

化学療法剤とp53によるアポトーシス
におけるBcl-2、Baxの関与

宮 下 俊 之

《目次》

a. 研究の目的、研究の背景 … 1

b. 研究方法 … 4

1. 細胞培養 … 4
2. 細胞増殖及び生存率の測定 … 4
3. DNAフラグメンテーション分析 … 5
4. プラスミドの作製 … 5
5. レトロウイルスによる遺伝子導入 … 6
6. イムノプロット … 7
7. RT-PCR … 7
8. ノーザンプロット … 7
9. ライブラリースクリーニング … 8
10. 一過性遺伝子導入とCATアッセイ … 8
11. 組み換えバキュロウイルスによるp53蛋白の産生 … 9
12. ゲル移動度シフト法 … 9

c. 実験結果 … 11

＜Bcl-2と化学療法剤抵抗性＞

1. *bcl-2*遺伝子導入による強制発現によりヒト白血病細胞697はグルコルチコイド耐性を獲得する … 11
2. Bcl-2細胞もステロイド存在下で増殖は阻止される … 12
3. Bcl-2細胞は様々な化学療法剤に対する耐性を獲得する … 12
4. Bcl-2細胞はいくつかの化学療法剤除去後再び増殖を始める … 12

＜p53による*bcl-2*、*bax*の発現制御＞

1. Bcl-2はp53によるアポトーシスを抑制する … 13
2. p53は*bcl-2*の転写を抑制し、*bax*の転写を活性化する … 14
3. *bax*遺伝子のプロモーター領域にはp53レスポンスエレメントと相同性のある配列が存在する … 14
4. *bax*遺伝子のプロモーターはp53により活性化される … 15
5. p53は*bax*遺伝子のp53レスポンスエレメントに*in vitro*で結合する … 16

d. 考察 … 18

e. まとめ … 22

謝辞 … 23

f. 文献 ... 24

図1 697細胞への組み換えBcl-2レトロウイルスによる遺伝子導入 ... 30

図2 Bcl-2はDEXによるアポトーシスを抑制する ... 31

図3 Bcl-2は様々な化学療法剤によるアポトーシスを抑制する ... 34

表1 697/Bcl-2は培地からDEXあるいはMTXを除くと再増殖する ... 36

図4 Bcl-2はp53で誘導されるアポトーシスを抑制する ... 37

図5 p53はM1細胞の*bcl-2*の発現を抑制する ... 38

図6 p53はM1細胞の*bax*の発現を誘導する ... 39

図7 ヒト*bax*遺伝子のプロモーター及び5'非翻訳領域の塩基配列 ... 40

図8 *bax*遺伝子プロモーターはp53によって転写活性化される ... 42

図9 -486bpから-448bpの領域がp53に反応する ... 44

図10 p53は*in vitro*で*bax*遺伝子のプロモーターに結合する ... 46

a. 研究目的、研究の背景

アポトーシス (apoptosis) はプログラムされた細胞死 (programmed cell death) とも呼ばれ、組織のホメオスタシス、免疫及び神経系の発達、胎児の発育等に重要な役割を果たしていると考えられている。アポトーシスは本来形態的特徴からつけられた名称で、細胞及び核は縮小、さらには断片化するが、細胞小器官は比較的あとまで形態が保たれる。その際DNAはエンドヌクレアーゼによりヌクレオソームの間で切断され (DNAフラグメンテーション)、電気泳動で約200bpの倍数よりなるラダーが認められる¹⁾。アポトーシスをおこした細胞はネクローシスでみられるように、その内容を放出し炎症をおこすことなく、速やかにまわりの細胞により食食される。

アポトーシスに影響を与える遺伝子は最近数多く知られるようになったが、アポトーシスを抑制する遺伝子として最初に報告されたのは*bcl-2*である。*bcl-2*は濾胞性リンパ腫の大部分でみられる14,18染色体転座[t(14;18)]のクローニングにより発見された²⁾。染色体転座により18番染色体上の*bcl-2*遺伝子のすぐ下流に14番染色体上にある免疫グロブリン重鎖遺伝子が隣接することによって、この免疫グロブリン遺伝子のエンハンサーの影響で*Bcl-2*が高度に発現するようになる。しかし当時*bcl-2*に相同性のある遺伝子が知られていなかったため、*Bcl-2*の強発現がどのように発癌に結びついているかは不明であった。1988年VauxらはIL-3依存性の細胞に*bcl-2*を遺伝子導入するとIL-3除去後の細胞の生存が著明に延長すると報告した³⁾。IL-3等のサイトカインはアポトーシスを抑えることにより細胞を維持していることがわかっていたので、*bcl-2*にはアポトーシスを抑制する機能があることが示されたことになる。癌でみられる細胞の蓄積を

$$(\text{細胞増殖}) - (\text{細胞死}) = (\text{細胞の蓄積})$$

といった式で単純化できるとすれば、*bcl-2*は細胞増殖に影響を与えず、細胞死を抑制することによって細胞の蓄積をおこす新しいタイプの癌遺伝子であるということが出来る。

私は最初に、Bcl-2が腫瘍細胞の薬剤抵抗性の指標になり得るかを知らるために、腫瘍細胞に形態的にもDNAのフラグメンテーションからもアポトーシスをおこすといわれている化学療法剤による細胞死もBcl-2が阻止するか否かを検討した。

発見当時ユニークであった**bcl-2**であるが、最近このホモログが次々とクローニングされ、**bcl-2**遺伝子ファミリーあるいはBcl-2蛋白ファミリーと言われるに至っている。この蛋白ファミリーの特徴は様々な組み合わせでホモ、あるいはヘテロダイマーをつくりアポトーシスを制御しているということである。このなかでBcl-2と、あるいは自身とヘテロ、あるいはホモダイマーをつくることがわかっているBaxは、IL-3依存性の細胞にその遺伝子を導入すると、Bcl-2とは逆に、IL-3除去後のアポトーシスを促進することが知られている⁴⁾。

一方Bcl-2蛋白ファミリー以外にもアポトーシスを制御する蛋白は知られており、そのなかに癌抑制遺伝子p53がある。p53の欠失及び異常は多くのヒトの癌において検出され、発癌において重要な抑制的役割を果たしていると考えられている⁵⁾。その機序と関連してp53の2つの機能が知られている。ひとつは細胞周期の停止であり、もうひとつはアポトーシスの誘導である。細胞周期の停止の機序として少なくとも一部は、サイクリン依存性キナーゼのインヒビターでありPCNA(proliferating-cell nuclear antigen)依存性のDNA複製も抑制するWAF1/CIP1の誘導によると考えられているが⁶⁾⁷⁾⁸⁾後者の機序に関しては現在不明である。アポトーシスはp53の欠失したマウス骨髓性白血病、ヒト大腸癌などから樹立された細胞株の一部に誘導可能なp53を導入し発現させた場合におきる⁹⁾¹⁰⁾。更にp53欠損マウスの繊維芽細胞を用いた実験で、γ線照射や化学療法剤によるアポトーシスの際p53が必要であることが示されている¹¹⁾。

私はまず、Bcl-2により阻止されるアポトーシスと、p53により誘導されるアポトーシスが同じ経路にあるか否かを検討した。その結果p53により誘導されるアポトーシスはBcl-2により抑制されることがわかった。そこでp53によりアポトーシスが誘導される際、内因性の**bcl-2**と、アポトーシスのインデューサーであるbaxがp53によりどのように転写制御されているかを解析し、その結果わかったp53によるbaxの転写活性化の分子機構

の解明を試みた。

b. 研究方法

1. 細胞培養

B前駆型白血病由来697¹²⁾、肺癌由来H358¹³⁾、前立腺癌由来Tsu-prl¹⁴⁾の各細胞株は50u/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、10%非動化牛胎児血清添加RPMI1640培地で培養した。子宮頸癌由来HeLa細胞株は50u/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、10%非動化牛胎児血清添加DMEM培地で培養した。骨肉種由来Saos-2細胞株¹⁵⁾は上記の培地に0.1mg/mlビルビン酸と非必須アミノ酸を添加した。以上は全てヒト細胞株である。マウス骨髓性白血病由来M1細胞株⁹⁾は50u/mlペニシリン、0.1mg/mlストレプトマイシン、10%非動化馬血清添加DMEM培地で培養した。

2. 細胞増殖及び生存率の測定

細胞生存率の測定は697あるいはM1細胞を各々の培地に 2.5×10^5 /mlの濃度でまき、薬剤処理あるいは温度変化を施し、一定時間後に0.4%トリパンブルー、あるいは50 μ g/ml沃化プロビジウム (PI) で染色した。

また同様に3日間の薬剤処理後、ハンクス平衡塩溶液で3回洗浄して薬剤を除去し、30mmの培養デッシュを用いて0.3%の軟寒天1mlに 2.5×10^4 の細胞をまき、2週間後にコロニー数を数えた。

細胞の増殖は697細胞を96穴培養プレートに1穴あたり 6×10^3 (100 μ l) まき、 10^{-7} Mのデキサメサゾン (DEX) の存在下あるいは非存在下で16時間培養後、0.5 μ Ciの³H-チミジンを加え8時間後に細胞をガラスフィルターに回収しシンチレーションカウンターで³H-チミジンの取り込みを測定した。

