

論文の内容の要旨

論文題目 アポトーシスを決定するシトクロム c 放出制御機構の解析

氏 名 多 賀 亮 介

【本研究の背景・目的】

我々の体内では、個体発生や恒常性維持のために毎秒 100 万もの細胞が死んでいるといわれている。この細胞死の多くはアポトーシスと呼ばれる分子的に制御された機構により達成される。アポトーシス機構の異常はがんや自己免疫疾患の発症原因となる他、神経変性疾患においても一部の患者の脳組織でアポトーシスが観察されることから、アポトーシスの分子機序を知ることは病理学的にも重要な課題である。

細胞内においてアポトーシス誘導シグナルの多くはミトコンドリアに集約され、ミトコンドリア外膜上に「孔」(細胞死孔)をあける。この孔を通してシトクロム c (Cyt c) 等が細胞質に放出されると、アポトーシスの実行因子である Caspase が活性化され、細胞は不可逆的にアポトーシスを起こす。すなわち、細胞死孔の形成は細胞の生死を分ける重要な鍵ステップである (図 1)。

では細胞死孔はどのように形成されるのであろうか。これまでに、人工脂質二重膜を用いた *in vitro* の系で、細胞死促進型 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ファミリータンパク質である BAX (Bcl-2-associated X protein) や BAK (Bcl-2 antagonist or killer) が Cyt c を通す孔を形成することが示されている (Saito et al., 2000)。また、BAX と BAK を共に欠損した細胞ではアポトーシス刺激に対してほぼ完全に抵抗性を示し、その際に Cyt c の放出も起こらないという報告もなされている (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001)。従って、BAX および BAK が細胞死孔の形成に必須の役割を果たしていると考えられる。一方で、近年 BAX や BAK 以外にも Cyt c の放出に重要な因子が報告されており、Cyt c 放出の制御機構の全容には未知の部分が残されている。そこで本研究では、細胞の生死を決定する Cyt c 放出制御機構に関して新たな知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】

1. TOM40 を過剰発現するだけでアポトーシス様の細胞死が誘導される

本研究では、ミトコンドリア外膜に局在するタンパク質 TOM40 (translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast)) に着目し、細胞死と TOM40 との関連について検討した。まず、ヒト胎児腎由来細胞 HEK293T に TOM40 を過剰発現し、死細胞の膜に結合するタンパク質 Annexin V を用いて死細胞を検出した。すると、TOM40 を過剰発現する

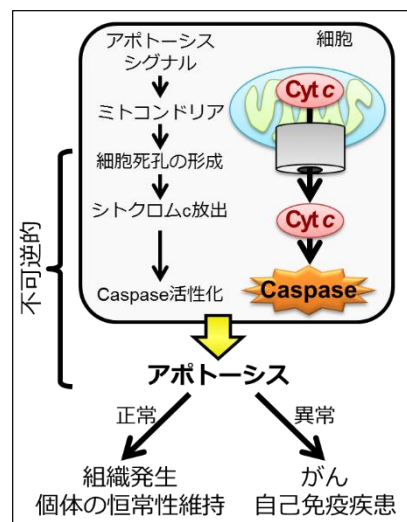


図 1. 細胞死孔の形成はアポトーシスにとって重要な制御点である

だけで、Annexin V 陽性細胞の増加が観察された。その際、切断型 Caspase-3 (Caspase 活性化の指標のひとつ) の増加が検出され (図 2)、Cyt c 放出細胞の割合も増加することが分かった。Cyt c の放出、Caspase の活性化はアポトーシスの指標であることから、TOM40 の過剰発現はアポトーシス様の細胞死を誘導することが示唆された。

