

Gelsolin Inhibits Apoptosis by Blocking Mitochondrial Membrane Potential Loss and Cytochrome c Release

(ゲルソリンによるアポトーシス抑制のメカニズム：
ミトコンドリア内膜電位低下およびチトクロムc放出の阻止)

学位論文内容の要旨

アポトーシスはクロマチン凝縮、核断片化、細胞膜のプレビング、アポトーシス小体の形成およびミトコンドリアに典型的な変化を伴う細胞死である。核および細胞膜の変化より前にミトコンドリア膜の浸透性の亢進・内膜電位低下・細胞質へのチトクロムcの放出などミトコンドリアの変化が起こることが知られている。さらに、ミトコンドリア内膜電位低下およびチトクロムcの放出とミトコンドリア膜に存在する Permeability transition (PT) poreの開閉には密接な関係があることが報告されている。PT pore complexは電圧依存性アニオンチャンネル、アデニン・ヌクレオチド・トランスロケーター(ANT)、サイクロフィリンD、ペリフェラル・ベンゾジアゼピン受容体など複数の蛋白質から成っている。PT poreが開くことによってチトクロムcは細胞質に放出され、その結果下流のカスベースを活性化し、アポトーシスを促進する。ゲルソリンはアクチンの重合脱重合を制御する蛋白質でありアポトーシスを抑制することが報告されている。しかし、そのアポトーシス抑制の機構は未だ明らかではない。そこで、本研究では、ゲルソリンによるアポトーシス抑制のメカニズムについて解析を行った。

材料と方法

1. 細胞 - ヒトT白血病細胞株Jurkat細胞は、10%FBS添加RPMI1640で培養した。ゲルソリン強発現Jurkat細胞株(JGFと略称)はLKCG(ゲルソリンcDNA)プラスミドをリポフェクション法で導入して発現させ、対照細胞株(JNFと略称)はLK444(neo)プラスミドを用いて樹立した。
2. アポトーシス誘導 - 抗Fas抗体CH-11 (0.2 $\mu\text{g/ml}$)、プロテインキナーゼ・インヒビーター staurosporine (1 μM)、細胞質内カルシウム濃度増加を引き起こす小胞体 Ca^{2+} -ATPaseインヒビーター thapsigargin (3 μM)、PT pore complexのペリフェラル・ベンゾジアゼピン受容体リガンドである protoporphyrin-IX (45 μM)のそれぞれにて、ゲルソリン強発現Jurkat細胞株および対照細胞株にアポトーシスを誘導し、核凝縮・断片化の割合をHoechst33342核染色法を用いて検討を行った。また、ミトコンドリア内膜電位は、ロダミン123処理後FACScaliburにて解析した。さらに、イムノプロット法を用いてミトコンドリアから細胞質へのチトクロムc放出の検討を行った。
3. カスベース活性化の検討 - アポトーシス誘導後経時的に細胞から蛋白質を抽出し、モノクローナル抗カスベース3抗体、抗カスベース8抗体およびポリクローナル抗カスベース9抗体にてイムノプロット法を行った。Cell-free系:無処理細胞より細胞質画分蛋白質を抽出し、ウシ・チトクロムcとdATPを加え、36°Cで保温し、経時的にカスベース活性化をイムノプロット法にて検討した。
4. リコンビナント蛋白質作成 - ヒトゲルソリン・pET-11aプラスミドを用いて大腸菌(BL21-DE3株)に蛋白質を発現させ、黒川らの方法で精製を行った。純度はSDS-PAGEで95%以上であることを確認した。

5. ラット肝臓のミトコンドリアにおける内膜電位低下およびチトクロムc放出 - ドンリュウ・ラットの肝臓を摘出し均質化した後、数回の遠心分離を繰り返してミトコンドリアを抽出した。これに各 cyclosporin A、アルブミン、リコンビナント・ゲルソリン、カルモジュリン、PI、PIP、PIP₂を加えた上、塩化カルシウム、atractylosideやBaxにてミトコンドリア内膜電位低下を誘導し、ロダミン123で染色したのち蛍光分光光度計を用いて検討した。また、抽出したミトコンドリアにアポトーシス誘導物質添加刺激後遠心して、上清を取りイムノプロット法にてチトクロムcの放出を見た。