3. DNAフラグメンテーション分析

薬剤処理24時間後697細胞 10^6 を回収し、Sorensonらの方法で電気泳動を行い、DNAを臭化エチジウムで染色した¹⁶⁾。

4. プラスミドの作製

Bcl-2組み換えレトロウイルス発現ベクターの作製

pB4プラスミド¹²⁾ から910bpのヒト*bcl*-2 cDNA *Eco*RI断片を得、クレノー酵素で断端を平滑化し、*Bgl*IIリンカーを付加した後、レトロウイルス発現ベクターpZip-neo¹⁷⁾ の*Bam*HI部位にサブクローニングした (pZip-*Bcl*-2) (図1)。

bax-CATプラスミドの作製

*bax*プロモーターを含む371bpの*Sma*I-*Sac*I断片 (図7及び図8Aの318bpから687bpに相当、以下数字のみを記す) をライブラリースクリーニングの項で述べるTM604-4から切り出し、*Hind*IIIで切ったプロモーターをもたないクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) プラスミドであるpUCSV0CAT¹⁸⁾ に平滑断端にした後サブクローニングした。94bpの*Dde*I-*Dde*I断片 (415から508、図9A参照) はTM604-4から切り出し、*Bgl*IIで切断したエンハンサーの欠損したSV40プロモーターをもつpA10CATBS¹⁹⁾ に平滑断端でサブクローニングした。

合成オリゴヌクレオチドAとB (それぞれ5'-GATCTCACAAGTTAGAGACAAG-CCTG-3'及び5'-TCGACAGGCTTGTCTCTAACTTGTGA-3') をアニールさせ、pA10CATBSの*Bgl*IIと*Sal*I部位にサブクローニングして464から486を含むプラスミドを作製した (以下図9B参照)。合成オリゴヌクレオチドCとD (それぞれ5'-GATCGAGACCAAGCCTGGGCGTGGGCTATATTG-3'及び5'-TCGACAATATAGC-CCACGCCCAGGCTTGTCTC-3') を用いて同様に448から475を含むプラスミドを作つ

た。486から448を含むプラスミドはオリゴマーAとDをアニールさせクレノー酵素で断端を平滑化し、BglIIで切断したpA10CATBSに平滑断端でサブクローニングして作製した。

4 この塩基置換を有する94bpのDdeI-DdeI断片をもつプラスミドはHoらの方法に準じてPCR法を用いて作製した²⁰⁾。用いた4このプライマーは5'-GAAGATCTGAGACGG-GGTTATCTCTT-3' (下線部BglIIサイト) 5'-CGCGTCGACTGAGTGGTTTTGTTTTT-3' (下線部SalIサイト) 5'-AAGTTAGAGAT AAT GCTGGGCGTAGG-3'、5'-CCTACGCCAGCA TTA TCTCTAACTT-3' (袋文字は塩基置換を表わす) である。最終的なPCR産物はBglIIとSalIで消化後、pA10CATBSのBglII、SalI部位にサブクローニングした。PCR反応にはPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、予想通りの塩基置換を実際もつことをDNAの塩基配列から確認した。

5. レトロウイルスによる遺伝子導入

pZip-Bcl-2及びpZip-neoを同種指向性ウイルスのパッケージング細胞である ψ 2に磷酸カルシウム法で遺伝子導入し、2日後に ψ 2の培養上清を異種指向性ウイルスのパッケージング細胞であるPA317²¹⁾に加え、2日めからG418 (800 μ g/ml) で選択し、耐性クローンを得た。このなかで最も高いウイルスタイトをもつクローンを697細胞の感染に用いた。697細胞の感染はこのクローンとの混合培養によった。2週間の混合培養の後、G418 (750 μ g/ml) で選択した。

M1/Neo及びM1/p53はDr. D. Liebermannより供与をうけた。M1/p53/Bcl-2はM1/p53に組み換えレトロウイルスpLXSHD/Bcl-2²²⁾を産生するパッケージング細胞であるPA317 (Dr. M. Hoshimaruより供与) の培養上清を加え、ポリプレンの存在下に感染させた。感染後2日めからヒスチジノール (4.5mM) で選択した。

6. イムノプロット

イムノプロットはReedらの方法によった²³⁾。100 μ gの細胞ライゼートをBcl-2の検出には12%、グルココルチコイドリセプターの検出には7.5%のSDS-PAGEで解析した。ニトロセルロースフィルターに転写後、ウサギ抗ヒトBcl-2血清²³⁾、あるいはウサギ抗ヒトグルココルチコイドレセプター血清 (Dr. Cidlowski より 供与) と反応後、0.25 μ Ci/mlの¹²⁵I-protein Aにて検出した。

7. RT-PCR

M1細胞のbcl-2及び β_2 -マイクログロブリンのmRNA量はRT-PCR法を用いて半定量的に解析した。cDNAの合成はモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (GIBCOBRL) とランダムヘキサマーを用いて行った。PCR反応に用いたプライマーはbcl-2の増幅には5'-TGCACCTGAGCGCCTTCAC-3' と 5'-TAGCTGATTGACCATTTGCCTGA-3' を、 β_2 -マイクログロブリンの増幅には5'-ATGGCTCGCTCGGTGACCCTAG-3' と 5'-TCATGATGCTTGATCACATGTCTCG-3'を用いた。反応後サンプルはアガロースゲルで電気泳動の後、ナイロンメンブレンに転写し、³²Pで末端標識したオリゴヌクレオチドをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブはbcl-2には5'-CCAGGAGAAATCAAACAAAGG-3' を、 β_2 -マイクログロブリンには5'-GCTACGTAACACAGTTCCAC-3'を用いた。PCRの反応サイクルは94℃ 30秒、57℃ 30秒、72℃ 3分で3サイクル毎に増幅の程度をみて、反応が飽和する前のサンプルで解析を行った。

8. ノーザンプロット

15 μ gの全RNAを2.2Mのホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルで電気泳動後、

10XSSCでナイロンメンブレンに転写した。ハイブリダイゼーションはランダムプライマー法で³²P標識したマウス *bax* 及びマウス β_2 -マイクログロブリンプローブとハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide, 10% dextran sulfate, 1M NaCl, 1% SDS, 1X Denhardt's solution, 25mM Tris [pH 7.4], 50 μ g/ml denatured salmon sperm DNA) を用いて行った。洗浄は2XSSC、0.1%SDSを使い室温、更に68℃で行った。

*bax*プローブの作製にはマウス *bax* の全オープンリーディングフレームをRT-PCR法で増幅し、pSKIIプラスミド (Stratagene) にサブクローニングした。用いたプライマーは 5'-GGAATTTCGCGGTGATGGACGGGTCCGG-3' と 5'-GGAATTCTCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3'である (下線部はサブクローニングを容易にするために付加したEcoRIリンカーである)。

9. ライブラリースクリーニング

pWE15コスミドベクターを用いたヒト胎盤DNAライブラリー (Stratagene) を³²Pで標識したマウス *bax* cDNAをプローブにしてスクリーニングした。その結果得られたコスミドクローンのうちTM597-2をBamHIで消化し、*bax*のプロモーターを含む約4 kbの断片をpSKIIプラスミドにサブクローニングし (TM604-4)、サンガー法でDNAの塩基配列を決定した。

10. 一過性遺伝子導入とCATアッセイ

細胞は6穴プレート (直径約35mm) を用い70%コンフルエント時に行った。各穴の細胞に3 μ gのp53発現ベクター (pCMVp53wt, pCMVp53₁₇₉ [Dr. Ungerより供与²⁴⁾] 及び空の発現ベクターpRcCMV [Invitrogen])、3 μ gのCATプラスミド及び1 μ gのpCMV β Gal²⁵⁾ を30 μ gのリポフェクチン (GIBCOBRL) を用いて2.5mlのHL-1培地 (Ventrex) のもとで16時間かけて遺伝子導入した。導入後48時間後に細胞をセルスク

レイバーを用いて回収し、ハンクス平衡塩溶液で洗浄後100 μ lの0.25M Tris (pH 7.8)に浮遊させ、凍結融解を3回繰り返してから遠心し細胞ライゼートを得た。

CATアッセイは30 μ lの細胞ライゼートと0.2 μ Ciの[acetyl- 3 H] coenzyme A (4.48Ci/mmol)を用いてPfahlらの方法に準じて行った²⁶⁾。CAT活性は β -ガラクトシダーゼ活性で除した相対的活性として表わした。両活性の測定の際、標準酵素を用いて標準曲線を求め、各サンプルに含まれる酵素活性値が標準曲線の直線領域にあることを毎回確認した。

