

# デスレセプターを介するアポトーシス誘導に重要な 新規分子 DELE の同定とその機能解析

## 学位論文内容の要旨

Death associated protein 3 (DAP3)は、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )によって誘導されるアポトーシスに関与する分子として同定されたGTP会合タンパク質である。その後の研究により、TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、FasL (Fas ligand)およびTRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)刺激によるデスレセプターを介したアポトーシスシグナル伝達経路をはじめ、酸化ストレスによって誘導されるアポトーシスや、足場喪失に伴い誘導されるアポトーシスとして知られるアノイキスなど様々なアポトーシスの制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本研究ではDAP3と会合するその機能が未知である分子、DELE (death ligand signal enhancer)の機能を明らかとすることを目的とし、分子生物学的手法を用いた解析を行った。

DELEはyeast two-hybrid法を用いたスクリーニングによりDAP3と会合する分子として筆者が所属する研究室で見出された分子である。DELEは515アミノ酸からなる分子量約55kDaのタンパク質であり、アミノ酸配列の解析により、そのN末端領域にミトコンドリア局在シグナル配列を有すること、また機能ドメインとしてタンパク質相互の結合に関与するモチーフであるTPR (tetra-tricopeptide repeat)モチーフを有することが明らかとなった。DELE遺伝子の発現ベクターを構築し、これを細胞に発現させて免疫共沈降法による解析を行った結果、DELEとDAP3は実際に哺乳動物細胞内で会合していた。次に、DELEとEGFP (enhanced green fluorescent protein)を融合させたタンパク質(DELE-EGFP)を発現するベクタープラスミドを構築し、細胞に発現させて共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在の解析を行ったところ、DELEの局在は主にミトコンドリアに認められ、DAP3と同様の細胞内局在分布を示すことが明らかとなった。これらの結果から、DELEはDAP3の関与するアポトーシスシグナル伝達経路に関与している可能性が強く示唆された。そこでDELEの分子機能を明らかとするために、デスレセプターを介したシグナル伝達機構に注目して以下の解析を行った。

レトロウイルスベクターを用いて、DELE遺伝子を恒常的に高発現するA549細胞由来の培養細胞株を樹立し、TNF- $\alpha$ およびTRAIL刺激により誘導されるアポトーシスへの感受性について解析した。その結果、DELE遺伝子を恒常的に高発現する細胞はコントロール細胞と比較して、TNF- $\alpha$ およびTRAIL刺激によって誘導されるアポトーシスに対し、高い感受性を示すことが明らかとなった。さらに、siRNAを用いて、DELE遺伝子の発現を

抑制したHeLa細胞に、TNF- $\alpha$ およびTRAILの刺激を加え、DELE遺伝子の発現がこれらの刺激により誘導されるアポトーシスに対する感受性に影響を及ぼすか否かについて解析した。その結果、DELE遺伝子の発現を抑制した細胞ではコントロール細胞と比較して、TNF- $\alpha$ およびTRAILの刺激によって誘導されるアポトーシスが有意に抑制されることが明らかとなった。

カスパーゼの開裂による活性化は、デスレセプターを介したシグナル伝達経路によって制御されるアポトーシスをはじめ、様々なアポトーシスにおいてその誘導に重要な現象であることが知られている。そこで、DELEがカスパーゼ依存的なアポトーシスシグナル伝達経路に関与している可能性を検証した。siRNAを用いてDELE遺伝子の発現を抑制したHeLa細胞に対し、TNF- $\alpha$ およびTRAILの刺激を加え、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9およびカスパーゼ-3開裂の経時的変化を、カスパーゼに対する特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。その結果、DELE遺伝子の発現を抑制した細胞では、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9およびカスパーゼ-3のいずれにおいても、その開裂が抑制されることが明らかとなった。また、DELE遺伝子の発現抑制によって、実際にカスパーゼの活性化が阻害されるか否かを調べるために、TNF- $\alpha$ 、抗Fas抗体およびTRAILの刺激によって誘導されるカスパーゼの活性化をCaspase-Glo Assay Kit (Promega)を用いて定量的に解析した。その結果、DELE遺伝子の発現を抑制したHeLa細胞では、TNF- $\alpha$ 、抗Fas抗体およびTRAILのいずれによる刺激においても、カスパーゼの活性化が阻害されることが明らかとなった。これらの結果より、DELEはカスパーゼ活性化の制御を通じてデスレセプターを介したアポトーシスの誘導に働くものと結論づけた。

