

BNIP3 と CED-3 の結合によるアポトーシスの誘導

学位論文内容の要旨

アポトーシスの誘導には、システイン残基を活性中心に持つプロテアーゼである caspase の活性化が重要であるが、この活性化機構の調節の全貌は明らかになっていない。caspase は線虫から哺乳類に至るまで保存されており、caspase の活性化は線虫で最も詳細に検討されてきた。CED-3 は線虫において唯一見いだされている caspase で、CED-4 に結合し活性化するが、この活性化は BCL-2 ホモログの CED-9 により阻害されること、また、*ce*BNIP3 と CED-3 が結合しアポトーシスを誘導するが、CED-9 によってアポトーシス抑制されることも報告されている。*ce*BNIP3 はヒト BNIP3 の線虫ホモログであるが、ヒトの BNIP3 では BCL-2 ファミリーのアポトーシス抑制タンパク質との関連性が示唆されているものの、caspase カスケードの調節への関与を研究した報告はない。本研究では BNIP3 の caspase カスケード調節機構への関与を明らかにするために、BNIP3 の細胞死誘導に関わるドメインおよび BNIP3 と CED-3 の結合について検討した。

研究方法

本研究では、アポトーシスの誘導に重要な BNIP3 のドメインの検索、BNIP3 と CED-3 によるアポトーシスの誘導能の検索、BNIP3 と CED-3 の結合能の検索、CED-3 の細胞内局在の検索を行った。

アポトーシスの誘導に重要な BNIP3 のドメインを検索するにあたり、ヒト、線虫、マウスにおける BNIP3 のホモロジーを NCBI BLAST search の BLASTP を用いて検索した。検索結果より、野生型の BNIP3 (BNIP3wt) から BH3 ドメインを含む 27 アミノ酸を削除した BNIP3 Δ 27 と膜貫通ドメインを削除した BNIP3 Δ TM を作製した。細胞死誘導におけるこの削除領域の重要性を検討するため、ヒト骨肉腫由来細胞株の Saos2 に pcDNA3、pcDNA3-BNIP3wt、pcDNA3-BNIP3 Δ 27、pcDNA3-BNIP3 Δ TM をそれぞれ単独で遺伝子導入し GENETICIN を用いて選択培養した後のコロニー数を算定した。

BNIP3 と CED-3 によるアポトーシスの誘導能を検討するため、ヒト骨肉腫由来細胞株の 293T に pcDNA3、pcDNA3+pcDNA3-CED-3、pcDNA3+pcDNA3-BNIP3wt、pcDNA3+pcDNA3-BNIP3 Δ TM、pcDNA3-CED-3+pcDNA3-BNIP3wt、pcDNA3-CED-3+pcDNA3-BNIP3 Δ TM の 6 通りの組み合わせで遺伝子導入した。12 時間後に固定、X-gal で染色後、染色陽性細胞に対するアポトーシスを起こしている細胞の割合を算定した。

BNIP3 と CED-3 の結合能を検討するため、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク (GST、GST-BNIP3wt、GST-BNIP3 Δ TM) と 35 S-メチオニン標識した CED-3 を混合した後、緩衝液で洗浄を繰り返し、得られたサンプルを電気泳動で展開した。

CED-3 の細胞内局在を検索するため、ミドリザル腎由来細胞株の Cos7 に pcDNA3-CED-3 と pcDNA3、pcDNA3-CED-3 と pcDNA3-BNIP3wt の 2 通りの組み合わせで遺伝子導入した。12 時間後固定、染色し、共焦点レーザー顕微鏡で CED-3 の局在を検討した。

結果と考察

BNIP3 のホモロジー検索の結果、中央部の BH3 ドメインを含む領域と膜貫通ドメインにおいて高いホモロジーを示した。また、BNIP3 Δ 27、BNIP3 Δ TM を培養細胞に遺伝子導入し細胞死誘導能を検討した結果、いずれの BNIP3 ミュータントにおいてもアポトーシス誘導能の顕著な低下が見られ、BNIP3 によるアポトーシスの誘導において BH3 ドメインおよび膜貫通ドメインの双方が重要であることが示唆された。これまでの報告では、BH3 ドメインを介して BNIP3 はアデノウィルス E1B19K あるいは BCL-X_L と結合するが、このドメインを削除するのみでは BNIP3 のアポトーシス誘導能が完全に失われることはないと言われていた。これは、BNIP3 が BCL-2 や BCL-X_L のアポトーシス抑制能を阻害するだけでなく、他の異なるアポトーシスの誘導経路を持っていることを示唆する。その 1 つの可能性として BNIP3 と caspase の相互作用があり、Yasuda らによると線虫の BNIP3 ホモログ ceBNIP3 は CED-3 と結合し、相乗的にアポトーシスを誘導するとされている。この報告を元に、BNIP3 と CED-3 のアポトーシス誘導能について検討した結果、CED-3、BNIP3wt、BNIP3 Δ TM を pcDNA3 と共にそれぞれ遺伝子導入したものはそれぞれ平均 9.3%、10.8%、6.4%のアポトーシス誘導に対し、BNIP3wt と CED-3 を共導入したものは、各々の単独導入により誘導される細胞死の約 2 倍にあたる平均 40.1%のアポトーシスを誘導した。このことは、この培養細胞中において BNIP3 が CED-3 と協調して相乗的にアポトーシスを誘導していることを示唆する。一方、膜貫通ドメインを削除した BNIP3 Δ TM と CED-3 では約 15.3%と、BNIP3wt と CED-3 に見られるような相乗効果は見られなかった。このことから、BNIP3 は CED-3 と協調してアポトーシスを誘導するが、それらが相乗的に作用するためには膜貫通ドメインが必要であることが示唆された。次にヒトの BNIP3 と CED-3 の結合を検討した結果、in vitro の系において BNIP3 Δ TM と CED-3 との結合が確認され、膜貫通ドメインはこの結合に関与しないことが示唆された。さらに、CED-3 の細胞内局在を BNIP3wt の共発現の有無で検索したところ、CED-3 単独発現で細胞質にびまん性に分布していた CED-3 の細胞内局在は、BNIP3 存在下でミトコンドリア上へと変化した。このことから、BNIP3 は CED-3 をミトコンドリアへ局在変化させアポトーシスを誘導させることが示唆された。

