



Title	Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells
Author(s)	松本, 真琴
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40740
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	松 本 真 琴
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 13708 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 10 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells (CHOP (GADD153) の異所性発現は骨髓性白血病細胞株M1にアポトーシスを誘導する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 菊谷 仁
	(副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 平野 俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

抗癌剤投与や放射線照射により DNA 障害が生じ、細胞がアポトーシスを起こす経路として、癌抑制遺伝子産物 p53 に依存する経路と p53 非依存性の経路がある。後者には転写因子 IRF-1 が関与していると言われている。しかし、その他にどのような転写因子が関わっているかについてはほとんど分かっていない。C/EBP 関連蛋白 CHOP (GADD153) は p53 同様、培養細胞がシスプラチニやエトポシド投与によりアポトーシスを起こす前に発現量が増加することが知られていた。私は p53 非依存性のアポトーシス機構に CHOP が関与しているのではないかと考え、p53 を発現していないマウス骨髓性白血病細胞 M1 に CHOP を異所性発現させることにより、CHOP の機能を解析した。

【方法ならびに成績】

CHOP は増殖抑制作用を有し、通常の発現ベクターを用いても安定形質導入株を得られないで、lac リプレッサー・オペレーターシステムを用いて、IPTG 添加により CHOP 蛋白を発現誘導できる細胞株を樹立した。IPTG を添加して CHOP を発現させると、48時間後に 40%，72時間後に 60% の細胞がアポトーシスを起こした。アポトーシス細胞の割合はトリパンブルー染色により測定した。同時にヘキスト染色でクロマチンの凝縮、核の断片化を観察し、DNA fragmentation をアガロースゲル電気泳動で確認することにより M1 細胞がアポトーシスを起こしていることを証明した。CHOP のアポトーシス誘導活性に CHOP 蛋白のどの領域が必要であるかを見るために、複数の CHOP の変異体を作製し、野生型 CHOP と同様にそれぞれの導入細胞株を樹立した。変異体としてロイシンジッパー領域に点突然変異を導入した L133A/L140A, DNA 結合領域を欠失させた del105-115, 転写活性化領域を欠失させた dell-88 の 3 種を作製した。IPTG を添加してこれらの変異 CHOP を発現させると、L133A/L140A のみアポトーシスを起こさなかった。この結果から CHOP がアポトーシスを起こすにはロイシンジッパー領域が必要不可欠で、転写活性化領域、DNA 結合領域は不要であることが分かった。以前に他のグループから、CHOP は細胞周期を G1 期で停止させる作用があり、CHOP の細胞周期停止活性にはロイシンジッパー領域、転写活性化領域、DNA 結合領域の全てが必要であるという報告が出ている。本研究の結果を併せて考察すると、CHOP によるアポトーシス誘導と細胞周期停止の分子機構は全く異なるものであると言える。CHOP はロイシンジッパー構造を介して他の核内蛋白

の機能を増強もしくは阻害することによりアポトーシスを引き起こしていると考えられる。また一方では、CHOP は転写活性化因子として細胞周期を G1 期で停止させる遺伝子産物の発現を促していると考えられる。

p53 を強制発現させても M1 細胞はアポトーシスを起こす。この過程でアポトーシス抑制蛋白である bcl-2 の発現量は低下し、アポトーシス誘導蛋白である bax の発現量は上昇する。また、c-myc, cmyb など M1 細胞の増殖状態を反映する癌原遺伝子産物の発現量が著明に低下する。CHOP がアポトーシスを起こす過程においてこれらの mRNA の発現量の変化を解析した。CHOP 誘導後 24 時間以内に bcl-2 の発現量の著明な低下が見られた。しかし、p53 によるアポトーシス過程と異なり、bax, c-myc, c-myb の発現量は変化しなかった。この結果は CHOP 依存性のアポトーシス誘導機構は p53 依存性のアポトーシス誘導機構と異なることを示唆している。

さらに bcl-2 の発現量低下が CHOP 依存性のアポトーシスの原因になっているかを見る目的で、CHOP を誘導可能にした M1 細胞に bcl-2 の発現ベクターをトランスクレクトし、bcl-2 を過剰発現させた。この細胞株で CHOP を発現させると、48 時間後にはアポトーシスが起きず、72 時間後に 25% の細胞がアポトーシスを起こした。bcl-2 の過剰発現によりアポトーシスの出現が遅れたものの、完全に抑制されなかったことから、bcl-2 の発現量低下だけでは CHOP 依存性のアポトーシス誘導機構は説明がつかないことが分かった。

【総括】

CHOP (GADD153) の異所性発現は M1 細胞にアポトーシスを誘導した。CHOP のアポトーシス誘導活性にはロイシンジッパー領域が必要であった。CHOP によるアポトーシス誘導は bcl-2 の発現量低下を伴っていた。

論文審査の結果の要旨

本論文は C/EBP ファミリーに属する転写因子 CHOP が骨髓性白血病細胞株 M1 にアポトーシスを起こす活性があることを示したものである。さらに CHOP の変異体を用いることによって CHOP がアポトーシスを引き起こすためにはロイシンジッパー領域が必要不可欠であり、転写活性化領域や DNA 結合領域は不要であることを証明している。CHOP によるアポトーシス誘導過程において bcl-2 遺伝子の発現量が低下することも見い出している。また CHOP によるアポトーシス誘導機構は p53 に依存しないことを示唆している。CHOP 蛋白の機能について今まで分かっていることはわずかであった。本論文により、CHOP 蛋白にアポトーシス誘導活性があることが示され、その機構の一端が明らかにされた。よって本論文は博士（医学）の学位授与に値する。