

# ヒト神経芽細胞腫におけるセラミドのアポトーシス 惹起機構と ICH-1S 結合蛋白質の単離

## 学位論文内容の要旨

細胞膜の主要な構成成分の一つであるスフィンゴミエリンから生成するセラミドが、血球系細胞においてアポトーシスのセカンドメッセンジャーとして働いていること、一方、神経細胞においてセラミドは細胞死の誘導と抑制といった相反する二面性をもつことが報告され、細胞種によってセラミド産生以降の下流のシグナル伝達機構が異なっていることが推測されるが、その詳細な作用機構について不明な点が多い。また、細胞死実行遺伝子である caspase 中の caspase-2 (Ich-1) は、選択的スプライシングにより Ich-1L と Ich-1S の二つの転写産物が産生され、このうち、Ich-1L は細胞死誘導活性を有するが、Ich-1S は逆に抑制効果を有することから、これらは細胞死を調節する因子であると考えられている。Ich-1 は胎児期の脳に高く発現していることから、神経細胞のアポトーシスに深く関与していることが推定されているが、その詳細はほとんど不明である。そこで本研究では、まず、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-MC 細胞を用いて、セラミドの惹起するアポトーシスの細胞内分子機構を検討した。さらに、yeast two-hybrid system を用いて、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーより、ICH-1S と相互作用する因子の単離に成功し、その機能について検討し、以下に記述する新知見を得た。

### 1. セラミドによるヒト神経芽細胞腫 SK-N-MC 細胞のアポトーシス誘導

細胞死の指標として、培養液中に遊離した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定したところ、細胞膜透過性の C2 セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼの添加により、濃度依存的に LDH の活性が上昇した。また、アポトーシスの形態学的な特徴であるクロマチンの凝縮および、生化学的な特徴である DNA の断片化も認められたことから、C2 セラミド、スフィンゴシンによる細胞死はアポトーシスであることが示唆された。

### 2. セラミド惹起アポトーシスにおける caspase の関与

caspase の非選択的阻害薬 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は濃度依存的に C2 セラミドの惹起する DNA の断片化を抑制した。つぎに、caspase が活性化されているか否か、二つの蛍光基質を用いて検討したところ、C2 セラミドにより caspase-3-like protease 活性上昇が引き起こされた。一方、caspase-1-like protease 活性は全く認められなかった。現在、ヒトで 10 種類の caspase サブタイプの存在が知られている。そこで、SK-N-MC 細胞に発現する caspase のサブタイプを RT-PCR 法を用いて調べたところ、caspase-2,-3,-4,-6,-7,-8,-9 および -10 の発現が認められた。つぎに、C2 セラミドにより惹起される SK-N-MC 細胞のアポトーシスの際に caspase-2 および -3 が活性化されることが分かった。以上の結果から、C2 セラミドによる SK-N-MC 細胞のアポトーシスに caspase-2 および -3 の活性化が関与していることが示された。

### 3. セラミドによるcytochrome cの細胞質への漏出

最近、ミトコンドリアタンパク質であるcytochrome cがcaspaseの活性化因子であることが報告された。そこで、セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシスに対するcytochrome cの関与を検討した。その結果、C2セラミド処理により、cytochrome cの細胞質への漏出が認められた。このcytochrome cの細胞質への漏出はZ-Asp-CH<sub>2</sub>-DCBにより抑制されなかった。さらに、in vitroにおいてSK-N-MC細胞から調製したcytochrome cはcaspase-2および-3を活性化した。以上より、C2セラミド処理によるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、cytochrome cの細胞質への漏出、それに続くcaspase-2および-3の活性化が関与していることが示唆された。

### 4. ICH-1S binding protein (ISBP) の単離

yeast two-hybrid systemを用いて、Ich-1Sの全長をbaitとし、ヒト胎児脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、6個の陽性クローンを得た。この6個のクローンの塩基配列を調べたところ、すべて同一であった。そこで、このクローンをICH-1S binding protein (ISBP) と命名した。データベース検索の結果、このクローンがコードする配列は、インテグリン細胞内ドメイン結合蛋白質として、最近、単離されたものと同一であることが明らかとなった。ISBPはカルシニューリンBサブユニットと58%、カルモジュリンと56%の相同性をもち、C末端側に二つのEFハンドモチーフをもつ低分子量(約25 kDa) Ca<sup>2+</sup> binding proteinであることが分かった。ISBP cDNAをプローブとしてヒトの各組織におけるISBP mRNAの発現をノーザンブロット解析により検討したところ、ISBP mRNAは調べた各組織のすべてに発現していた。また、蛍光抗体法により、ISBPの細胞内局在を検討したところ、ISBPは核、細胞質の両方に存在していることが分かった。

### 5. ICH-1SとISBPの結合解析

ICH-1SとISBPの直接的な結合を確認するため、in vitro結合実験を行ったところ、ICH-1SとISBPとの結合が確認された。つぎに、ICH-1SとISBPの結合部位をyeast two-hybrid systemにより解析した。その結果、ICH-1SはISBPのC末側に結合すること、とくに、C末側3アミノ酸および、N末端18から47アミノ酸の間の配列が結合に必要であることが示唆された。一方、ISBPはICH-1SのC末側に結合すること、また、ICH-1Sに特異的なC末端のアミノ酸が必要であることが示唆された。