2. TOM40 過剰発現による Caspase 活性化に BAX や BAK は必須ではない

BAX や BAK は細胞死孔の構成因子として機能しているため、TOM40 による Cyt c の放出は BAX 又は BAK を介していることが予想される。そこで、TOM40 による Cyt c 放出が BAX や BAK に依存するのかを調べるために、BAX および BAK の機能を阻害する分子 Bcl-xL (bcl-2-like protein 1 longer isoform) を用いた。HEK293T 細胞に対して Bcl-xL と TOM40 を共発現した際の Caspase 活性化を検出したところ、BAX または BAK 過剰発現による Caspase 活性化は Bcl-xL の発現量依存的に抑制された一方、驚いたことに TOM40 過剰発現による Caspase 活性化は Bcl-xL の発現量依存的な抑制を受けなかった (図 3(a))。BAX および BAK の必要性をさらに検討するために、BAX および BAK 両遺伝子を欠損したマウス胎仔繊維芽細胞 (DKO MEF) に対して TOM40 を過剰発現し、Caspase の活性化を検出した。DKO MEF では様々なストレスにより誘導される Caspase 活性化が強く抑制されるが (Wei et al., 2001)、TOM40 過剰発現による Caspase 活性化は DKO MEF でも誘導された (図 3(b))。以上の結果から、BAX および BAK を介さずに TOM40 過剰発現による Cyt c 放出が誘導される可能性が示唆された。

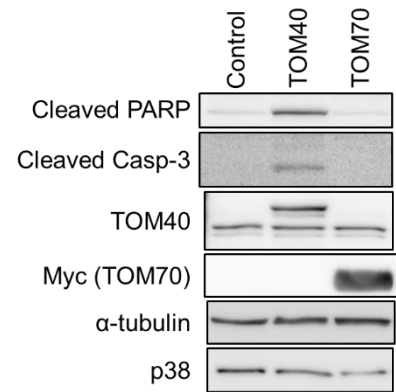


図 2. TOM40 過剰発現により Caspase が活性化する

Cleaved PARP は Caspase 活性化の指標のひとつ。TOM40 と複合体を形成する TOM70 の過剰発現では Caspase は活性化しない。

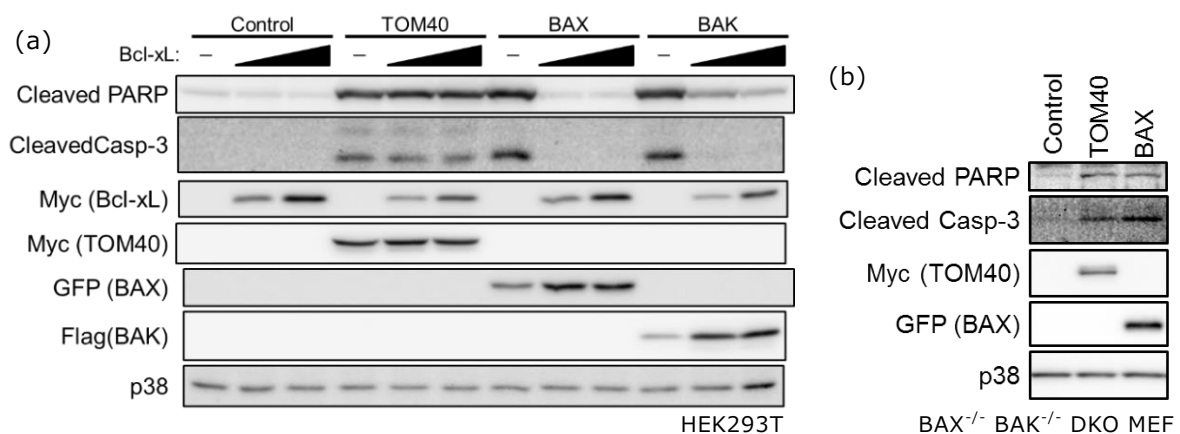


図 3. TOM40 過剰発現による Caspase 活性化に BAX や BAK は必須ではない

(a) Bcl-xL の共発現では TOM40 過剰発現による Caspase 活性化は抑制されない

(b) TOM40 過剰発現による Caspase 活性化は BAX および BAK を欠損した細胞でも誘導される

3. TOM40 は BAX や BAK 依存的な Caspase 活性化に少なくとも一部必要である

反対に、BAX による Caspase 活性化は TOM40 に依存しているのだろうか。そこで、HEK293T 細胞において TOM40 を RNA 干渉法によりノックダウンし、BAX 過剰発現による Caspase 活性化の変化を検出した。すると、BAX 過剰発現による Caspase 活性化が TOM40 のノックダウンによって一部抑制された。この結果から、BAX が TOM40 依存的に Cyt c 放出を制御するメカニズムが存在する可能性が示唆された。また、BAX や BAK に依存した細胞死誘導剤 staurosporine (STS) による Caspase の活性化が TOM40 のノックダウンによって一部減少するという結果も得られており、BAX および BAK 依存的な細胞死誘導に TOM40 が一部必要であるという可能性が示唆された。

