

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	まつもとまこと 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) の異所性発現は骨髄性白血病細胞株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ン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髄性白血病細胞 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ので、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、野性型 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フェクトし、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が骨髄性白血病細胞株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出ししている。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。