### 6. caspaseに対するISBPの効果

ISBPのcaspaseに対する作用を検討するため、ISBPがcaspaseの基質になりうるか否か検討したところ、ISBPはcaspaseの基質にならないことが示唆された。つぎに、ISBPがcaspaseの活性に影響を与えるか否か検討したところ、in vitroにおいてISBPはcaspaseの活性を一部抑制することが示唆された。

今回、単離に成功したISBPはセラミドなどによるアポトーシスの分子機構の解明に大きく寄与すると考えられ、ISBPの細胞内機能の検討が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸  
副 査 教 授 横 沢 英 良  
副 査 教 授 五十嵐 靖 之  
副 査 助 教 授 大 熊 康 修

学 位 論 文 題 名

## ヒト神経芽細胞腫におけるセラミドのアポトーシス 惹起機構と ICH-1S 結合蛋白質の単離

申請者は、ヒト神経芽細胞腫SK-N-MC細胞におけるセラミドのアポトーシス惹起機構を検討してきたが、今回、同機構へのcytochrome cおよび、caspaseの関与を明らかにするとともに、caspase-2関連蛋白質(ICH-1S)と相互作用する蛋白質の単離に成功し、その機能についても新知見を得、本学位論文審査として申請した。

細胞膜の構成成分のスフィンゴミエリンから生成したセラミドは血球系細胞のアポトーシスに関与するが、神経細胞において細胞死の誘導と抑制という相反する作用を示すことから、細胞種によってセラミドの細胞死および抑制機構が異なることが予想される。一方、細胞死実行因子であるcaspase-2 (Ich-1) にはIch-1LとIch-1Sの二つの転写産物があり、Ich-1Lは細胞死誘導活性、Ich-1Sは逆に抑制活性を有することが知られているが、その詳細は不明である。そこで申請者はセラミドによる神経細胞死の分子機構を解明すること、また、ICH-1S結合蛋白質を単離し、機能を明らかにすることを目的に本研究を行い、次のような点を明らかにした。

細胞死の指標として、培養液中に遊離した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定したところ、細胞膜透過性のC2セラミド (C2-C)、スフィンゴシン (SS)、スフィンゴミエリナーゼ (SMase) の添加により、LDHの活性が上昇した。また、クロマチンの凝縮および、DNAの断片化が認められたことから、C2-C、SS、SMaseによる細胞死はアポトーシスであることを示唆した。このC2-C、SS、SMaseによるDNAの断片化は、Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (caspaseの非選択的阻害薬) により濃度依存的に抑制さ

れた。また、C2-C、SSにより caspase-3様の protease 活性が上昇したことから、C2-C、SSによるアポトーシスに、caspase-3様 protease が関与する可能性を示唆した。つぎに、SK-N-MC細胞に発現する caspase のサブタイプを RT-PCR法を用いて解析したところ、caspase-2,-3,-4,-6,-7,-8,-9 および-10の発現を認めた。C2-Cによって活性化される caspase のサブタイプを調べるため、caspase-2 および-3 に特異的な抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、caspase-2 および-3 の前駆体が減少することを見いだした。さらに、caspase の基質である poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の切断も認められたことから、C2-Cによるアポトーシスに caspase-2 および-3 の活性化が関与することを示唆した。つぎに、C2-Cによる cytochrome c の細胞質への漏出、さらに、無細胞の系における cytochrome c による caspase-2 および-3 を活性化することを見いだした。以上の結果より、C2-Cによるアポトーシス誘導時に、cytochrome c の細胞質への漏出、それに続く caspase-2 および-3 の活性化が生じることを示唆した。

ICH-1S と相互作用する蛋白質を単離するため、yeast two-hybrid system を用いて、Ich-1S の全長を bait として、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。6個の陽性クローンの塩基配列を調べたところ、全て同一であることを見だし、このクローンを ICH-1S binding protein (ISBP) と命名した。データベース検索の結果、このクローンがコードする配列は、インテグリン細胞内ドメイン結合蛋白質と同一であること、さらに、ISBP はカルシニューリン B サブユニットと 58%、カルモジュリンと 56% の相同性を持ち、C 末端側に二つの EF ハンドモチーフをもつ約 25 kDa の  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein であることが分かった。ノーザンブロット解析により、ISBP mRNA は調べた各組織全てに発現すること、また、蛍光抗体法により ISBP は核、細胞質の両方に存在することを示した。つぎに、大腸菌で発現、精製した GST-ICH-1S は、in vitro 転写、翻訳系により  $^{35}\text{S}$ -methionine ラベルした  $^{35}\text{S}$ -ISBP と結合することを確認した。ISBP および、Ich-1S の各種 deletion mutants を用いて、yeast two-hybrid system により ICH-1S と ISBP の結合部位を調べたところ、ICH-1S は ISBP の C 末端側 3 アミノ酸 および、N 末端 18 から 47 アミノ酸の間が結合に必要であることを示唆した。一方、ISBP は ICH-1S に結合するために特異的な C 末端側の アミノ酸が必要であることを示唆した。つぎに、ISBP は caspase の基質にならなかったが、ISBP は caspase の活性を一部抑制したことから、ISBP はアポトーシス抑制に関与する因子であることが示唆された。

以上、本審査委員会は本論文をヒト神経芽細胞腫におけるセラミドのアポトーシス惹起機構に関し新知見を得るとともに、単離、同定したICH-1S結合蛋白質 (ISBP) のアポトーシス抑制への可能性を示唆した内容であると判定し、博士 (薬学) 学位を受けるに十分値すると認めた。