6. 細胞分画 - ゲルソリンのミトコンドリアでの存在を検討するためJGF細胞抽出液遠心分離し、各細胞画分、すなわち、細胞質画分またはミトコンドリア画分をSDS-PAGEにて分離し、モノクロナール抗ヒトゲルソリン抗体クローン2C4にてイムノプロット法を行った。

7. 共焦点免疫蛍光顕微鏡法 - ヒト線維芽細胞およびJurkat細胞を、ミトコンドリアの指標となる500nM chloromethyl-X-rosamineにて染色し、ホルマリン固定を行い、Triton X-100添加後、20% ヤギ血清/PBSを用いて1時間ブロッキングを行った。一次抗体としてモノクロナール抗ヒトゲルソリン抗体、二次抗体としてFITC結合抗マウス抗体を用い、共焦点免疫蛍光顕微鏡(MRC-1024)で観察した。

結果

1. ゲルソリン強発現Jurkat細胞株(JGF)においては、抗Fas抗体(CH-11)、staurosporine、thapsigargin、protoporphyrin-IX各刺激によるアポトーシスが強く抑制された。また、各刺激時に、JNF対照細胞株で見られるミトコンドリア内膜電位低下および細胞質へのチトクロムc放出も、JGFにおいては強く抑制されていた。
2. アポトーシス誘導刺激後JNF対照細胞株で見られるカスパー3、8、9の活性化はJGFでは認められなかった。無処理JNFおよびJGF細胞質画分を抽出し、*in vitro*でウシ・チトクロムcとdATP加えたところ、両者においてカスパー3、8、9が活性化された。この結果によって、ゲルソリンはミトコンドリア変化の段階または、その上流で作用することが示唆された。
3. ラットの肝臓から抽出されたミトコンドリアでは、塩化カルシウム、ANTリガンドatractylosideおよび、Bax投与後おこるミトコンドリア内膜電位低下および細胞質へのチトクロムc放出はリコンビナント蛋白質ゲルソリンを加えることによって、強く抑制された。しかし、カルモジュリン蛋白質加えた場合では、抑制は認められなかった。
4. ラットの肝臓から抽出されたミトコンドリアでは、リコンビナント蛋白質ゲルソリンにPIPやPIP₂を加えてミトコンドリアに投与することによって、ゲルソリンによる内膜電位低下抑制作用が阻止されたが、PIを加えた場合は、このような結果は得られなかった。
5. 細胞分画で、ミトコンドリア画分にゲルソリンの存在が確認され、さらに、共焦点免疫蛍光顕微鏡法を用い、ヒト線維芽細胞およびJurkat細胞のミトコンドリアにゲルソリンが存在することが判明した。

考察

カスパーの蛋白質分解カスケードは、アポトーシスの中心マシナリーと知られている。Scaffidiらの分類によるType-II細胞Jurkat細胞株においては、アポトーシスを誘導するとカスパー3、8、9はミトコンドリア変化の下流で活性化される。しかし、ゲルソリン強発現Jurkat細胞株では、この活性化は認められなかった。その上、ゲルソリン強発現Jurkat細胞株においては、アポトーシス関連ミトコンドリア変化を引き起こす幾つかの薬剤によるミトコンドリア内膜電位低下と細胞質へのチトクロムc放出は強く抑制された。特にその薬剤の内protoporphyrin-IXはミトコンドリアのPT pore complex部位に存在するペリフェラル・ベンゾジアゼピン受容体と結合することから、ゲルソリンは直接ミトコンドリアで作用することが示唆された。さらに、ラットの肝臓から抽出されたミトコンドリアの解析で、ゲルソリンのミトコンドリアでの直接作用を確認した。ゲルソリンはカルシウムと結合しその結果ミトコンドリア内膜電位低下を抑制するという可能性を検討するため、カルシウムと結合する蛋白質カルモジュリンをゲルソリンの代わりに添加した。しかしゲルソリンのような抑制機能は認められなかった。したがって、ゲルソリンのアポトーシス抑