11. 組み換えバキュロウイルスによるp53蛋白の産生

pCMVp53wt及びpCMVp53₁₇₉をHindIIIで消化し、クレノー酵素で断端を平滑化した後XbaIで切断した。その結果生ずるp53のcDNA断片をSmaI、XbaIで消化したバキュロウイルストランスファーベクターpVL1393 (Pharmlngen) にサブクローニングした。Pharmlngenのプロトコルに従い、Sf9昆虫細胞にこれらの組み換えバキュロウイルストランスファーベクターとBakulogoldウイルスDNAを同時に遺伝子導入し、組み換えバキュロウイルスを得た。

p53蛋白の産生にはSf9細胞を高タイターの組み換えバキュロウイルスで感染させた。感染後3日の細胞からプロテアーゼ阻害剤を含む1% NP40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 10% グリセロール, 50mM Tris (pH 8.0)を用いてライゼートを得た。ライゼートはゲルシフト用バッファー (EMSAバッファー、b.12.で詳説) で透析して以下の実験に供した。

12. ゲル移動度シフト法

合成オリゴヌクレオチドAとD (b.4.参照) をアニールさせ、クレノー酵素で断端を平滑化する際 [α - 32 P] dCTPを用いて標識した。4 この塩基置換を有する同様のプローブも合成オリゴ5'-GATCTCACAAATTTAGAGATAATGCTG-3' と5'-TCGACAATATA-

GCCTACGCCCAGCATTA TCTC·3' (袋文字は塩基置換を表わす) を用いて作製した。
p53wtあるいはp53₁₇₉を発現しているSf9ライゼート及び非感染Sf9ライゼート (2μg) を
一部は抗p53モノクローナル抗体 (0.5μg DO-1 [Santa Cruz Biotechnology] と0.5μg
Pab421 [Oncogene Science] の混合物) と反応させた。その後0.5μgのソニケート済サケ
精子DNAと7μlのEMSAバッファー (20mM HEPES [pH 7.5], 0.1M NaCl, 1.5mM MgCl₂,
10mM dithiothreitol, 20% glycerol, 0.1% TritonX-100, 1mM PMSF, 10μg/ml pepstatin,
10μg/ml leupeptin) を加え25℃、10分反応した。その後³²Pで標識した上述の二重鎖オ
リゴマー (4X10⁵ cpm) を加え、25℃、20分反応した。

サンプルは1XTBEを用いた4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ゲルの乾燥後
オートラジオグラフィーを行った。

c. 実験結果

<Bcl-2と化学療法剤抵抗性>

1. bcl-2遺伝子導入による強制発現によりヒト白血病細胞697はグルココルチコイド耐性を獲得する

腫瘍細胞の化学療法剤感受性にBcl-2が影響を与えるか否かをみるために、種々の化学療法剤に感受性のあるヒトB前駆細胞白血病細胞株697にヒトBcl-2組み換えレトロウイルス (pZip/Bcl-2) を感染させた。対照としてBcl-2をもたないレトロウイルス (pZip/Neo) の感染も平行して行い、G418により感染細胞の選択の後、それぞれ697/Bcl-2及び697/Neoを得た。ウエスタンブロット法にて697/Neoは極少量の内因性Bcl-2を発現していたが、697/Bcl-2のBcl-2発現量はそれよりはるかに高く、少なくとも14,18染色体転座をもつ濾胞性リンパ腫由来の細胞株に匹敵する量であった (図1及び未発表データ)。尚697/Neoと697/Bcl-2でグルココルチコイドレセプターの発現量に違いはみられなかった。

これらの細胞をまず様々な濃度の合成グルココルチコイドであるデキサメサゾン (DEX) の存在下で培養し、トリパンブルーの排除能により細胞の生存率をみたところ、697/Neoでは 10^{-7} MのDEXで2日後にはほぼ死滅したのに対し、697/Bcl-2はその100倍の 10^{-5} Mにでもほとんど細胞死はみられなかった (図2A)。

同様の結果はDNAのフラグメンテーション分析からも確認された (図2B)。すなわち697及び697/NeoではDEX処理24時間後、著名なDNAフラグメンテーションがみられたが、697/Bcl-2ではt(14;18)を有しBcl-2を高発現している濾胞性リンパ腫由来細胞株380と同様、DNAフラグメンテーションは認められなかった。

2. Bcl-2細胞もステロイド存在下で増殖は阻止される

次にBcl-2は多剤耐性遺伝子 $mdr-1$ にみられるように薬剤存在下における増殖能も付与しうるかを検討した。DEXの存在下、及び非存在下にて両細胞を16時間培養後、 ^3H -チミジンを添加して更に6時間培養し、その取り込みを解析したところ、697/Bcl-2も697/Neo同様DEXの存在下では ^3H -チミジンの取り込みはほとんどみられず、細胞増殖は停止することがわかった（図2C）。このことは現在わかっている多剤耐性遺伝子と明らかに異なる点である。

3. Bcl-2細胞は様々な化学療法剤に対する耐性を獲得する

更に白血病やリンパ腫に対しよく用いられるそのほかの化学療法剤に対する感受性をPIの排除能をFACSで解析することにより調べたところ、今回用いた全ての薬剤に対して697/Bcl-2は697/Neoに比べ、著しい抵抗性を示した（図3）。その他にも図3の実験には用いなかったanthracyclin系の薬剤（ドキソルビシン、ダウノマイシン）に対しても697/Bcl-2は抵抗性を獲得することがわかっている（未発表データ）。しかしいずれの薬剤に対してもDEXでみられたほど完全な抵抗性は示さなかった。697の他にマウスのリンパ腫、胸腺腫由来のT細胞株S49.1及びWEHI7.2を用いて同じ実験を行ったが同様の結果が得られた²⁷⁾。

4. Bcl-2細胞はいくつかの化学療法剤除去後再び増殖を始める

一般に化学療法剤は骨髓抑制を考慮して間歇的に投与される。そこで化学療法の間でおきる腫瘍細胞の再増殖にBcl-2が影響を与えている可能性を検討した（表1）。前述の両細胞株を3日間DEX、メソトレキセート（MTX）、ビンクリスチン（VC）の存在下で培養後これらの薬剤を除去し、軟寒天培地にまいて生ずるコロニーを数えた。

697/Bcl-2はDEX処理の場合、無処理の場合に比べ約半数のコロニーを生じた。MTX処理においても少数の（無処理の6%以下）コロニーを生じたが、VCを用いた場合にはコロニーは認められなかった。697/Neoからはほとんどコロニーを生じなかった。

これらの結果からBcl-2によりある種の薬剤に対し抵抗性を獲得し、その薬剤存在下で生き残った697細胞はその薬剤の除去後再び増殖を始めることが示された。しかしVCでは無処理の場合と同数の生細胞を用いても697/Bcl-2からはコロニーが認められなかった。

<p53による *bcl-2*、*bax* の発現制御>

1. *Bcl-2* は p53 によるアポトーシスを抑制する

まず、様々な原因によっておこるアポトーシスを抑制することがわかってきたBcl-2が、癌抑制遺伝子p53によって誘導されるアポトーシスを抑制するか否かを検討した。

マウスの骨髄性白血病細胞株M1はp53遺伝子が両アレルで欠損しておりp53蛋白は発現していない⁹⁾。このM1に温度感受性p53を遺伝子導入した細胞（M1/p53）とコントロールプラスミドを導入した細胞（M1/Neo）を用いて以下の実験を行った。この温度感受性p53はマウスのp53の135番目のアミノ酸がアラニンからヴァリンに換わっており、37℃ではmutantの構造をとるが32.5℃ではwild-typeの構造に変わるものである²⁸⁾。

M1/p53の培養条件を37℃から32.5℃に下げると細胞は時間とともに図4にみられるような生存曲線を描いて19時間後には約60%、48時間後にはほぼすべてが死滅する。一方M1/Neoは温度変化だけではほとんど生存率に影響はなかった。このp53による細胞死もアポトーシスであることがわかっている⁹⁾。

そこで様々な原因によるアポトーシスを阻止するBcl-2がp53により誘導されるアポトーシスも抑制できるかを調べるために、M1/p53に更にヒト*bcl-2*をヒスチジノール脱水素

酵素のマーカ－をもつ組み換えレトロウイルス (pLXSHD/Bcl-2) を感染させることにより導入し、M1/p53/Bcl-2を得た。M1/p53/Bcl-2の温度変化後の生存はM1/p53に比して有意に延長し、19時間後には約90%の生存率を示し、48時間後にも30%以上が生存していた (図4)。

これらのことよりBcl-2はp53によるアポトーシスを阻止することがわかり、Bcl-2により阻止されるアポトーシスと、p53により誘導されるアポトーシスが同じ経路にあることが示された。

2. p53は*bcl-2*の転写を抑制し、*bax*の転写を活性化する

M1細胞は内因性のBcl-2を比較的高レベルに発現しているにもかかわらずp53によりアポトーシスをおこすため、温度変化によりwild-typeのp53を発現させることにより、内因性の*bcl-2*、及び*bcl-2*とは反対にアポトーシスを誘導することが示されている*bax*の発現量がどのように変化するかを検討した。

前述したM1/Neo及びM1/p53を用いて温度変化前と変化後に経時的にRNAを採取し、*bcl-2*と*bax*の発現量をそれぞれRT-PCR法、ノーザンブロット法で解析した結果、*bcl-2*は温度変化後発現量の低下がみられ、*bax*は上昇することがわかった (図5、6)。デントメーターで、 β_2 -マイクログロブリンを内部コントロールとして相対的mRNA発現量を解析すると、*bcl-2*は4時間後に約70%、20時間後には約10%以下に低下するのに対し、*bax*は4時間後には2.5倍の上昇がみられた。このことよりwild-typeのp53は*bcl-2*のリプレッサーであり*bax*のインデューサーであることがわかった。

