

本論文は、個体の生存に必須な現象の一つであるアポトーシスの分子メカニズムについての研究成果を述べたものである。細胞がアポトーシスするか否かを分ける重要な制御ポイントとして「ミトコンドリアからのシトクロム c 放出」が知られている。この分子機構の全容は未知の部分が残されているが、学位申請者はアポトーシス時のシトクロム c 放出機構にミトコンドリアタンパク質 TOM40 (translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast)) が正の調節を行う可能性を見出し、その解析を行った。

分子的に制御された細胞死の一種であるアポトーシスは種々の発生段階や恒常性維持に重要であり、がん化や感染に対する防御機構として個体の生存に深く関わっている。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をあける。この孔を通してシトクロム 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カスパーが活性化され、細胞は不可逆的にアポトーシスを起こす。すなわち、ミトコンドリアからのシトクロム c 放出現象は細胞の生死を分ける重要な鍵ステップである。

これまでに、人工脂質二重膜を用いた *in vitro* の系で、BAX (B-cell lymphoma 2-associated X protein) と BAK (B-cell lymphoma 2 antagonist or killer) がシトクロム c を通す孔を形成することが示されている。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、その際にシトクロム c の放出も起こらないことも報告されている。従って、BAX および BAK が孔の形成に必須の役割を果たすと考えられる。一方で、近年 BAX や BAK 以外にもシトクロム c の放出に重要な因子が報告されており、シトクロム 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、本論文において学位申請者は細胞の生死を決定するシトクロム c 放出制御機構に関して新たな知見を得ることを目指した。

学位申請者は、ミトコンドリア外膜に局在するタンパク質 TOM40 に着目し、細胞死と TOM40 との関連について検討したところ、ヒト胎児由来腎臓細胞において TOM40 の一過的な過剰発現が生じたところ、シトクロム c の放出、カスパーの活性化、およびアポトーシス様の細胞死を誘導することを初めて見出した。

次に、一過的な TOM40 の発現上昇だけでなく、恒常的な TOM40 の発現亢進が細胞死感受性に影響を与える可能性についても検討した。レトロウイルスによって TOM40 を恒常的に過剰発現する細胞を樹立し、この細胞に種々の細胞死誘導刺激を与え、カスパー活性化の程度を評価した。すると、シトクロム c 放出依存的なくつかの細胞死誘導刺激によるカスパー活性化が、TOM40 恒常発現細胞において促進されることが明らかとなった。この結果から、TOM40 の発現上昇が種々のストレス刺激による細胞死誘導を促進させる可能性が示唆された。

BAX や BAK はシトクロム c を通す孔の構成因子として機能しているため、TOM40 によるシトクロム 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 によるシトクロム 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 の機能阻害分子 Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) を用いた。Bcl-xL と TOM40 を共発現した際のカスパー活性化を検出したところ、BAX または BAK 過剰発現によるカスパー活性化は Bcl-xL の発

現量依存的に抑制された一方、TOM40 過剰発現によるカスパーゼ活性化は Bcl-xL の発現量依存的な抑制を受けなかった。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 両遺伝子の欠損細胞に対して TOM40 を過剰発現し、カスパーゼの活性化を検出した。この細胞では様々なストレスにより誘導されるカスパーゼ活性化が強く抑制されるが、TOM40 過剰発現によるカスパーゼ活性化は BAX および BAK を欠損した細胞でも誘導された。以上の結果から、BAX および BAK を介さずに TOM40 過剰発現によるシトクロム c 放出が誘導される可能性が示唆された。

反対に、BAX によるカスパーゼ活性化が TOM40 に依存するのかを調べるために、TOM40 を RNA 干渉法によりノックダウンし、BAX 過剰発現によるカスパーゼ活性化の変化を検出した。すると、BAX 過剰発現によるカスパーゼ活性化が 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 を介してシトクロム c 放出を促進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 依存的な細胞死誘導剤スタウロスポリンによるカスパーゼの活性化が 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。

上述の結果から、TOM40 が BAX の下流で細胞死に影響を与える機構の存在が考えられる。そのメカニズムについて、学位申請者はミトコンドリアの分裂に着目した。近年、ミトコンドリア分裂は BAX の下流においてシトクロム c 放出に寄与する可能性が報告されているためである。本論文では、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 過剰発現によるカスパーゼ活性化がミトコンドリア動態制御因子 Drp1 (Dynamin-related protein 1) の活性によって調節を受ける可能性が示されており、TOM40 が BAX の下流でミトコンドリア分裂に寄与することでシトクロム c 放出を調節する可能性が初めて報告された。

本論文の実験結果から、TOM40 は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、TOM40 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、本論文は主要なアポトーシス経路と TOM40 との関連について、「BAX の下流で TOM40 がミトコンドリア分裂を介してシトクロム c の放出を正に制御する機構が存在する」という新しい仮説を提唱するものである。

本論文の病理学的意義として、学位申請者は神経変性疾患との関連に着目している。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遺伝子多型は、アルツハイマー病の発症と高い相関があることが報告されている。これまでに、TOM40 の遺伝子多型周辺領域が制御性エレメントとして機能する可能性や、一部のアルツハイマー病患者の脳組織において TOM40 の発現量が増加している可能性が示されている。本論文では、アルツハイマー病との関連が報告されている小胞体ストレスによる細胞死誘導に対して、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示している。このことから、「ヒト TOM40 の遺伝子多型等により TOM40 の発現量が亢進した場合、ストレスによる細胞死感受性が変化し、その結果 AD 発症リスクを増加させる」可能性がある。従って、本論文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、アルツハイマー病の発症メカニズムを解明する上でも重要な知見となることが期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。