制作用はカルシウム結合能によるものではないことが示唆された。PIPとPIP₂はゲルソリンと結合し、ゲルソリンのアクチンに対する作用を抑制することが報告されている。PIPやPIP₂を加えてミトコンドリアに投与することによって、ゲルソリンによる内膜電位低下抑制作用が阻止されたが、ゲルソリンと結合出来ないPIを加えた場合では、上記のような結果は得られなかった。すなわち、ゲルソリンのアポトーシス抑制作用にはPIPやPIP₂によって阻止されるアクチンに対する作用か、PIPやPIP₂によって変化するゲルソリンの三次元構造の変化が重要であることが示唆された。本研究により、ゲルソリンがミトコンドリアのPT poreを制御し、アポトーシスを抑制することが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Gelsolin Inhibits Apoptosis by Blocking Mitochondrial Membrane Potential Loss and Cytochrome c Release

(ゲルソリンによるアポトーシス抑制のメカニズム：

ミトコンドリア内膜電位低下およびチトクロムc放出の阻止)

ゲルソリンはアクチンの重合脱重合を制御する蛋白質でありアポトーシスを抑制することが報告されている。しかし、そのアポトーシス抑制の機構は未だ明らかではない。Jurkat細胞株においては、アポトーシスを誘導するとカスパーズ3、8、9はミトコンドリア変化の下流で活性化される。しかし、ゲルソリン強発現Jurkat細胞株では、この活性化は認められなかった。その上、ゲルソリン強発現Jurkat細胞株においては、アポトーシス関連ミトコンドリア変化を引き起こす幾つかの薬剤によるミトコンドリア内膜電位低下と細胞質へのチトクロムc放出は強く抑制された。特にその薬剤の内 protoporphyrin-IXはミトコンドリアのPT pore complex部位に存在するペリフェラル・ベンゾジアゼピン受容体と結合することから、ゲルソリンは直接ミトコンドリアで作用することが示唆された。さらに、ラットの肝臓から抽出されたミトコンドリアの解析で、ゲルソリンのミトコンドリアでの直接作用を確認した。ゲルソリンはカルシウムと結合しその結果ミトコンドリア内膜電位低下を抑制するという可能性を検討するため、カルシウムと結合する蛋白質カルモジュリンをゲルソリンの代わりに添加したところ、ゲルソリンのような抑制機能は認められなかった。したがって、ゲルソリンのアポトーシス抑制作用はカルシウム結合能によるものではないことが示唆された。PIPとPIP2はゲルソリンと結合し、ゲルソリンのアクチンに対する作用を抑制することが報告されている。PIPやPIP2を加えてミトコンドリアに投与することによって、ゲルソリンによる内膜電位低下抑制作用が阻止されたが、ゲルソリンと結合出来ないPIを加えた場合では、上記のような結果は得られなかった。すなわち、ゲルソリンのアポトーシス抑制作用にはPIPやPIP2によって阻止されるアクチンに対する作用か、PIPやPIP2によって変化するゲルソリンの三次元構造の変化が重要であることが示唆された。本研究により、ゲルソリンがミ

トコンドリアのPT poreを制御し、アポトーシスを抑制することが明らかになった。

公開発表にあたって、副査の細川教授よりゲルソリン強発現Jurkat細胞に含まれるゲルソリンの量は生理的に可能な量か、ゲルソリンがアポトーシスを抑制する現象の意味についての質問があった。次いで、副査の守内教授よりcell motilityとアポトーシス抑制では、どちらがゲルソリンの主な作用なのか、ゲルソリンのアポトーシス抑制作用はJurkat細胞以外の細胞でも認められているのか、ゲルソリンは直接的あるいは間接的にアポトーシスを抑制する多くの蛋白のなかの一つと考えてよいか、細胞骨格調節蛋白のなかでアポトーシス抑制作用が報告されているものはゲルソリン以外にあるか、についての質問があった。また、主査の田中教授より、ゲルソリンのknockoutマウスでは、実際にアポトーシスが上がっているのかどうかについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景に関する詳細な説明と最新の知見を交えて概ね適切に解答した。

この研究の結果は、今後の研究を進展させ、AIDS、神経変性病など過剰なアポトーシスが原因である疾患に対する遺伝子治療法の開発を期待させる。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ものと判定した。