BNIP3 に存在する膜貫通ドメインは、BCL-2 family に保存されている 20 残基前後の疎水性アミノ酸からなる領域であり、アミノ酸配列上に相同性は存在しないが、ある種の機能的ホモロジーが報告されている。この膜貫通ドメインの意義は、これら BCL-2 family タンパク質をミトコンドリアへ局在化させることにありと考えられ、今回の実験結果を合わせ考えると、BNIP3 の膜貫通ドメインのアポトーシス誘導における役割は、BNIP3 に結合した CED-3 (caspase) をミトコンドリア上に集積させることにあることが示唆された。ヒト caspase のうち caspase-2、-3、-9 のミトコンドリアへの局在が報告されているが、これらには単独でミトコンドリアに局在できるような配列が見られないことから何らかのタンパク質と複合体を形成することにより、ミトコンドリアへの局在が可能となるものと想像され、BNIP3 がそのようなタンパク質の 1 つである可能性が高いと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

BNIP3 と CED-3 の結合によるアポトーシスの誘導

審査は向後、松本および川崎審査委員全員が出席のもとに、まず論文申請者に対して申請論文の内容の要旨を説明させ、論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に申請論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文申請者は現在ヒト BNIP3 の caspase カスケード調節機構への関与を明らかにすることを目的として実験を行っているところであるが、本論文においてはヒト BNIP3 と線虫の caspase である CED-3 の結合について報告したものである。アポトーシスの誘導には caspase の活性化が重要であるが、この活性化機構の全貌は明らかになっていない。caspase は線虫から哺乳類に至るまで保存されており、caspase の活性化は線虫で最も詳細に検討されてきた。CED-3 は線虫において唯一見いだされている caspase で、CED-4 に結合し活性化するが、この活性化は BCL-2 ホモログの CED-9 により抑制される。また、線虫の BNIP3 が CED-3 と結合しアポトーシスを誘導することが報告されているが、ヒトの BNIP3 では BCL-2 ファミリーのアポトーシス抑制タンパク質との関連性が示唆されているものの、caspase カスケードの調節への関与を研究した報告はない。そのため、論文申請者はヒト BNIP3 の細胞死誘導に関わるドメインおよびヒト BNIP3 と CED-3 との結合について検索した。

【実験方法および材料】

アポトーシスの誘導に重要な BNIP3 の機能ドメインを検索するため NCBI BLAST search の BLASTP を用いてホモロジーを検索し、機能ドメインである BH3 ドメインと膜貫通ドメインをそれぞれ削除した BNIP3 Δ 27、BNIP3 Δ TM を作製した。細胞死誘導におけるこの削除領域の重要性を検索するため、ヒト骨肉腫由来細胞株の Saos2 に野生型と変異型の BNIP3 をそれぞれ単独で遺伝子導入し GENETICIN を用いた選択培養でコロニー数を算定した。

BNIP3 と CED-3 によるアポトーシスの誘導能を検討するため、ヒト骨肉腫由来細胞の 293T に BNIP3 (野生型、変異型)、CED-3 をそれぞれ単独導入、あるいは BNIP3 と CED-3 を共導入してアポトーシスの割合を算定した。

BNIP3 と CED-3 の結合能を検索するため、BNIP3 (野生型、変異型) のグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白を ³⁵S-メチオニン標識した CED-3 と混合し電気泳動で展開した。

CED-3 の細胞内局在を検索するためミドリザル腎由来細胞株の Cos7 に CED-3 単独導入、あるいは BNIP3 と CED-3 を共導入し共焦点レーザー顕微鏡で CED-3 の細胞内局在を検索した。

【結果および考察】

BNIP3 のホモロジー検索を元に作製した BNIP3 Δ 27、BNIP3 Δ TM において細胞死誘導能を検索した結果、いずれにおいてもアポトーシス誘導能の顕著な低下を認めた。また、BNIP3 と CED-3 の共導入により各々の単独導入の約 2 倍のアポトーシスが誘導されたが、BNIP3 の膜貫通ドメインを削除することによりその効果は失われた。一方 *in vitro* の系で BNIP3 の膜貫通ドメインの有無に関わらず BNIP3 と CED-3 が結合すること、また BNIP3 により CED-3 がミトコンドリアへ局在変化することが確認された。このことから BNIP3 は膜貫通ドメインによって CED-3 をミトコンドリアへ局在変化させアポトーシスを誘導させることが示唆された。

本研究結果は、これまで報告されてきたヒト BNIP3 のアポトーシス誘導経路とは異なり、ヒト BNIP3 の caspase カスケード調節機構への関与を強く示唆するものである。

現在、論文申請者はこのアポトーシスの誘導経路に関して実験を進めている所である。本研究はアポトーシスの誘導経路を検索し、歯科領域におけるアポトーシスの調節に関して、さらなる発展が期待される研究分野である。

今後の展望に関してもしっかりとした研究計画をもっており、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。