

学 位 論 文 題 名

Transcriptional and Post-Translational Modification
of Apoptosis-Related Proteins, Bax and Bcl-2,
in Human Lung Cancer Cell Lines

（ヒト肺癌細胞におけるアポトーシス関連タンパクの
転写時および翻訳後修飾）

学位論文内容の要旨

アポトーシスは、正常細胞にあつては恒常性の維持に、がん細胞にあつては治療と密接な関係がある。後者の場合、抗がん剤、放射線、温熱などのアポトーシス誘導因子が作用しアポトーシスが誘導されるが、この過程は導入期、因子作動期、分解期の3期に分けられる。導入期は細胞周期の停止が起きる時期で、*c-myc*、*E2F*、*rel*、*cdc-2*などは細胞周期を促進し、*Rb-1*、*p53*、*Waf-1*などは細胞周期を抑制する。作動因子期はアポトーシスに進むかどうか決定される時期で、*Bcl-2*ファミリーが主要な役割を果たす。これには、*Bax*、*Bcl-XS*、*Bad*、*Bak*などのアポトーシス促進因子と、*Bcl-2*、*Bcl-XL*、*Bcl-X*、*A1*、*Mcl-1*、*Bag-1*などの抑制因子が含まれる。一度、細胞がアポトーシスに進むように決定されると、この方向は不可逆的であり、自動的に分解期へと進み、細胞は典型的アポトーシスの所見を示すようになる。この間のタンパク分子の諸機能については分子生物学の進歩によりかなり詳細に分かってきたが、細胞内における動的変化や細胞全体としての検討はまだ十分には行われていない。そこで、本研究では、ヒト肺癌培養細胞を用い、*Bcl-2*や*Bax*の細胞内における動的変化や翻訳後修飾について検討するとともに、cDNAマイクロアレイ法を用いて転写修飾について検討した。

Ⅰ. ヒト肺癌培養細胞株における正常の膜アンカードメインをもつ *Bax* の細胞内位置異常

不死化している肺癌培養細胞株が*Bcl-2*を発現していることは理にかなっているが、10種類のヒト肺癌培養細胞株の細胞内*Bax*量をウエスタンブロット法で検討したところ、いずれの細胞もリンバ球に比較して*Bax*を過剰発現していた。そこで、共焦点レーザー走査顕微鏡で*Bcl-2*と*Bax*の局在を観察したところ、いずれの細胞も*Bcl-2*を細胞質内に発現していたが、*Bax*に関しては、これを細胞質内にのみ発現しているもの、細胞質内にも核内にも発現しているもの、細胞質内か核内に発現しているもの、核内にのみ発現しているものと多彩であった。*Bax*は核移行シグナルをもたないため、受動的拡散を除けば、本来は核移行ができないはずである。そこで、*Bax*に変異がないかどうかを検討したところ、*bax*遺伝子のコドン184に点突然変異がみられた。しかし、この突然変異部位は同一アミノ酸をコードしており、アミノ酸配列には変化がみられなかった。このことは、*Bax*の核移行には何らかの輸送体の関与が必要であることを示唆する。そこで、温熱刺激（42.5℃、6時間）を加えたところ、*Bcl-2*は細胞質内に留まったままだったが、*Bax*は全例で核に移行し、その後、もともと細胞質内に*Bax*を発現していた細胞では、再び*Bax*が細胞質内にみられるようになった。このように、*Bax*の核移行は能動的であり、その輸送体の存在の可能性が強く示唆された。