3. *bax*遺伝子のプロモーター領域にはp53レスポンスエレメントと相同性のある配列が存在する

*bax*がp53によりどのようなメカニズムで誘導されるかをみるために、ヒト*bax*遺伝子

をクローニングし、そのプロモーター領域の構造を解析した。p53は転写因子であり様々な遺伝子の転写を調節している。そのうちp53による転写活性化はp53が特異的なDNA配列（p53レスポンスエレメント）に結合することにより生ずることがわかっている。その結合部位は5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3'という10bpからなる配列である。（Rはプリン、Yはピリミジンを表わす）しかしこの配列1つでは結合は不十分で0-13bp離れて同様の10bp配列があることが必要である²⁹⁾。ヒトbax遺伝子のプロモーター領域を解析していくと、TATAAボックスの約70bp上流にこのp53レスポンスエレメントがみつかった。即ち図7及び図9Bに示したように、1つのコンセンサス配列に完全に一致する10bpのほかに、上流に1bpを挟んで、更に下流に0及び6bp挟んで計3この不完全な10bpがみつかった。これらの3こは10bpのうち7bpから8bpがコンセンサス配列に一致していた。そこで次にこの配列を含むbaxのプロモーターが実際p53によって活性化されるかをCATアッセイによって解析した。

4. bax遺伝子のプロモーターはp53により活性化される

まずこのp53レスポンスエレメントを含むSmaI-SacI断片をプロモーターのないCATプラスミドにサブクローニングしてCATアッセイで用いた。p53の発現ベクターはサイトメガロウイルスのプロモーターで発現するwild-typeのヒトp53（pCMVp53_{wt}）及び179番めのアミノ酸がヒスチジンからグルタミン酸に置換しているヒト肺癌由来のmutant p53（pCMVp53₁₇₉）を用いた。細胞はヒト肺癌由来のH358を用いた。この細胞ではp53遺伝子が両アレルで欠損しておりp53蛋白は発現していない¹³⁾。この細胞にCATプラスミドをpCMVp53_{wt}、pCMVp53₁₇₉、及び空の発現ベクターのいずれかと共に遺伝子導入すると、wild-typeのp53と遺伝子導入したときのみCATの酵素活性が誘導された。このことからヒトbax遺伝子のプロモーターのうちSmaI-SacI断片がp53によるbaxの誘導に必要であることがわかった（図8A）。同様の結果はp53が欠損または不活化されている骨肉種由来Saos-2、子宮頸癌由来HeLa、前立腺癌由来Tsu-pr1細胞株でも確認された（図

8B)。

次に範囲を狭めてDdel-Ddel断片 (-486/-448) をミニマルプロモーターをもつCATプラスミドにサブクローニングして同様の解析をするとやはりwild-typeのp53と共に遺伝子導入したときのみCATの酵素活性が誘導された(図9A)。しかしこのプラスミドに図9Bに示す如く4この塩基置換をつくるとwild-typeのp53によるCATの誘導は完全に消失した。このことからp53によるbaxの誘導に対するこのp53レスポンスエレメントの重要性が更に確認された。

最後に、p53によるbaxの誘導にはすべての10bpが必要か否かをみた。中央の完全な10bpの他に上流の10bpのみを含むもの (-486/-464)、中央の完全な10bpと下流の2この10bpを含むもの (-475/-448)、すべての10bpを含むもの (-486/-448) で比較すると、前二者でもある程度の誘導はおこるものの、強い誘導にはすべての10bpが必要であることがわかった(図9A及び9B)。

5. p53はbax遺伝子のp53レスポンスエレメントに*in vitro*で結合する

実際*in vitro*でp53がbax遺伝子のプロモーターに結合するか否かをゲル移動度シフト法で検討した。wild-type及び前述の4この塩基置換を含む合成DNA断片 (-486/-448) を³²Pで標識し、組み換えバキュロウイルスにより産生されたp53_{wt}あるいはp53₁₇₉と反応させ、ポリアクリルアミド電気泳動を行った(図10)。一部の反応には抗p53モノクローナル抗体(Pab421+DO-1)を加えた。wild-typeのDNAとwild-typeのp53という反応の組み合わせの時のみ、白の矢印で示したようにシフトしたバンドが認められた。DNA、p53のいずれかをmutantに替えるとこのバンドは認められなかった。またwild-typeのDNAとwild-typeのp53の反応に抗p53モノクローナル抗体を加えたときのみ、黒の矢印で示したような更に上方にシフトしたバンドを認めた。やはりDNA、p53のいずれかをmutantに替えるとこのバンドは認められなかった。このことから4.の結果と合わせてp53蛋白はwild-type特異的にbax遺伝子のプロモーターに直接結合して転写を活性化して

いることが示された。

d. 考察

レトロウイルスを用いた遺伝子導入の実験によりBcl-2は様々な化学療法剤によるアポトーシスを抑制することがわかった。Bcl-2は多剤耐性遺伝子のように薬剤存在下での増殖能まで付与するものではないが、ある種の薬剤が除去された場合、生存している細胞は再び増殖を開始することも示された。

このことからBcl-2の発現量は白血病やリンパ腫の薬剤反応性、更には予後の指標になる可能性がある。実際、Bcl-2のアンチセンスオリゴヌクレオチドはB細胞リンパ腫細胞をSCIDマウスに投与した場合、リンパ腫の発症を抑えたという報告があり、更に白血病細胞のBcl-2の発現量と薬剤感受性が逆相関するという報告や、再発の症例で初発の症例よりBcl-2の発現が高かったという報告がある³⁰⁾³¹⁾³²⁾。しかし臨床症例における予後との比較では必ずしも一致した見解が得られていない。すなわちBcl-2の発現が高い症例は予後が悪いという報告がある一方で、両者には相関がみられなかったというものの、あるいは乳癌など固形腫瘍ではそれとは逆の相関がみられたとする報告もある³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾。

これらの報告のなかには症例数が少ないものや治療法が統一されていないものもあるが、固形腫瘍ではBcl-2の発現が、少ない分裂像、高分化、p53陰性（組織染色でp53陰性の場合p53がwild-typeのことが多い）といった予後を良好にする他の因子と相関していることがあり、それらの影響を強く受けているものと思われる。

更に最近Bcl-2のホモログが次々とクローニングされておりその多くがアポトーシスを制御していることがわかっているため、Bcl-2以外のホモログも考慮にいれて検討しなければならない可能性がある。

今回用いた化学療法剤はDNAの損傷以外にもDNAの合成障害（MTX, AraC）、微小管の損傷（VC）、転写因子である受容体の活性化（DEX）といった様々な薬効機序をもつ点から、Bcl-2は多くのアポトーシスの経路に作用していると考えられる。従ってBcl-2の作用機序の解明は現在まだ未解決のアポトーシスの分子機構の理解にとって重

要であると思われる。特にグルコルチコイドによるアポトーシスはBcl-2によって完壁に阻止されており、グルコルチコイド及びその受容体の機能がかなり詳細にわかっていることと合わせて、この系はBcl-2の作用機序の解明のための良いモデルと考えられる。

しかしDEX以外の化学療法剤に対する耐性は部分的なものであった。このことから化学療法剤による細胞死の一部はBcl-2が作用しない経路によっておこっていることが示唆され、それらの中にはネクローシスによる細胞死も含まれる可能性がある。

bcl-2遺伝子ファミリー以外にもアポトーシスを制御する遺伝子はいくつも知られるようになった。そのなかにはc-myc, v-ablなどの癌遺伝子やp53といった癌抑制遺伝子があり、アポトーシスと発癌はますます重要視されるようになっていく^{36,37)}。癌細胞において最も高頻度に変異のみられる癌抑制遺伝子p53によっておきるアポトーシスの経路と、様々なアポトーシスを抑制するBcl-2が関与する経路がどのような関係にあるかを解明するため、まずp53によっておきるアポトーシスがBcl-2により抑制されるか否かを検討した。

p53欠損マウス骨髓性白血病細胞株M1に温度感受性p53を遺伝子導入すると、温度依存性に、すなわち培養条件を37℃から32.5℃に下げるとアポトーシスをおこす。そこに更にBcl-2を強制発現させたところ、アポトーシスは著明に阻止されることがわかった。このことからp53とBcl-2は共通のアポトーシスの経路に関与しており、更にBcl-2はp53の下流に関わっていると考えられる。

この実験でBcl-2によるアポトーシスの抑制が完全でなかった理由として、ひとつは強制発現されたBcl-2の量が十分でなかった可能性がある。その他にp53によるアポトーシスの制御にBcl-2だけでなくBcl-XLなどのBcl-2蛋白ファミリーも関与している可能性もある³⁸⁾。しかしBcl-2はp53によるアポトーシスを完全に阻止するという報告もあり、阻止の程度は細胞株によるようである^{39,40)}。

