

Title	Study of apoptotic signaling pathway using micro-injection system
Author(s)	安原, 徳子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42558
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	安原 徳子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16040 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Study of apoptotic signaling pathway using micro-injection system (マイクロインジェクション法を用いたアポトーシスシグナル伝達経路の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 辻本 賀英 (副査) 教授 長田 重一 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

アポトーシスは個体発生や恒常性の維持に重要な役割を果たす細胞死の機構であり、核クロマチンの凝縮、核の分断化に特徴づけられる形態変化を伴う。アポトーシス誘導シグナルは、アポトーシス抑制蛋白質である Bcl-2 の作用点とカスパーカスケードを経て伝達される。本研究はアポトーシスシグナル伝達に関与するいくつかの因子の関係を解析する手段として、種々の機能物質や DNA を細胞内に効率よく導入でき、アポトーシスにおける関与を検討できるマイクロインジェクション法によるアッセイ系を確立し、それまで明らかではなかった細胞内のシグナル伝達と核の形態変化過程の関係、並びに Bcl-2 蛋白質とカスパー3 の機能的順序を明らかにする事を目的とした。

【方法ならびに結果】

アポトーシスのシグナル伝達において核の形態変化を誘導する何らかのファクターが能動核移行により核内へ運ばれるならば、能動核移行の阻害によりアポトーシスに特徴的な核の形態変化が抑制されると予想される。そこで核移行の各種ステップに対する阻害物質を細胞質内にマイクロインジェクション法により導入した後、アポトーシス誘導刺激を与え、核の形態変化に対するその効果を解析した。

核膜孔構成蛋白質に結合して阻害作用を示す小麦胚レクチン (WGA) を核移行基質 (BSA-NLS) とともに細胞質にマイクロインジェクションした細胞では、核移行基質の核への移行が阻害され、核移行基質は細胞質内にとどまる。このような細胞では Fas 刺激によりアポトーシスを誘導しても、アポトーシスに特徴的な核の形態変化は見られなかった。核移行をより効果的に阻害するため、GTP γ S と Ran の複合体 (Ran-GTP γ S)、PTAC58 に対する抗体、過剰量の p10 蛋白質を阻害物質としてマイクロインジェクション法により導入したところ、核移行シグナル (NLS) を介する能動核移行を顕著に阻害した細胞でも、抗 Fas 抗体処理により誘導されるアポトーシス特有の核変性が効率よく抑制された。以上の結果は Fas 刺激により誘導される核の形態変化への、能動核移行の関与を強く示唆する。

Fas 誘導性の細胞死以外の系でも、能動核移行阻害剤による核の形態変化の抑制効果が見られるかを検討するため、多くの細胞死における関与が示されているカスパー3 を使用して同様の実験を行った。活性型リコンビナントカスパー3 を細胞質にマイクロインジェクション法により導入した細胞は、WGA 非存在下ではアポトーシスに特徴的な核の形態変化を起こしたが、WGA を同時にインジェクションした細胞ではこの形態変化は抑制された。

アポトーシス抑制蛋白質 Bcl-2 はカスベースカスケードの上流で機能することは明らかにされていたが、下流で機能している可能性も指摘されていた。そこでマイクロインジェクション法により細胞内に Bcl-2 ファミリー蛋白質を発現させ、カスベースよりも下流のアポトーシスシグナル伝達を阻害するかどうかを検証した。

Bcl-2 および Bcl-X_L の DNA を細胞核にマイクロインジェクション法により導入し、2 時間後にアポトーシス誘導に必要な最小量のリコンビナントカスベース 1 あるいは 3 を再度細胞質にマイクロインジェクションしたところ、コントロールベクターを先にインジェクションしたものと同様、アポトーシスによる核の形態変化が見られた。ところが、コントロールベクター、Bcl-2 および Bcl-X_L と同時にカスベース 1 の cDNA を細胞核にマイクロインジェクション法により導入すると、コントロールベクターにおいては核の形態変化を誘導するが、Bcl-2 および Bcl-X_L 存在下ではこの形態変化は阻害された。これらの結果より、Bcl-2 ファミリー蛋白質はカスベース 3 の下流のシグナル伝達系は阻害しないことが明らかとなった。

【総括】

作用機序の異なる数種類の能動核移行阻害物質をマイクロインジェクションすることにより、Fas 刺激および活性型リコンビナントカスベース 3 により誘導されるアポトーシスに特徴的な核の形態変化が抑制されたことから、アポトーシスにおいて細胞死シグナルの細胞質から核内への伝達に能動核移行が関与していると結論した。

また、十分量の Bcl-2 をインジェクション法により細胞内に発現させても、各種カスベースのインジェクションにより誘導されるアポトーシスを全く抑制できないことを示し、Bcl-2 の作用点はカスベース 3 の下流にはないと結論した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、アポトーシスに特徴的な細胞核の形態変化の誘導に能動核輸送による細胞質から核へのシグナルの伝達が必要である事と、アポトーシスのシグナル伝達機構において、抗アポトーシス活性を示す Bcl-2 ファミリーの作用点が、このシグナル伝達系において重要な働きをしている caspase-3 の活性化の下流にはない事を、マイクロインジェクション法を用いて解明したものである。

本研究の成果は、アポトーシスシグナル伝達機構の解析に重要な貢献をしたもので、学位論文に値すると考えられる。