Ⅱ. ヒト肺癌培養細胞株における緑色蛍光タンパク（GFP）融合 *Bax* および *Bcl-2* タンパクの発現とその解析

*Bax*の核移行に何らかの輸送体が関与するかどうかを検討するために、GFP-*Bax*およびGFP-*Bcl-2*融合タンパクをPC-10扁平上皮癌細胞、PC-3腺癌細胞、QG-90小細胞癌細胞、QG-56扁平上皮癌細胞、およびHela細胞に発現させ、発現量はフローサイトメトリーで、局在は共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて検討した。まず、pEGFP-*bax*ベクターとpEGFP-*Bcl-2*ベクターを作製し、大腸菌に移入させたところ、pEGFP-*Bcl-2*ベクターの移入は容易であったが、pEGFP-*bax*ベクターの場合は、*bax*が野生型の場合は大腸菌は死滅し、膜アンカードメイン欠損*bax*の場合は移入することができた。しかし、ヒト肺癌細胞を用いた場合は、野生型*bax*でも移入が可能であったが、その細胞の継代は困難であり、移入細胞はやがて死滅した。

このことは、移入した野生型 *bax* はアポトーシス促進因子としての機能を有する *Bax* を発現させることを意味する。そこで、移入後の GFP の局在を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察したところ、その局在は内在性 *Bax* と同じであった。従って、*Bax* の核移行には何らかの輸送体が関与する可能性がさらに強く示唆された。

III. 温熱刺激やパクリタキセル処理後の Bcl-2 のリン酸化や Bax の局在とその機能との関係

Bcl-2 と Bax の相互関係をさらに詳細に検討するために、もともと *Bax* を細胞質内に発現している PC-10 扁平上皮癌細胞を用い、温熱刺激や微小管安定剤であるパクリタキセル処理後の Bcl-2 のリン酸化と Bax の局在の変化を検討するとともに、アポトーシス誘導との関係を検討した。温熱処理後、前述のように、*Bax* は核へ移行し、アポトーシスを回避する傾向が強くみられたが、この場合、Bcl-2 のリン酸化は全くみられなかった。一方、パクリタキセル処理を行うと、濃度依存的に、また、接触時間依存的に、Bcl-2 がリン酸化された。この場合、*Bax* は細胞質内に留まり、アポトーシスが強く誘導された。そこで、比重遠心分離法で細胞内小器官を分離採取し、Bcl-2 のリン酸化や Bcl-2 と Bax との相互作用について検討した。Bcl-2 は主にミトコンドリア分画とライソゾーム分画に存在したが、*Bax* はミトコンドリア分画と細胞質分画に存在し、Bcl-2 と Bax が相互作用を行うのはミトコンドリア分画内のみであることが示された。パクリタキセル処理による Bcl-2 のリン酸化はミトコンドリア分画とライソゾーム分画でみられた。そこで、抗 *Bax* 抗体を用いて免疫沈降法で検討すると、*Bax* と結合しているのはリン酸化していない Bcl-2 のみであり、また、Bcl-2 のリン酸化が増強されるとともに *Bax* に結合する Bcl-2 量も減少した。このように、Bcl-2 はリン酸化されることにより *Bax* との結合が阻害されたが、この場合の *Bax* はミトコンドリア分画に留まりアポトーシスを誘導するものと考えられる。一方、温熱刺激によっても Bcl-2 と *Bax* の結合は阻害されるが、この場合は、Bcl-2 はリン酸化されず、*Bax* は未知の輸送体と結合し、核へ移行し、アポトーシスが回避されと考えられた。