M1が内因性のBcl-2を比較的強く発現しているにもかかわらずp53によりアポトーシスをおこす理由のひとつは、Bcl-2の発現はp53により抑制されるためであることが示さ

れた。更にアポトーシスを誘導することが知られている *bax* が *p53* により転写活性化されることがわかり、その分子機構は *p53* の *bax* プロモーターへの直接の結合であることがわかった。

現在このような *p53* の標的遺伝子として *WAF1/CIP1*、*gadd45* 等 6 つほど知られており、*p53* による細胞周期の停止を説明する根拠として注目されている⁷⁴¹⁾。実際 *WAF1/CIP1* 欠損マウスでは G1 チェックポイントに障害が認められている⁴²⁾。しかし *p53* のもう一つの機能であるアポトーシスの誘導の機構に関してはまだ不明である。今回明らかになった *p53* による *Bcl-2* の発現抑制と *Bax* の発現誘導は *p53* によるアポトーシスの誘導に関わっている可能性がある。

しかし *wild-type* の *p53* をもつ腫瘍細胞でも γ 線照射で *bax* の誘導のおきるものとおきないものがあることが報告され、この誘導機序には更に複雑なメカニズムが働いていると考えられる⁴³⁾。

更に最近の報告では *Bax* 欠損マウスでも胸腺細胞では γ 線照射によるアポトーシスは正常におこるという⁴⁴⁾。このことから *Bax* のアポトーシスにおける役割は細胞や組織によって異なる可能性、また *Bad*, *Bak* といった *Bcl-2* ファミリーの他のメンバーも *Bax* と重複したアポトーシスを誘導する役割を果たしている可能性が考えられる⁴⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾。最近やはりアポトーシスの誘導に重要な役割を演じている *Fas/APO-1* も *p53* によって直接誘導されることが示され、*Fas/APO-1* も *p53* によるアポトーシスに関与している可能性があり注目される⁴⁹⁾。

p53 は転写活性化以外に、*p53* レスポンスエレメントをもたないいくつかの遺伝子の転写を抑制することが知られており⁵⁰⁾、細胞の生存に必要な何らかの遺伝子の発現を抑えることもアポトーシスの誘導機序として考えられる。その他に *p53* がアポトーシスを制御する蛋白と結合することにより転写因子とは別の機構でアポトーシスを導く可能性もある。

p53 によるアポトーシスの誘導の機序解明はまだ始まったばかりであるが、統一された一つのメカニズムで説明することはむずかしそうである。上記の可能性を組織あるい

は分化段階による違いも考慮しながら一つ一つ検討していく必要がある。

e. まとめ

Bcl-2は白血病細胞において様々な化学療法剤によるアポトーシスを阻害することを明らかにした。このことからBcl-2は腫瘍細胞の薬剤耐性を決める重要な因子の一つであると考えられる。

p53によっておこるアポトーシスのメカニズムは複雑でまだ解明されていないが、p53によるBcl-2の発現抑制とBaxの発現誘導が関与している可能性を示し、更にbaxはp53が直接そのプロモーターに結合する標的分子であることを示した。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲頂いた東京大学小児科柳沢正義教授、御指導頂いたラホヤ癌研究所 (La Jolla Cancer Research Foundation) Dr. John C. Reedに深謝致します。

f. 文献

- 1) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., and Currie, A. R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
- 2) Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- 3) Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
- 4) Oltvai Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- 5) Hollstein, M., Sidranski, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- 6) Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. j. (1993). The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- 7) El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- 8) Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.
- 9) Yonish-Rouach, E., Resnitzki, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.

10) Shaw, p., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., and Costa, J. (1992). Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4495-4499.

11) Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849.

12) Tsujimoto, Y., and Croce, C. M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 5214-5218.

13) Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J., Rosenberg, R. K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1989). p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246, 491-494.

14) Pflug, B. R., Onoda, M., Lynch, J. H., and Djakiew, D. (1992). Reduced expression of the low affinity nerve growth factor receptor in benign and malignant human prostate tissue and loss of expression in four human metastatic prostate tumor cell lines. *Cancer Res.* 52, 5403-5406.

15) Chen, P. L., Chen, Y. M., Bookstein, R., and Lee, W. H. (1990) Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250, 1576-1580.

16) Sorenson, C. M., Barry, M. A., and Eastman, A. (1990). Analysis of events associated with cell cycle arrest in G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 749-755.

17) Cepko, C.L., Roberts, B.E., and Mulligan, R.C. (1984). Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 37, 1053-1062.

18) Fukamizu, A., Tanimoto, K., Uehara, S., Seo, M. S., Handa, S., Takahasi, S., Imai, T., and Murakami, K. (1991). Regulation of human renin and angiotensinogen genes. *Biomed. Biochim. Acta.* 50, 4-6.

19) Spalholz, B. A., Lambert, P. F., Yee, C. L., and Howley, P. M. (1987). Bovine

papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region. *J. Virol.* 61, 2128-2137.

20) Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.

21) Miller, D. A., and Buttimore, C. (1986). Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell Biol.* 6, 2895-2902.

22) Stockshlaeder, M. A., Storb, R., Osborne, W. R., and Miller, A. D. (1991). L-histidinol provides effective selection of retrovirus-vector-transduced keratinocytes without impairing their proliferative potential. *Hum. Gene Ther.* 2, 33-39.

23) Reed, J. C., Meister, L., Tanaka, S., Cuddy, M., Yum, S., Geyer, C., and Pleasure, D. (1991). Differential expression of bcl-2 protooncogene in neuroblastoma and other human cell lines of neural origin. *Cancer Res.* 51, 6529-6538.

24) Unger, T., Nau, M. M., Segal, S. and Minna, J. D. (1992). Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. *EMBO J.* 11, 1383-1390.

25) MacGregor, G. R., and Caskey, C. T. (1989). Construction of plasmids that express *E. coli* β -galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 2365.

26) Pfahl, M., Tzukerman, M., Zhang, X., Lehman, J. M., Herman, T., Wills, K. N., and Graupner, G. (1990). Nuclear retinoic acid receptors: cloning, analysis, and function. *Methods Enzymol.* 189, 256-270.

27) Miyashita, T., and Reed, J. C. (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 52, 5407-5411.

28) Michalovitz, D., Halevy, O., and Oren, M. (1990). Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62,

671-680.

29) El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet.* 1, 45-49.

30) Cotter, F. E., Johnson, P., Hall, P., Pocock, C., al-Mahdi, N., Cowell, J. K., and Morgan, G. (1994). Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* 9, 3049-3055.

31) Maung, Z. T., MacLean, F. R., Reid, M. M., Pearson, A. D., Proctor, S. J. Hamilton, P. J., and Hall, A. G. (1994). The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* 88, 105-109.

32) Campos, L., Rouault, J. P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., Archimbaud, E., Magaud, J. P., and Guyotat, D. (1993). High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81, 3091-3096.

33) Yunis, J. J., Mayer, M. G., Arnesen, M. A., Aeppli, D. P., Oken, M. M., and Frizzera, G. (1989). bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 320, 1047-1054.

34) Gala, J. L., Vermynen, C., Cornu, G., Ferrant, A., Michaux, J. L., Philippe, M., Martiat, P. (1994). High expression of bcl-2 is the rule in acute lymphoblastic leukemia, except in Burkitt subtype at presentation, and is not correlated with the prognosis. *Ann. Hematol.* 69, 17-24.

35) Joensuu, H., Pylkkanen, L., and Toikkanen, S. (1994). Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 145, 1191-1198.

36) Askew D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C., and Cleveland, J. L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915-1922.

37) McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K. M., Green, D. R., and Cotter, T.

G. (1994). BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83, 1179-1187.

38) Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunes, G., and Thompson, C. B. (1993). *bcl-X*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608

39) Wang, Y., Szekely, L., Okan, I., Klein, G., and Wiman, K. G. (1993). Wild-type p53-triggered apoptosis is inhibited by Bcl-2 in a v-myc-induced T-cell lymphoma line. *Oncogene* 8, 3427-3431.

40) Chiou, S., Rao, L., and White, E. (1994). Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 14, 2556-2563.

41) Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, Jr. A. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and *GADD45* is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-597.

42) Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.

43) Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillof, C., Liebermann, D. A., O'Connor, P. M., and Fornace, Jr. A. J. (1994). Induction of *bax* by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9, 3743-3751.

44) Knudson, C. M., Tung, K. S. K., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A. J., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-99.

45) Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.

- 46) Farrow, S. N., White, J. H. M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K., Grinham, C. J., Martinou, J.-C., and Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.
- 47) Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Conner, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., and Guild, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 733-736.
- 48) Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, D., and Barr, P. J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736-739.
- 49) Owen-Schaub, L., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W., Kruzel, E., and Radinsky, R. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce FAS/Apo-1 expression. *Mol. Cell Biol.* 15, 3032-3040.
- 50) Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 9979-9983.