4. TOM40 を恒常的に過剰発現する細胞は種々のストレス応答に対して脆弱性を示す

本研究において、一過的な TOM40 の発現上昇が細胞死の誘導を促進することを見出していることから、恒常的な TOM40 の発現上昇が、細胞死感受性に影響を与えるのではないかと考えた。そこで、レトロウイルスによって TOM40 を恒常的に過剰発現する MEF を樹立し、この細胞に種々の細胞死誘導刺激を与え、Caspase 活性化の程度を評価した。すると、STS や etoposide、tunicamycin といった Cyt c 放出依存的な細胞死誘導刺激による Caspase 活性化が、TOM40 恒常発現細胞において促進された (図 4)。この結果から、TOM40 の発現上昇が種々のストレス刺激に対する応答性を亢進させる可能性を考えている。

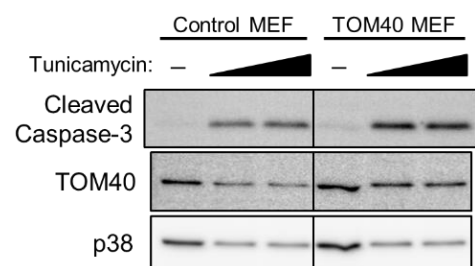


図 4. TOM40 を高発現する細胞では tunicamycin による Caspase 活性化が促進される

【結論・考察】

本研究結果より、TOM40 がアポトーシスを正に調節する因子である可能性が示唆された。これまで、ミトコンドリア輸送体の発現量が細胞死に与える影響は未知であったため、本発見は非常に新しい知見である。加えて、TOM40 の細胞死促進活性は BAX のさらに下流で、あるいは独立に機能する可能性も明らかとなっており、BAX のさらに下流で、TOM40 が Cyt c の放出を正に制御する機構が存在するのではないか、という新しい仮説を考えている。

TOM40 が細胞死に影響を与えるメカニズムとして、現在ミトコンドリア動態制御因子 Drp1 (Dynamin-related protein 1) にも着目している。Drp1 は近年細胞死との関連が報告されている。本研究では、TOM40 過剰発現がミトコンドリアの断片化を誘導すること、また TOM40 過剰発現による Caspase 活性化が Drp1 の活性によって調節を受けることを示唆する予備的結果を得ており、TOM40 がミトコンドリア動態に関与することで Cyt c 放出を調節している可能性が考えられる。

近年の研究において、TOM40 遺伝子座のイントロンに存在するいくつかの一塩基多型 (iSNP: intronic Single Nucleotide Polymorphism) は、アルツハイマー病 (AD) の発症と高い相関があることが報告されている (Harold et al., 2009)。これまでに、TOM40 の iSNP 周辺

領域が制御性エレメントとして機能する可能性や (Bekris et al., 2012)、一部の AD 患者の脳組織において TOM40 の発現量が上昇する可能性 (Linnertz et al., 2014) が示されている。本研究では、AD との関連が報告されている小胞体ストレス刺激 tunicamycin を含む細胞死誘導刺激に対して、TOM40 の発現上昇が細胞死誘導感受性を促進させる可能性を見出した。このことから、「ヒト TOM40 遺伝子上の iSNP が TOM40 の発現量に影響を与えることで細胞死感受性を変化させ、その結果 AD 発症リスクを増加させる」可能性があるかもしれない。従って、本研究はアポトーシス制御の分子メカニズム解明への貢献にとどまらず、上記の疾患に対して治療戦略を立てる上でも重要な知見となることが期待される。