IV. ヒト肺癌培養細胞株における温熱刺激やパクリタキセル処理後の遺伝子発現の cDNA マイクロアレー法による解析

アポトーシス誘導刺激の遺伝子転写に及ぼす影響を検討するために、温熱刺激やパクリタキセル処理後に PC-10 細胞の mRNA を抽出し、逆転写法で cDNA プローブを合成し、cDNA マイクロアレー法で解析した。検討した遺伝子数は 588 種で、機能的に 6 つのカテゴリーに分けた：がん遺伝子、がん抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子（カテゴリー A）；ストレス反応性、イオンチャンネル・イオン輸送、細胞内刺激伝導系に関係するタンパクをコードする遺伝子（カテゴリー B）；アポトーシス関連、DNA 合成および修復タンパクをコードする遺伝子（カテゴリー C）；転写因子や DNA 結合タンパクをコードする遺伝子（カテゴリー D）；受容体、細胞表面抗原、細胞接着因子をコードする遺伝子（カテゴリー E）；および細胞間情報伝達遺伝子（カテゴリー F）。温熱刺激により 64 の遺伝子が、パクリタキセル処理により 34 の遺伝子が、非処理の対照群に比較して増幅されていた。この内、共通して増幅されているものが、22 遺伝子あり、細胞内刺激伝導系に関するもの 4 遺伝子、アポトーシスに関連するもの 6 遺伝子、DNA 合成・修復に関連するもの 4 遺伝子、DNA 結合および転写因子に関係するもの 5 遺伝子、その他 3 遺伝子であった。しかし、この遺伝子群には一定の傾向はみられなかった。温熱刺激で増幅されるが、パクリタキセル処理では転写が抑制される遺伝子は 42 種類あり、カテゴリー D に関係するものが最も多く 19 遺伝子で、次いでカテゴリー B に属するものが 10 遺伝子あった。カテゴリー C に属するものは 6 種類であった。このことから、ストレス反応が惹起されると共に DNA 合成が活発化し、やがてはアポトーシスから逸脱する機序が明らかに推定できた。一方、パクリタキセル処理で増幅されるが、温熱刺激では転写が抑制される遺伝子は 12 種類に過ぎず、カテゴリー A が 1 種、カテゴリー C が 7 種、その他 4 種であった。カテゴリー C の 7 種も、お互いを明確に関係付ける要素は乏しく、主に翻訳後修飾によりアポトーシスが惹起されることが推定された。興味深いことは、温熱刺激によってもパクリタキセル処理によっても非処理対照よりも転写が抑制される遺伝子が 45 種類あり、その中に、*myc* や *raf1* や *ras* などのがん遺伝子が含まれていたことである。これが細胞内でどのような意味を持つのかは不明であるが、がん治療の標的として注目されていることを考えると、この結果はその可能性が低いことを示し、検討する必要性が高い。

以上のように、細胞に対するアポトーシス誘導因子の影響は複雑多彩であり、総合的な見地に立つて解析することの重要性を示すと共に、今後の研究の方向性を示したと考える。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 井 上 勝 一
副 査 教 授 荒 木 義 雄
副 査 教 授 西 則 雄

学 位 論 文 題 名

Transcriptional and Post-Translational Modification of Apoptosis-Related Proteins, Bax and Bcl-2, in Human Lung Cancer Cell Lines

(ヒト肺癌細胞におけるアポトーシス関連タンパクの
転写時および翻訳後修飾)

アポトーシスは、正常細胞にとっては恒常性の維持に、がん細胞にとっては治療と密接な関係がある。後者の場合、抗がん剤、放射線、温熱などのアポトーシス誘導因子が作用しアポトーシスが誘導されるが、この過程は導入期、因子作動期、分解期の3期に分けられる。導入期は細胞周期の停止が起きる時期で、c-myc、E2F、rel、cdc-2などは細胞周期を促進し、Rb-1、p53、Waf-1などは細胞周期を抑制する。作動因子期はアポトーシスに進むかどうか決定される時期で、Bcl-2ファミリーが主要な役割を果たす。これには、Bax、Bcl-XS、Bad、Bakなどのアポトーシス促進因子と、Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-X、A1、Mcl-1、Bag-1などの抑制因子が含まれる。一度、細胞がアポトーシスに進むように決定されると、この方向は不可逆的であり、自動的に分解期へと進み、細胞は典型的アポトーシスの所見を示すようになる。この間のタンパク分子の諸機能については分子生物学の進歩によりかなり詳細に分かってきたが、細胞内における動的変化や細胞全体としての検討はまだ十分には行われていない。そこで、本研究では、ヒト肺癌培養細胞を用い、Bcl-2やBaxの細胞内における動的変化や翻訳後修飾について検討するとともに、cDNAマイクロアレイ法を用いて転写修飾について検討された。