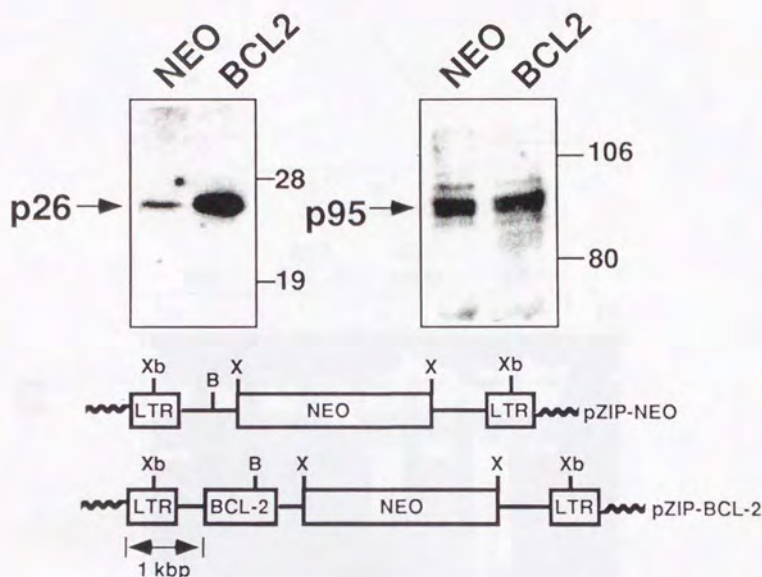
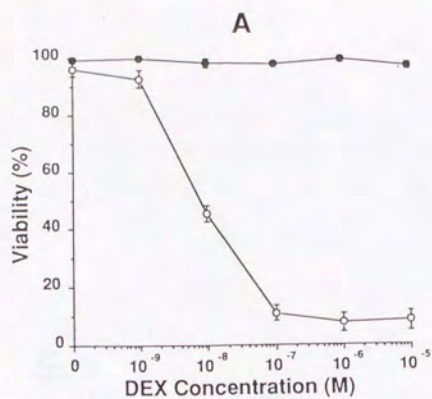


図1 697細胞への組み換えBcl-2レトロウイルスによる遺伝子導入

レトロウイルスベクターpZip-Bcl-2を用いて異種指向性組み換えレトロウイルスを作製し感染に用いた。細胞ライゼートをpZip-NeoあるいはpZip-Bcl-2を感染させた細胞より調整し、100 μ gの蛋白を用いてSDS-PAGEを行いニトロセルロースフィルターにプロットした。フィルターをウサギ抗ヒトグルコシルチコイドレセプター抗体 (95-Kd)、ウサギ抗ヒトBcl-2抗体 (26-Kd) と反応させた。

LTR, Moloney leukemia virus long terminal repeat; NEO, G418-resistance gene; B, BamHI; Xb, XbaI; X, XhoI



B

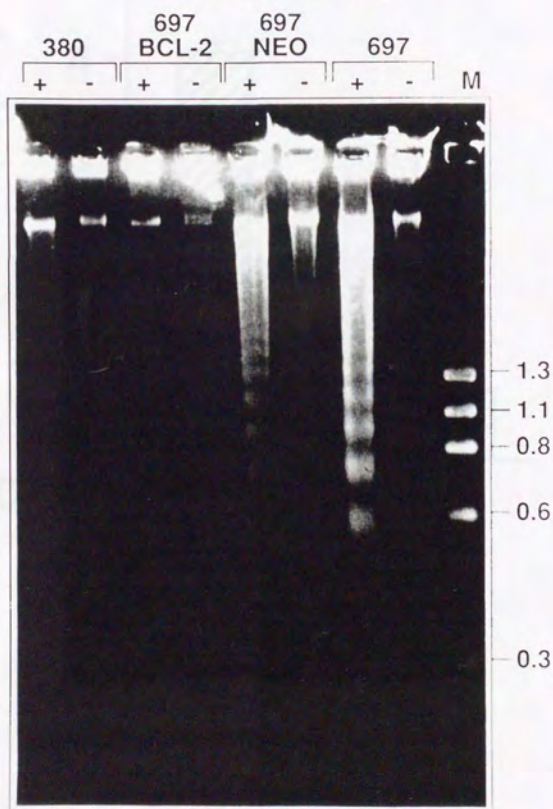
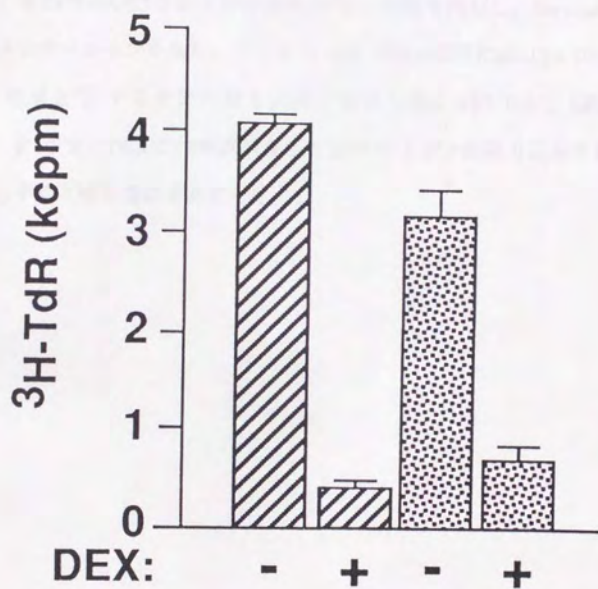


图 2

C



2

図2 Bcl-2はDEXによるアポトーシスを抑制する

A. 697/Bcl-2 (●) と 697/Neo (○) を様々な濃度のDEXの存在下に培養し、2日後に細胞の生存率をトリパンブルーの染色で求めた。3回の実験から平均と標準偏差を計算した。

B. 697/Bcl-2、697/Neo、697 (非感染親株)、380 (t(14;18)を有する濾胞性リンパ腫由来細胞株) を24時間DEX存在下で培養後 10^6 この細胞を回収し、Sorensonらの方法でDNAフラグメンテーションをみた。マーカー (M) はHaeIII消化 ϕ X-174 DNAである。

C. 細胞の増殖を ^3H -チミジンの取り込みで解析した。697/Bcl-2 (斜線) 及び 697/Neo (点) を 10^{-7}M のDEXで16時間培養した後 ^3H -チミジンの取り込みを測定した。3回の実験から平均と標準偏差を計算した。

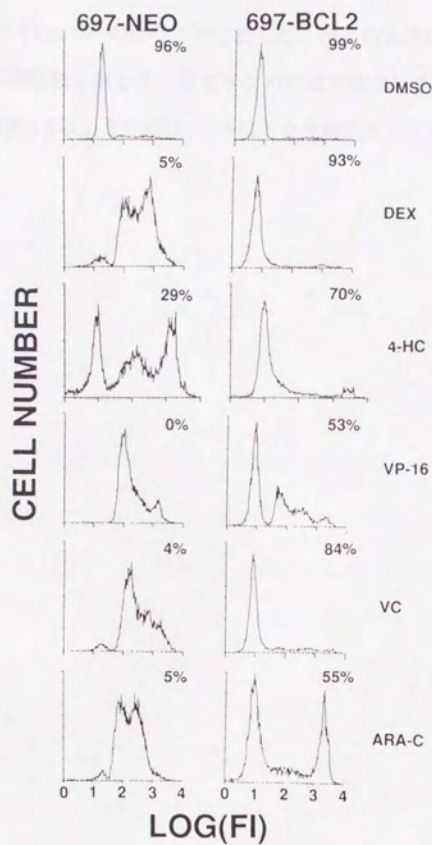


图 3

図3 Bcl-2は様々な化学療法剤によるアポトーシスを抑制する

697/Bcl-2と697/Neoを2日間 10^{-7} MのDEX、 $20\mu\text{M}$ の4-ヒドロキシサイクロフォスファミド (4-HC)、 $70\mu\text{M}$ のエトポシド (VP-16)、 $1\mu\text{M}$ のビンクリスチン (VC)、 $3\mu\text{M}$ のシトシンアラビノシド (Ara-C) の存在下で培養した。PIで染色後FACSで解析した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を表わす。各グラフの右肩の数字は生存率を表わす。生存率を求める際、蛍光強度1.5以上を死細胞、1.5以下を生細胞として計算した。



図3 Bcl-2は様々な化学療法剤によるアポトーシスを抑制する

697/Bcl-2と697/Neoを2日間 10^{-7} MのDEX、 $20\mu\text{M}$ の4-ヒドロキシサイクロフォスファミド (4-HC)、 $70\mu\text{M}$ のエトポシド (VP-16)、 $1\mu\text{M}$ のビンクリスチン (VC)、 $3\mu\text{M}$ のシトシンアラビノシド (Ara-C) の存在下で培養した。PIで染色後FACSで解析した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を表わす。各グラフの右肩の数字は生存率を表わす。生存率を求める際、蛍光強度1.5以上を死細胞、1.5以下を生細胞として計算した。

生存率を求める際、蛍光強度1.5以上を死細胞、1.5以下を生細胞として計算した。

| Cells | Drug | Experiment 1 | | Experiment 2 | |
|-----------|------|--------------|--------|--------------|--------|
| | | No. CFU | % CFU* | No. CFU | % CFU* |
| 697/Bcl-2 | None | 278 | 100 | 340 | 100 |
| | DEX | 156 | 56 | 167 | 49 |
| | MTX | 18 | 6 | 3 | <1 |
| | VC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 697/Neo | None | 344 | 100 | 440 | 100 |
| | DEX | 1 | <1 | 2 | <1 |
| | MTX | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | VC | 0 | 0 | 0 | 0 |

