポトーシス抑制機能を有するとされている。

ゲルゾリンはアクチン調節蛋白質で、アクチンフィラメントを切断し、その脱重合を促進するとともに、アクチン単量体 (G-アクチン) と結合し重合を促進する働きも有している。従来、細胞運動性の制御がゲルゾリンの働きの一つである事が示唆されていたが、近年ゲルゾリンが細胞増殖の調節にも関与することが明らかにされてきた。一方、Bcl-2、Ras、p53 などアポトーシスを調節する機能を有する分子は同時に細胞増殖に影響を及ぼす傾向がみられることから、申請者は、ゲルゾリンがアポトーシスの調節に関与するか否かを Jurkat 細胞株を系として用い検討した。

Jurkat 細胞におけるゲルゾリンの高発現による影響を調べる目的で、遺伝子導入によりゲルゾリン高発現 Jurkat 細胞株(JGF)を樹立した。コントロールベクター導入細胞株(JNF)も同時に樹立した。JGF はJurkat 細胞親株 (以下、親株) 及び JNF と比較して2倍から3倍のゲルゾリンを発現していた。アクチンの量や形態およびF-アクチンの分布及び量の変化は認められなかった。

抗 Fas 抗体、C2-セラミド及びデキサメタゾンの添加により親株及びコントロールベクター導入のJNF はいずれの場合もアポトーシスが誘導された。これに対してゲルゾリン高発現 Jurkat 細胞であるJGFはいずれの刺激によるアポトーシスに対しても強く抵抗性を示した。抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシスは用量依存性に誘導されたが、JNF では 100 ng/ml の濃度でほぼ全ての細胞が死滅したのに対して、JGFでは 1 μ g/ml の濃度にて

なお 65 % が生細胞であった。DNA の断片化は、JNF において全ての刺激時に認められたが、JGF では認められなかった。

次に PI 染色により各種刺激後の JNF 及び JGF における細胞周期の解析を行った。無刺激時には両者の間に差を認めなかったが、抗 Fas 抗体、C2-セラミド及びデキサメタゾンの添加により、JNF では sub-G0/G1 分画が増加した。これに対し、JGF ではその増加はほとんど認められなかったが、各刺激に対してそれぞれ全く異なった細胞周期の変化を示した。すなわち 3 種の刺激が共通にアポトーシスを引き起こすにもかかわらず、異なった機序で作用する事を示唆した。以上から、ゲルゾリンは異なる 3 種の刺激伝達経路の共通部分に作用してアポトーシス抑制作用を示すと考えられた。なお、ゲルゾリンによるアポトーシスの抑制は、Fas 抗原発現量の減少あるいは Bcl-2 ファミリー蛋白の発現量の変化による 2 次的な効果ではない事が確認された。

ゲルゾリンの ICE(-様) プロテアーゼや CPP32(-様) プロテアーゼ活性への影響を親株、JN、JGF において測定した。ICE(-様) プロテアーゼ活性、ice mRNA および ICE 蛋白の発現はアポトーシスを誘導した Jurkat 細胞株には全く検出されなかった。これに対して CPP32(-様) プロテアーゼ活性は、JNF で各刺激によるアポトーシスの早期より著明に上昇したが、JGF では強く抑制されていた。この抑制は CPP32 前駆体活性化の抑制によることが明らかとなった。これらのことからゲルゾリンは、異なる刺激が Jurkat 細胞株にアポトーシスを誘導する際に、CPP32(-様) プロテアーゼの活性化に到るまでの共通の経路を抑制すると考えられた。

CPP32 プロテアーゼインヒビター、Ac-DEVD-CHO、また ICE インヒビター、Ac-YVAD-CHO、による検討から、Jurkat 細胞株における Fas 依存性アポトーシスには CPP32(-様) プロテアーゼが必須であることが明らかとなった。一方、C2-セラミド及びデキサメタゾン刺激によるアポトーシスに対しては Ac-DEVD-CHO の抑制効果は部分的であった。このことから C2-セラミド及びデキサメタゾン刺激によるアポトーシスには CPP32(-様) プロテアーゼの関与は部分的であり、上記インヒビターでは抑制されない他のプロテアーゼまたは他のステップが役割を演じていると考えられた。以上より、ゲルゾリンは CPP32(-様) プロテアーゼ活性化の上流に位置し、異なる刺激経路の共通のターゲットをブロックすることで、アポトーシスを抑制すると考えられた。

公開発表に際して、副査の葛巻教授から、CPP-32 の基質とゲルゾリンの関係、アポトーシスにおけるミトコンドリアの関与、副査の小林教授から、抗 Fas 抗体刺激から CPP32 へ到る経路に関与する分子、CPP32 を介さない経路へのゲルゾリンの関与のメカニズム、主査の守内教授から、この実験系における p53 の関与、アポトーシス抑制と癌化、他の細胞系での実験結果、薬剤によるゲルゾリン発現亢進とアポトーシス抑制の有無、などの質問があったが、申請者は概ね妥当な回答をした。

ゲルゾリンが種々の刺激により誘導されるアポトーシスを抑制するという今回の実験系は、アポトーシスの分子機構の解明に寄与する事が期待できる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。