

Title	A novel protein, RTN-xs interacts with both Bcl-xL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity
Author(s)	田上, 真次
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42613
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	た が み しん じ 田 上 真 次
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 8 2 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 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	A novel protein, RTN-x _s , interacts with both Bcl-x _L and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity (Bcl-x _L および Bcl-2 と小胞体 (ER) 上で相互作用し、それらの抗アポトーシス活性を抑制する新規蛋白質 RTN-x _s)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 武田 雅俊 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 長田 重一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

アポトーシスは、形態発生や組織の恒常性維持、有害細胞の除去などにおいて重要な役割を果たす。アポトーシスの際、活性化されるカスベースは、細胞内の様々な基質を切断し、核の断片化や細胞質、細胞膜の変化をひき起こす。また、アポトーシスの調節因子である Bcl-2 ファミリー蛋白のうち、Bcl-x_Lおよび Bcl-2 はミトコンドリアや小胞体 (ER)、核膜に局在し、さまざまな細胞死誘導刺激に対して抗アポトーシス活性を有する。本研究では Bcl-x_Lの細胞死抑制活性の調節機構を調べる目的で、yeast two-hybrid 法を用いて Bcl-x_Lと相互作用する因子を検索し、主として ER に存在する新規レティキュロン (RTN) 蛋白質 RTN-x_sを同定した。RTN-x_sを培養細胞中に導入することによって、Bcl-x_Lおよび Bcl-2 の細胞内局在にどのような変化が生じるか、またそれらの細胞死抑制活性がどう変化するかの検討を行った。

【方法ならびに成績】

Bcl-x_L結合因子の検索は yeast two-hybrid 法を用いた。Bcl-x_L全長をベイトにしてヒト胎児および成人脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。Bax はじめ数種類の Bcl-2 ファミリー蛋白の他に、新規レティキュロン (RTN) 蛋白質 RTN-x の C 末部分を含む 2 つのクローン、およびそのファミリー蛋白である NSP-C (RTN1-C) の全長を検出した。RTN-x の全長 cDNA を得るため、ブラークハイブリダイゼーション法を用いてヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、1192 アミノ酸をコードする遺伝子 RTN-x_Lとそのオールタナティブスプライシング産物である 373 アミノ酸をコードする RTN-x_sが同定された。また、ノザンプロット法を用いた解析で、RTN-x_Lは 5.4 キロベースの転写産物で、その発現部位は主として脳、精巣、少量が心臓および骨格筋にあること、及び RTN-x_sの転写産物は 3 キロベースで、解析した中では肝臓を除くすべての組織で発現していることがわかった。

yeast two-hybrid 法において、RTN-x の C 末部位を含むクローンは Bcl-x_Lおよび Bcl-2 両方に結合し、NSP-C は Bcl-x_Lとは結合するが、Bcl-2 とは結合しないことが判明した。培養細胞で結合特異性を確認するため、COS-7 および HeLa 細胞に強発現したところ、RTN-x_sは Bcl-x_Lおよび Bcl-2 両方に結合し、NSP-C は Bcl-x_Lにしか結合しなかった。また、Jurkat 細胞を用いて内在性の RTN-x_sが内在性の Bcl-x_Lおよび Bcl-2 に結合していることを見出した。

次に、生化学的細胞分画法と免疫染色法の二つの方法を用いて RTN-x_sの細胞内局在性を調べたところ、RTN-x_s

は主として ER に局在していることがわかった。これは RTN ファミリー蛋白が ER に局在しているという既知の報告と一致している。一方、Bcl-x_Lおよび Bcl-2 は既知の報告とほぼ同様に、主としてミトコンドリアに局在していた。

両ファミリー蛋白間の細胞内局在が異なることから、Bcl-x_Lおよび Bcl-2 の細胞内局在性が RTN ファミリー蛋白によって変化するかどうかを上記の 2 種類の方法を用いて調べた。Bcl-x_Lおよび Bcl-2 を強発現している HeLa 細胞に RTN-x_s遺伝子を導入すると、ER に局在する Bcl-x_Lおよび Bcl-2 の量が上昇した。一方、NSP-C を強発現すると、これと結合する Bcl-x_Lに対しては、同様の変化が認められ、結合しない Bcl-2 の細胞内局在は変化しなかった。

次に、Bcl-x_Lおよび Bcl-2 の抗アポトーシス活性に対して RTN-x_sや NSP-C が及ぼす影響を 2 種類の異なる細胞死誘導刺激を用いて解析した。コントロール HeLa 細胞を、ER における N-グリコシル化の阻害剤であるツニカマイシンで刺激すると48時間で約70%の細胞がアポトーシスを起こした。Bcl-x_Lおよび Bcl-2 を強発現している HeLa 細胞では、細胞死が約10%に抑制されたが、RTN-x_sまたは NSP-C を導入すると、細胞死が10%から約45%に上昇した。また、セリン、スレオニンキナーゼインヒビターであるスタウロスポリンで刺激し、同様の実験を行ったところ、同じく結合特異的に Bcl-x_Lおよび Bcl-2 の細胞死抑制活性が減少した。ただしその効果はツニカマイシンの方が顕著であった。

【総括】

ER に局在する RTN ファミリー蛋白質である RTN-x_sは、yeast two-hybrid 及びほ乳類細胞内で Bcl-x_L、Bcl-2 両者と結合したが、同じ RTN ファミリーである NSP-C は Bcl-x_Lとのみ結合した。Bcl-x_L、Bcl-2 は RTN-x_sや NSP-C と特異的に結合することにより、その細胞内局在性が ER に変化した。また、RTN-x_sは Bcl-x_L、Bcl-2 両者の細胞死抑制活性を減少させ、NSP-C は Bcl-x_Lに対してのみ、その効果が認められた。Bcl-x_L、Bcl-2 の、RTN ファミリーによる細胞死抑制活性の減少は結合特異的で、その効果はスタウロスポリンよりも ER ストレスを誘導するツニカマイシンで顕著に認められた。

Bcl-x_L、Bcl-2 はいくつかのアポトーシス刺激により細胞内局在性が変化すると報告されており、RTN ファミリー蛋白質がその局在性の制御と活性の調節に関与している可能性がある。ER における Bcl-2 の機能は不明である点が多いが、RTN ファミリーとの複合体の機能を解析することはその解明の糸口になると期待される。RTN-x_L (他のグループにより Nogo-A と命名) とそのラットのホモログがミエリンに局在し、神経細胞突起の伸長を抑制すると最近報告されており、また Bcl-2 は神経突起の伸長を促進することが知られているので、両ファミリー間の相互作用が神経細胞突起伸長の調節に関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスを抑制する重要な因子である Bcl-x_L、Bcl-2 のミトコンドリアにおける機能に関しては数多くの報告があるが、小胞体 (ER) における機能に関しては未知な点が多い。また、Bcl-x_L、Bcl-2 はいくつかのアポトーシス刺激により細胞内局在が変化すると報告されているが、その際、相互作用する因子および標的因子は今まで同定されていない。

今回、本研究で Bcl-x_L、Bcl-2 と相互作用する因子として単離された新規遺伝子 RTN-x_sは、ER に局在する因子の中で、Bcl-x_L、Bcl-2 のアポトーシス抑制活性の調節に影響を与えると報告された初めての例である。さらに、RTN-x_sは、Bcl-x_L、Bcl-2 の細胞内局在の変化に関与するものとして報告された最初の因子である。

このように RTN-x_sの発見とその解析は、Bcl-2、Bcl-x_Lの活性の調節機構と ER 上での機能を解析する上で重要であり、本研究は学位論文に値すると認める。