表1 697/Bcl-2は培地からDEXあるいはMTXを除くと再増殖する

697/Bcl-2と697/Neoを 10^{-7} MのDEX、 $10\mu\text{M}$ のメソトレキセート (MTX)、 $1\mu\text{M}$ のビンクリスチン (VC) で3日間処理したあと、培地から薬剤を除き軟寒天培地にまき、14日後にコロニー数 (CFU) を数えた。697/Bcl-2及び無処理の細胞は 2.5×10^4 の生細胞を30-mmディッシュにまいた。697/Neoは3日間の処理でほとんどの細胞が死滅するため生細胞数で調節することは不可能なため、同様の処理をした697/Bcl-2と等しい容積中の細胞を用いた。繰り返し行った2回の実験の結果を示した。

★：無処理の細胞から生じたコロニー数に対するパーセント

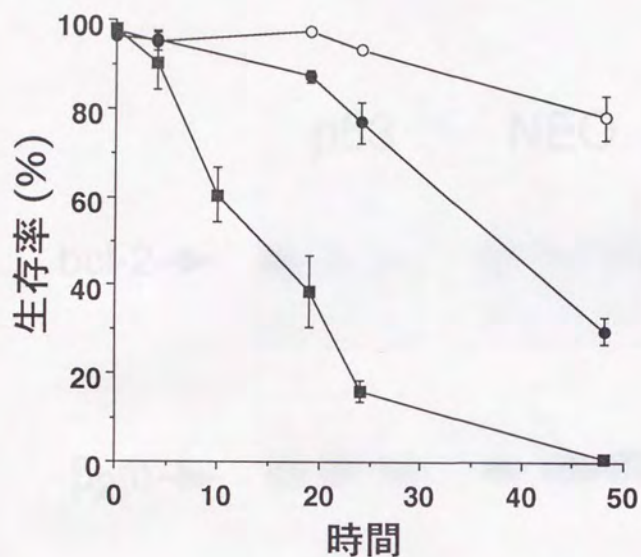


図4 Bcl-2はp53で誘導されるアポトーシスを抑制する

温度感受性p53を遺伝子導入したM1細胞 (M1/p53、■)、空の発現ベクターを導入したM1細胞 (M1/Neo、○) 及びM1/p53に更にBcl-2レトロウイルスを感染させたM1/p53/Bcl-2 (●) の培養条件を37℃から32.5℃に変化させ生存率を経時的にトリパンプルーの染色で求めた。3回の実験から平均と標準偏差を計算した。

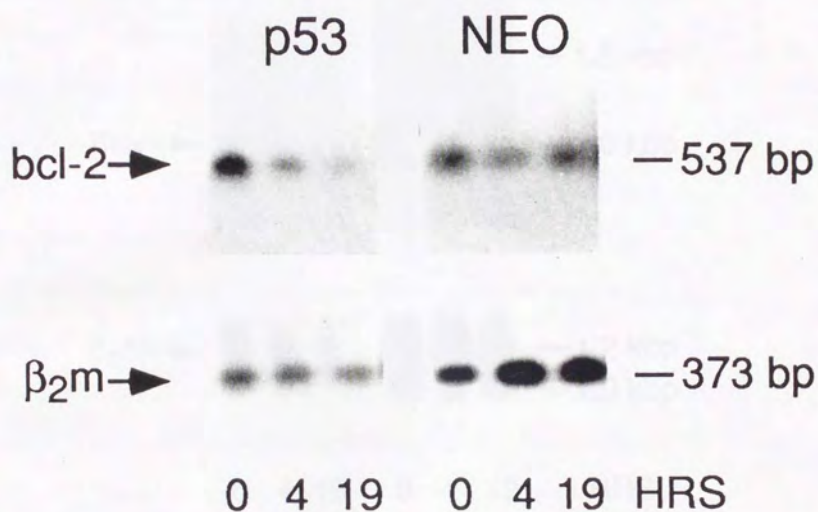


図5 p53はM1細胞の*bcl-2*の発現を抑制する

M1/Neo及びM1/p53で上記の温度変化後、経時的にRNAを抽出し、RT-PCR法により*bcl-2*の発現量の変化を解析した。内部コントロールとして β_2 -マイクログロブリン遺伝子の増幅を同時に行った。

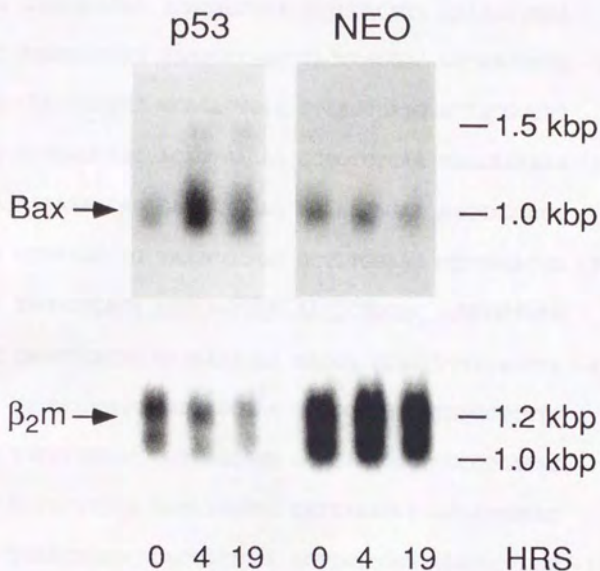


図6 p53はM1細胞の**bax**の発現を誘導する

M1/Neo及びM1/p53で上記の温度変化後、経時的にRNAを抽出し、ノーザンブロット法で**bax**の発現量の変化を解析した。同じブロットを用いて β_2 -マイクログロブリン遺伝子のプローブで再びハイブリダイゼーションを行い内部コントロールとした。

CC TGCTGATCTA TCAGCACAGA

TTAGTTTCTG CCACTTTTTA AACTTCATAT TCCTTTTCTT TTTACACAAA -901
CACAAACATT CGAGTCATGA CTGGGTGGGG TGGCTCAAGC CTGTAATCTC
AGCACTTTGG GAGGCCAAGG TGCGAGGATG CTTGAGTCTG GGAGTTCAGA -801
GACCAGCCTG GGCAACATAG AGAGACCTCA TCTCCACATA AAAAGTTTTA
AAAATTAACC AGGGGCGGTG TAGTCCCAGC TACTCAGGAG GCTGAGGTGG -701
GAGGCTTCAG CCCGGAATT CCAGACTGCA GTGAGCCATG ATTGGGCCAC
TGCACTCCAG CCTGGGCAAC ACAGTGAGAC CCTGTCTCAA AAAAAAAAAA -601
AAAAAAAAAA AAAAAACAG GAAAAACAA ACAAACAGAA AAGCAGGCCT
GGCGCGGTAG CTCATGCCTG TAATCCCAGC GCTTTGGAAG GCTGAGACGG -501
GGTTATCTCT TGGGCTCACA AGTTAGAGAC AAGCCTGGGC GTGGGCTATA
TTGCTAGATC CAGGTCTCTG CAAAAACAA AACCCTCAG TTTTCTAGTCA -401
TCTATAACGT CCTGCCTGGA AGCATGCTAT TTTGGGCCTC TGAGCTTTTG
CACTTGCTAA TTCCTTCTGC GCTGGGGAGA GCTCAAACCC TGCCCCGAAAC -301
TTCTAAAAAT GGTGCCTGGA TAAATGAAGG CATTAGAGCT GCGATTGGAC
GGGCGGCTGT TGGACGGCGC CACTGCTGGN ACTTATCGGG AGATGCTCAT -201
TGGACAGTCA CGTGACGGGA CCAAACCTCC CGAGGGAGCG AGGCAGGTGC
GGTCACGTGA CCCGGCGGCG CTGCGGGGCA GCGGCCATTT TGCGGGGCGG -101
CCACGTGAAG GACGCACGTT CAGCGGGGCT CTCACGTGAC CCGGGCGCGC
TGCGGCCGCC CGCGCGGACC CGGCAGAGG CGGCGGCGGG AGCGGCGGTG -1

图 7

図7 ヒト *bax* 遺伝子のプロモーター及び5'非翻訳領域の塩基配列

ヒト *bax* 遺伝子の翻訳開始領域から972bp上流までの塩基配列を示した。プライマー伸長法で確認した転写開始部位を矢印で示した。p53レスポンスエレメントのコンセンサス配列に完全に一致する10bpをボックスで囲んだ。そのすぐ上流と下流にある不完全な10bpを破線で示した。TATAAボックスを二重の下線で示した。