I. ヒト肺癌培養細胞株における正常の膜アンカードメインをもつBaxの細胞内位置異常

不死化している肺癌培養細胞株がBcl-2を発現していることは理にかなっているが、10種類のヒト肺癌培養細胞株の細胞内Bax量をウエスタンブロット法で検討したところ、いずれの細胞もリンパ球に比較してBaxを過剰発現していた。そこで、共焦点レーザー走査顕微鏡でBcl-2とBaxの局在を観察したところ、いずれの細胞もBcl-2を細胞質内に発現していたが、Baxに関しては、これを細胞質内にのみ発現しているもの、細胞質内にも核内にも発現しているもの、細胞質内か核内に発現しているもの、核内にのみ発現しているものと多彩であった。Baxは核移行シグナルをもたないため、受動的拡散を除けば、本来は核移行ができないはずである。そこで、Baxに変異がないかどうかを検討したところ、bax遺伝子のコドン184に点突然変異がみられた。しかし、この突然変異部位は同一アミノ酸をコードしており、アミノ酸配列には変化がみられなかった。このことは、Baxの核移行には何らかの輸送体の関与が必要であることを示唆する。そこで、温熱刺激(42.5℃、6時間)を加えたところ、Bcl-2は細胞質内に留まったままだったが、Baxは全例で核に移行し、その後、もともと細胞質内にBaxを発現していた細胞では、再びBaxが細胞質内にみられるようになった。このように、Baxの核移行は能動的であり、その輸送体の存在の可能性が強く示唆された。

II. ヒト肺癌培養細胞株における緑色蛍光タンパク(GFP)融合BaxおよびBcl-2タンパクの発現とその解析

Baxの核移行に何らかの輸送体が関与するかどうかを検討するために、GFP-BaxおよびGFP-Bcl-2融合タンパクをPC-10扁平上皮癌細胞、PC-3腺癌細胞、QG-90小細胞癌細胞、QG-56扁平上皮癌細胞、およびHela細胞に発現させ、発現量はフ

ローサイトメトリーで、局在は共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて検討した。まず、pEGFP-*bax* ベクターと pEGFP-*Bcl-2* ベクターを作製し、大腸菌に移入させたところ、pEGFP-*Bcl-2* ベクターの移入は容易であったが、pEGFP-*bax* ベクターの場合は、*bax* が野生型の場合は大腸菌は死滅し、膜アンカードメイン欠損 *bax* の場合は移入することができた。しかし、ヒト肺癌細胞を用いた場合は、野生型 *bax* でも移入が可能であったが、その細胞の継代は困難であり、移入細胞はやがて死滅した。このことは、移入した野生型 *bax* はアポトーシス促進因子としての機能を有する Bax を発現させることを意味する。そこで、移入後の GFP の局在を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察したところ、その局在は内在性 Bax と同じであった。従って、Bax の核移行には何らかの輸送体に関与する可能性がさらに強く示唆された。

III. 温熱刺激やバクリタキセル処理後の Bcl-2 のリン酸化や Bax の局在とその機能との関係

Bcl-2 と Bax の相互関係をさらに詳細に検討するために、もともと Bax を細胞質内に発現している PC-10 扁平上皮癌細胞を用い、温熱刺激や微小管安定剤であるバクリタキセル処理後の Bcl-2 のリン酸化と Bax の局在の変化を検討するとともに、アポトーシス誘導との関係を検討した。温熱処理後、前述のように、Bax は核へ移行し、アポトーシスを回避する傾向が強くみられたが、この場合、Bcl-2 のリン酸化は全くみられなかった。一方、バクリタキセル処理を行うと、濃度依存的に、また、接触時間依存的に、Bcl-2 がリン酸化された。この場合、Bax は細胞質内に留まり、アポトーシスが強く誘導された。そこで、比重遠心分離法で細胞内小器官を分離採取し、Bcl-2 のリン酸化や Bcl-2 と Bax との相互作用について検討した。Bcl-2 は主にミトコンドリア分画とライソソーム分画に存在したが、Bax はミトコンドリア分画と細胞質分画に存在し、Bcl-2 と Bax が相互作用を行うのはミトコンドリア分画内のみであることが示された。バクリタキセル処理による Bcl-2 のリン酸化はミトコンドリア分画とライソソーム分画でみられた。そこで、抗 Bax 抗体を用いて免疫沈降法で検討すると、Bax と結合しているのはリン酸化していない Bcl-2 のみであり、また、Bcl-2 のリン酸化が増強されるとともに Bax に結合する Bcl-2 量も減少した。このように、Bcl-2 はリン酸化されることにより Bax との結合が阻害されたが、この場合の Bax はミトコンドリア分画に留まりアポトーシスを誘導するものと考えられる。一方、温熱刺激によっても Bcl-2 と Bax の結合は阻害されるが、この場合は、Bcl-2 はリン酸化されず、Bax は未知の輸送体と結合し、核へ移行し、アポトーシスが回避されと考えられた。

