



Title	Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC
Author(s)	草野, 元
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41826
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	草野 元
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15240 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC (ヒトゲルソリンは VDAC の抑制を介してミトコンドリアの変化を制御しアポトーシスを抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 辻本 賀英
	(副査) 教授 高井 義美 教授 米田 悅啓

論文内容の要旨

【目的】

ゲルソリンは、アクチンの重合・脱重合の調節により細胞の形態変化、運動性を制御するアクチン調節タンパク質である。最近、ゲルソリンは、①カスパーーゼの基質として切断を受け、その結果生じた断片が Ca^{2+} 非依存的にアクチンを切断すること、およびN末端側断片の過剰発現はアポトーシスを誘導しうること、②過剰発現により、様々な刺激により誘導されるアポトーシスが抑制されること、などによりアポトーシスのシグナル伝達においても関与することが示唆されている。我々は、これまでゲルソリンによるアポトーシス抑制機構の解析を行い、カスパーーゼの活性化やそれに先行してみられるシトクロームCの細胞質への漏出が抑制されていることを見いだし、ゲルソリンのアポトーシス抑制機能はミトコンドリアより上流で発揮されると考えていた。そこで本研究では、ミトコンドリアにおけるゲルソリンの標的分子の検索をはじめとした詳細な解析を行った。

【方法ならびに成績】

ヒトゲルソリン (hGsn)、マウスゲルソリン (mGsn)、およびカスパーーゼ 3 による hGsn の切断断片のアポトーシスへの影響を調べるために、それぞれを HeLa 細胞に一過性に発現させた。その結果、hGsn は VP16 (エトポシド) で誘導されるアポトーシスを抑制するのに対し、mGsn はアポトーシスを促進することが観察された。また、C末端側断片 hGsn-C に強いアポトーシス抑制効果がみられた。さらに、HeLa 細胞に anti-sense hGsn を導入し endogenous hGsn が減少した細胞では、アポトーシスの促進がみられた。これらの結果から、hGsn は mGsn とは異なり強いアポトーシス抑制活性を有し、C末端側領域がその活性に重要であると考えられた。

hGsn を過剰発現させた Jurkat 細胞では主にオルガネラ分画に局在しているのに対し、Jurkat 細胞親株では主に cytosol に局在していた。そこで、ゲルソリンのアポトーシス時にみられるミトコンドリア変化を検討するため、ラット単離ミトコンドリアを用いて実験を行った。hGsn は顕著に膜電位低下を抑制し、それに相応してシトクローム C の漏出の抑制がみられた。mGsn ではそのような効果はみられなかった。また hGsn-C、およびその領域内の G 5 ドメインに膜電位低下の抑制効果がみられた。これらの結果より、hGsn のアポトーシス時にみられるミトコンドリア変化の抑制効果には C 末端側領域の特に G 5 ドメインが必須であることがわかった。

最近、ミトコンドリア外膜に存在するチャネル VDAC がアポトーシスの際のミトコンドリア変化に重要な役割を担っていることが明らかにされたので、hGsn の VDAC 活性に与える影響を検討した。ゲルソリンを過剰発現させた

Jurkat 細胞 (JGF) の lysate およびミトコンドリア (1 mg/ml) をリコンビナント hGsn と 5 分間反応させた lysate について免疫沈降を行ったところ、hGsn と VDAC の結合が確認され hGsn が VDAC を直接制御していることが示唆された。そこで次に、ラットから精製した VDAC をリポソームに埋め込んだ VDAC-リポソームを作製し、sucrose の取り込みによるリポソームの swelling により、hGsn の VDAC 活性に与える影響を調べた。その結果、hGsn は濃度依存的に sucrose の取り込みを抑制し、hGsn-C、G5 に抑制効果がみられた。また、Ca²⁺ 存在下で hGsn の sucrose 取り込みの抑制効果が増強された。この結果から、hGsn は Ca²⁺ 依存的に VDAC 活性を抑制し、その結果アポトーシス時のミトコンドリア変化を抑制すると考えられた。

【総括】

ヒトゲルソリンは、マウスゲルソリンと異なりアポトーシス抑制能を有し、C末端領域がその活性を示すのに重要なことが明らかになった。またゲルソリンは、細胞、ミトコンドリアで VDAC との相互作用が認められ VDAC 活性の抑制能を有することから、ヒトゲルソリンは、VDAC 活性の調節を介してアポトーシスの抑制に重要な役割を担っていると考えられた。C末端領域の中でも G5 ドメインはヒトとマウス間で相同性が低く、またヒトゲルソリンのこのドメインは、膜電位低下の抑制効果、および VDAC 活性抑制効果を示すことから、ヒト、マウスゲルソリンのそれぞれがもつアポトーシス調節能の違いは、このドメインの違いによるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

ゲルソリンは、アクチンの重合・脱重合の調節により細胞の形態変化、運動性を制御するアクチン調節タンパク質であるが、最近、①カスパーーゼの基質として切断を受け、その結果生じた断片が Ca²⁺ 非依存性にアクチンを切断すること、および N 末端側断片の過剰発現はアポトーシスを誘導しうること、②過剰発現により、様々な刺激により誘導されるアポトーシスが抑制されること、などによりアポトーシスのシグナル伝達においてもその関与が注目されている。我々は、これまでゲルソリンによるアポトーシス抑制機構の解析を行い、カスパーーゼの活性化やそれに先行してみられるシトクローム C の細胞質への漏出が抑制されていることを見いだし、ゲルソリンのアポトーシス抑制機能はミトコンドリアより上流で発揮されると考えていた。本研究は、ミトコンドリアにおけるゲルソリンの標的分子の検索をはじめとした詳細な解析を行った。

ヒトゲルソリンは、強いアポトーシス抑制能を有し、それには C 末端領域の特に G5 ドメインが重要であること、一方マウスゲルソリンはアポトーシス促進能を有することが明らかとなった。また、ヒトゲルソリンはマウスゲルソリンとは異なり、膜電位低下やシトクローム C の漏出のようなアポトーシスの際のミトコンドリア変化を抑制することがわかった。さらにリポソームを用いた系により、ヒトゲルソリンは抗アポトーシス機能を有した Bcl-xL と同様に、直接結合することにより VDAC 活性を抑制することが示された。

これらの結果から、ヒトゲルソリンは、VDAC の調節を介してミトコンドリアの膜透過性を制御し、アポトーシス抑制効果を示すと考えられる。

以上本研究は、アクチン調節タンパク質ゲルソリンのもつ新規の機能であるアポトーシス抑制の分子メカニズムの解明に大きく寄与するものであり、学位に値すると考えられる。