The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Prevention of Apoptosis of Mammalian Cells by the CED-3-Cleaved Form of CED-9
Author(s)	柴田, 昌宏
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42585
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

【1】

氏　　名	柴田昌宏（しばた まさひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16008　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 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Prevention of Apoptosis of Mammalian Cells by the CED-3-Cleaved Form of CED-9 （CED-3限定分解型CED-9による哺乳類細胞のアポトーシスの抑制）
論文審査委員	（主査） 教　授　内山　安男 （副査） 教　授　岡野　栄之　　教　授　長田　重一

論文内容の要旨

【目的】

Bcl－2の線虫ホモログであるCED－9は、caspaseのホモログであるCED－3により限定分解を受け、Bcl－2に類似したC末端ドメインと、バキュロウイルス由来のcaspase阻害タンパクであるp35に類似したN末端ドメインの2つの機能ドメインに分解されることが知られている。また、Bcl－2は線虫の細胞死を部分的に抑制するが、CED－9は哺乳類細胞の細胞死を抑制しないことが報告されている。線虫の細胞では、CED－9はCED－4と結合しミトコンドリアの外膜に局在する。私達は、CED－9と異なりBcl－2はミトコンドリア内膜に局在することを示してきた。このことより私は、1）CED－9が哺乳類細胞ではミトコンドリアに局在することが出来ないため細胞死を抑制出来ないこと、さらに、2）CED－3により限定分解されたCED－9はミトコンドリアに局在することによって細胞死を抑制するとの仮説の基に本研究を行った。

以上の仮説を証明する目的で、本研究ではCED－9の哺乳類細胞での細胞死抑制効果と細胞内局在を検討した。

【方法ならびに成績】

CED－9の哺乳類細胞での局在と機能を調べるため、全長CED－9（Full CED－9）或いは、よりBcl－2に似た（1－67アミノ酸残基を欠損した）C末端領域（△N CED－9）をPC12細胞と、HeLa細胞にそれぞれ強制発現させ、安定に発現する細胞株を樹立した。PC12細胞は血清除去により、HeLa細胞はTNF－αとcycloheximideによりアポトーシスを誘導し、生存率を調べた。両細胞株とも、Full CED－9を発現させた細胞株は野生型細胞と同程度にアポトーシスに陥ったが、△N CED－9を発現させた細胞株はアポトーシスを抑制した。また、細胞分画を用いて検討した結果、Full CED－9及び△N CED－9発現PC12細胞では両タンパクともミトコンドリア画分と小胞体膜画分に局在した。一方、HeLa細胞では△N CED－9はミトコンドリア画分と小胞体膜画分に局在したが、Full CED－9はミトコンドリア画分にはほとんど局在しなかった。これら細胞よりミトコンドリアを単離し、trypsinで消化したところ、Full CED－9は外膜タンパクと同様にすぐに消化されたが、△N CED－9は抵抗性を示した。さらに、凍結超薄切免疫電顕法を用いて各細胞を観察したところ、△N CED－9の陽性金粒子はPC12細胞、HeLa細胞ともに、小胞構造とミトコンドリア内膜に観察され、Full CED－9の陽性シグナルは両細胞ともミトコンドリア内膜には観察されなかった。以上のことから、CED－9が哺乳類細胞で細胞死を抑制するにはN末67残基の欠損とミトコンドリア内膜への局在が必須であることが示唆された。

【総括】

本研究により以上のことが明らかになった。1）Full CED－9は哺乳類細胞で、ミトコンドリア外膜あるいは小胞構造に局在し、細胞死を抑制しなかった。2）△N CED－9は主にミトコンドリア内膜に局在し、細胞死を抑制した。これらのことから、CED－9が哺乳類細胞で細胞死を抑制するには、単にミトコンドリアに局在することだけではなく、ミトコンドリア内膜に局在することが重要であることが示唆された。

私達はこれまで、Bcl－2がミトコンドリア内膜に局在することを示してきており、本研究はその結果を強く裏付けるものである。今後、Bcl－2のミトコンドリアでの詳細な機能解析が期待される。

論文審査の結果の要旨

Bcl－2は細胞死抑制因子であり、一般にミトコンドリア外膜に局在すると考えられている。しかし、ミトコンドリア膜電位の維持に重要な役割を果たしていることから、ミトコンドリア内膜に局在するとの報告もある。この様に、Bcl－2が細胞内のどこに局在するか長年明確な答えはなかった。申請者は本研究以前にBcl－2がミトコンドリア内膜に局在することを種々の方法を用いて示してきた。本研究では視点を変え、線虫のBcl－2ホモログであるCED－9を用いて解析することにより、Bcl－2のミトコンドリア内膜への局在を示唆している。CED－9は哺乳類細胞では細胞死を抑制しないことが知られている。申請者は、このことはCED－9の哺乳類細胞での局在に起因するのではないかという発想に基づき、本研究を行った。本研究により明らかになったことは以下の点である。

1）CED－9は、哺乳類細胞ではミトコンドリア内膜に局在せず、細胞死を抑制しない。

2）caspaseの線虫ホモログであるCED－3により限定分解されたCED－9は、哺乳類細胞のミトコンドリア内膜に局在し、細胞死を抑制する。

以上のことから、哺乳類細胞における線虫の細胞死抑制因子であるCED－9の機能発現には、単にミトコンドリアに局在することだけではなく、ミトコンドリアの内膜に局在することの重要性が示された。

ある特定のタンパクの機能を考慮する上で、その機能を発揮する「場」を同定することは非常に重要な点である。本研究は、CED－9を哺乳類細胞に導入し、その局在と細胞死抑制機能との相関を明らかにしたものであり、この結果はBcl－2がミトコンドリア内膜に局在することを強く裏付けている。以上の成果は細胞死抑制機構解明への貢献度が大きく、学位の授与に値すると考えられる。