IV. ヒト肺癌培養細胞株における温熱刺激やバクリタキセル処理後の遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ法による解析

アポトーシス誘導刺激の遺伝子転写に及ぼす影響を検討するために、温熱刺激やバクリタキセル処理後に PC-10 細胞の mRNA を抽出し、逆転写法で cDNA プローブを合成し、cDNA マイクロアレイ法で解析した。検討した遺伝子数は 588 種で、機能的に 6 つのカテゴリーに分けた：がん遺伝子、がん抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子 (カテゴリー A)；ストレス反応性、イオンチャンネル・イオン輸送、細胞内刺激伝導系に関係するタンパクをコードする遺伝子 (カテゴリー B)；アポトーシス関連、DNA 合成および修復タンパクをコードする遺伝子 (カテゴリー C)；転写因子や DNA 結合タンパクをコードする遺伝子 (カテゴリー D)；受容体、細胞表面抗原、細胞接着因子をコードする遺伝子 (カテゴリー E)；および細胞間情報伝達遺伝子 (カテゴリー F)。温熱刺激により 64 の遺伝子が、バクリタキセル処理により 34 の遺伝子が、非処理の対照群に比較して増幅されていた。この内、共通して増幅されているものが、22 遺伝子あり、細胞内刺激伝導系に関するもの 4 遺伝子、アポトーシスに関連するもの 6 遺伝子、DNA 合成・修復に関連するもの 4 遺伝子、DNA 結合および転写因子に関係するもの 5 遺伝子、その他 3 遺伝子であった。しかし、この遺伝子群には一定の傾向はみられなかった。温熱刺激で増幅されるが、バクリタキセル処理では転写が抑制される遺伝子は 42 種類あり、カテゴリー D に関係するものが最も多く 19 遺伝子で、次いでカテゴリー B に属するものが 10 遺伝子あった。カテゴリー C に属するものは 6 種類であった。このことから、ストレス反応が惹起されると共に DNA 合成が活性化し、やがてはアポトーシスから逸脱する機序が明らかに推定できた。一方、バクリタキセル処理で増幅されるが、温熱刺激では転写が抑制される遺伝子は 12 種類に過ぎず、カテゴリー A が 1 種、カテゴリー C が 7 種、その他 4 種であった。カテゴリー C の 7 種も、お互いを明確に関係付ける要素は乏しく、主に翻訳後修飾によりアポトーシスが惹起されることが推定された。興味深いことは、温熱刺激によってもバクリタキセル処理によっても非処理対照よりも転写が抑制される遺伝子が 45 種類あり、その中に、*myc* や *raf1* や *ras* などのがん遺伝子が含まれていたことである。これが細胞内でどのような意味を持つのかは不明であるが、がん治療の標的として注目されていることを考えると、この結果はその可能性が低いことを示し、検討する必要性が高い。

以上のように、細胞に対するアポトーシス誘導因子の影響は複雑多彩であり、総合的な見地に立つて解析することの重要性が示されたと共に、今後の研究の方向性が示されたと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（地球環境科学）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。