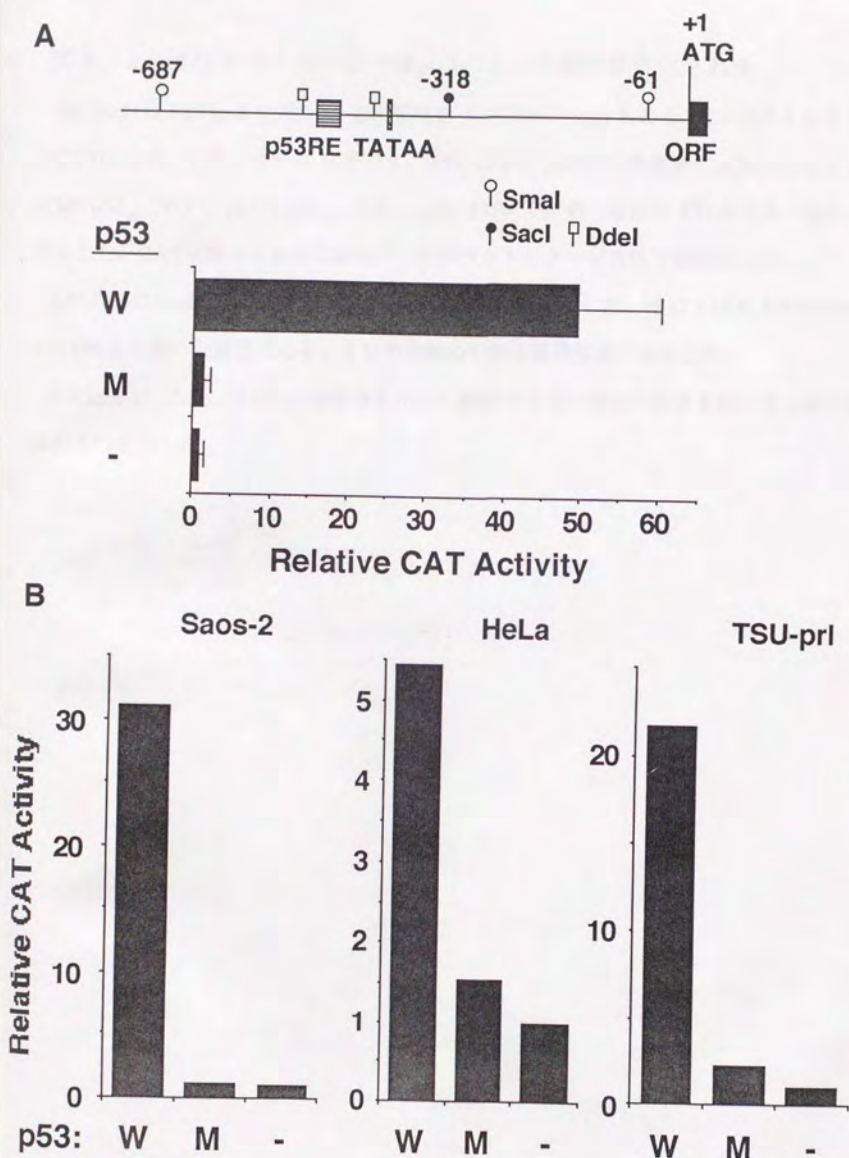


图 8

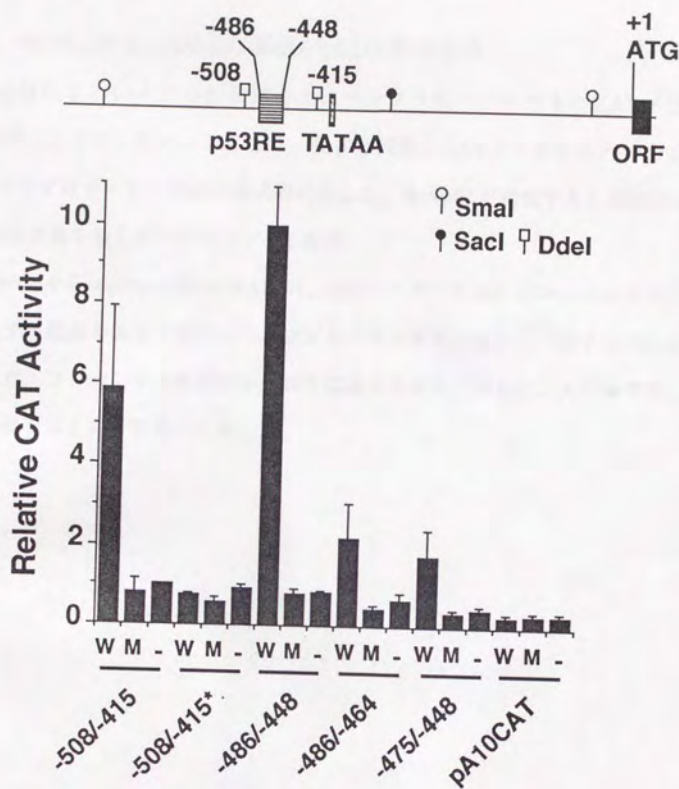
図8 *bax*遺伝子プロモーターはp53によって転写活性化される

-687bpから-318bpまでのSmaI-SacI断片をプロモーターをもたないCATプラスミドpUCSV0CATにサブクローニングして、いくつかのp53欠損細胞株にpCMV β Gal及びpCMVp53_{wt} (W)、pCMVp53₁₇₉ (M)、pRc/CMV (-)の三者のいずれかと共に遺伝子導入した。CAT活性は2日後に測定し、 β -ガラクトシダーゼ活性で標準化した。

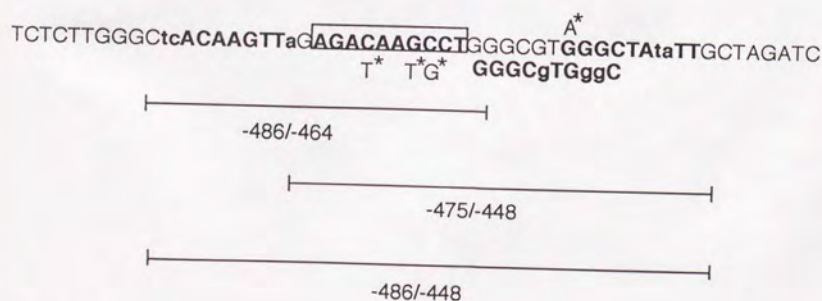
Aの上部に*bax*遺伝子のプロモーター領域を模式的に示した。その下はヒト肺癌由来H358細胞を用いた結果である。3回の実験の平均 \pm 標準偏差で表わした。

BはSaos-2、HeLa、TSU-pr1細胞株を用いた結果である。同様の結果を示した2回の実験の1つを示した。

A



B



9

図9 -486bpから-448bpの領域がp53に反応する

A. *bax*遺伝子のいくつかの領域をミニマルプロモーターをもつCATプラスミド pA10CATBSにサブクローニングして、図8と同様にCATアッセイを行った。上部に *bax*遺伝子のプロモーター領域を模式的に示した。★はp53が結合すると思われる部分に4この塩基置換を施したプラスミド (B.参照)。

B. -486bpから-448bp付近のDNA配列。p53レスポンスエレメントのコンセンサス配列に一致する塩基を太字で表わした。コンセンサス配列に完全に一致する10bpをボックスで囲んだ。コンセンサス配列に不一致の塩基を小文字で示した。A.の★で施した4個の塩基置換を同じ記号を添えて示した。

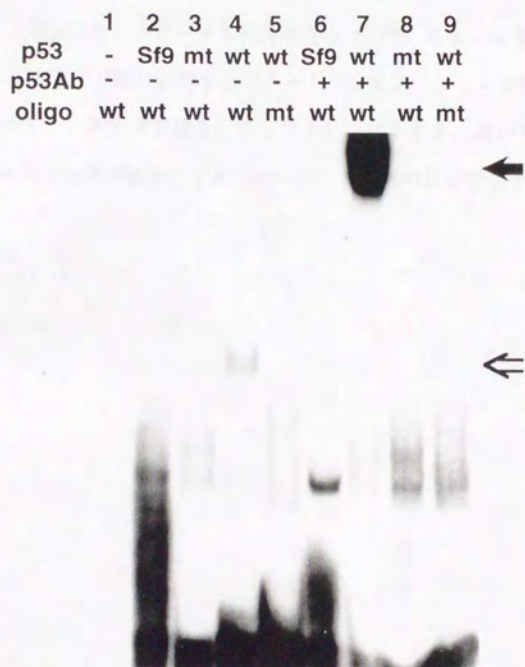


图10

図10 p53は*in vitro*で*bax*遺伝子のプロモーターに結合する

非感染のSf9細胞のライゼート (Sf9)、wild-typeのp53及びp53₁₇₉の組み換えバキュロウィルスの感染したSf9細胞のライゼート (各々wt、mt) を³²Pで標識した-486bpから-448bpに相当する2本鎖オリゴヌクレオチド (図9と同じ塩基置換のないもの [wt] とあるもの [mt]) と抗p53モノクローナル抗体の存在下 (+) あるいは非存在下 (-) で反応後、ポリアクリルアミド電気泳動をしてオートラジオグラフィーで検出した。白い矢印はp53とオリゴヌクレオチドが結合してシフトしたバンドを、黒い矢印はそれに更に抗p53モノクローナル抗体が結合してスーパーシフトしたバンドを示す。