デスレセプターを介したアポトーシスシグナル伝達経路の異常はがんや自己免疫疾患をはじめ、様々な疾患の発症に関わることが知られており、本研究で見出された新規分子DELEの発現や機能の異常がこれら疾患の発症に関与している可能性が考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 忠 昭  
副 査 教 授 杉 本 千 尋  
副 査 准教授 梶 野 喜 一  
副 査 講 師 岩 井 淳

## 学位論文題名

### デスレセプターを介するアポトーシス誘導に重要な 新規分子 DELE の同定とその機能解析

DAP3は、Interferon- $\gamma$ によって誘導されるアポトーシスに関与する分子として同定されたGTP会合タンパク質である。その後の研究により、TNF- $\alpha$ 、FasLおよびTRAIL刺激によるデスレセプターを介したアポトーシスシグナル伝達経路をはじめ、酸化ストレスによって誘導されるアポトーシスや、足場喪失に伴い誘導されるアポトーシスとして知られるアノイキスなど様々なアポトーシスの制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本研究ではDAP3と会合する機能的に未知な分子をDELE (death ligand signal enhancer)と命名し、その分子機能を明らかとするために、分子生物学的手法を用いた解析を行った。

DELEは当初、機能的に未知な分子をコードするKIAA0141遺伝子の翻訳産物として、酵母two-hybrid法を用いたスクリーニングにより、DAP3 と会合する分子として論文提出者が所属する研究室で見出された分子である。免疫共沈降法を用いてDAP3とDELEの会合能について解析を行ったところ、DAP3とDELEが実際に細胞内で会合能を示すことが明らかになった。次いでDELEとEGFPを融合させたタンパク質 (DELE-EGFP) を発現するプラスミドを構築し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在の解析を行ったところ、DELEの局在は主にミトコンドリアに認められ、DAP3とほぼ同様の細胞内局在分布を示すことが明らかとなった。

レトロウイルスベクターを用いてDELEを恒常的に発現するA549細胞に由来する培養細胞株を樹立し、TNF- $\alpha$ およびTRAIL刺激により誘導されるアポトーシスへの感受性について解析を行った。その結果、DELEを恒常的に発現する細胞はコントロール細胞と比較して、TNF- $\alpha$ およびTRAIL刺激によって誘導されるアポトーシスに対し、高い感受性を示すことが明らかとなった。次いでsiRNAを用いてDELE遺伝子をノックダウンさせたHeLa細胞に、TNF- $\alpha$ およびTRAIL刺激を加え、DELE遺伝子の発現抑制がこれら刺激により誘導されるアポトーシスへの感受性について解析を行った。その結果DELE遺伝子をノックダウンさせた細胞では対照細胞と比較して、TNF- $\alpha$ およびTRAIL刺激によって誘

導されるアポトーシスが有意に抑制されることが明らかとなった。

次いでDELEがカスパーゼ依存的なアポトーシスシグナル伝達経路に関与している可能性について検証を行った。siRNAを用いてDELEの遺伝子をノックダウンさせたHeLa細胞に対し、TNF- $\alpha$ およびTRAIL刺激を加え、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9およびカスパーゼ-3開裂の経時的変化をカスパーゼに対する特異的抗体を用いたイムノブロット法により解析を行った。その結果、DELE遺伝子の発現をノックダウンさせた細胞では、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9およびカスパーゼ-3のいずれにおいても、その開裂が抑制されることが明らかとなった。次いでDELE遺伝子のノックダウンによって、実際にカスパーゼ活性化が抑制されることを確認するために、TNF- $\alpha$ 、抗Fas抗体およびTRAIL刺激によって誘導されるカスパーゼ活性をCaspase-Glo Assay Kit を用いて定量的に解析した。その結果、DELE遺伝子をノックダウンさせたHeLa細胞では、TNF- $\alpha$ 、抗Fas抗体およびTRAILの刺激により誘導されるカスパーゼ活性化が有意に抑制されることが明らかとなった。これらの結果より、デスレセプターを介したアポトーシス誘導シグナル伝達経路において、DELEはカスパーゼ活性化の制御を通じて機能しているものと結論づけた。

上述のように本研究では①yeast two-hybrid法を用いたスクリーニングによりDAP3会合分子として同定された機能的に未知な分子、KIAA0141遺伝子の翻訳産物の機能を明らかにし、DELEと名付けると共に、②DELEタンパク質が実際に細胞内でDAP3と会合能を示し、その細胞内局在もDAP3同様に主にミトコンドリアに認められる事、および③TNF- $\alpha$ 、FasL、TRAIL刺激によるアポトーシス誘導シグナル伝達経路に関わる事を明らかにした。これらの研究の成果は、生体の恒常性維持に関わる重要な現象であるアポトーシスの制御に関わる新たな分子に関する知見を提供するものである。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者原田種展君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。