The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Involvement of a Small GTP-binding Protein (G Protein) Regulator, Small G Protein GDP Dissociation Stimulator, in Antiapoptotic Cell Survival Signaling
Author(s)	高倉, あゆみ
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44511
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

氏　　名　高倉　あゆみ（たかくら　あゆみ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17204　号

学位授与年月日　平成14年5月15日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位論文名　Involvement of a Small GTP-binding Protein (G Protein) Regulator, Small G Protein GDP Dissociation Stimulator, in Antiapoptotic Cell Survival Signaling
（抗アポトーシスの細胞生存シグナル伝達におけるSmgGDSの関与）

論文審査委員　（主査）
教　授　高井　義美

（副査）
教　授　中村　敏一　　教　授　倉智　嘉久

論文内容の要旨

［目的］

低分子量GTP結合蛋白質（以下G蛋白質）は、細胞の基本的な活動である増殖・分化、形態・運動性の変化、小胞輸送を効率良く制御している。低分子量G蛋白質は、GTP結合型、GDP結合型の二つの状態を推移し、シグナル伝達のon/offを調節するスイッチ分子として作用する。GDP/GTP結合型推移反応を調節する分子には、GDPの解離を抑制しG蛋白質の細胞膜への移行を妨げるGDI、GTP結合型への活性化を促進するGEP、GDP結合型への不活性化を促進するGAP、GTPおよびGDP結合型の両者に作用するGDSなどが知られている。Smg GDSはRhoA、Rac1、-2、Cdc42、Ki-Ras、Rap1a、-1bに対してGDS活性を示すが、生理的な標的低分子量G蛋白質が何かは明らかではない。本研究ではSmg GDSの生理的役割を検討する目的でSmg GDS-/-マウスを作製し、その表現型を解析した。

［方法ならびに成績］

Smg GDSの機能ドメインを含むexon5-7の領域をneo耐性遺伝子に置き換えたSmg GDS-/-マウスを作成した。Smg GDS-/-マウスの脳ホモジネートからmRNAと蛋白を抽出し、RT-PCRとWestern blot法によりSmg GDS遺伝子産物の欠損を確認した。

胎仔期のSmg GDS-/-マウスの生存率は約25%であるが、離乳期に達したSmg GDS-/-マウスの生存率は7%以下であった。経時的には、1-2日目にSmg GDS-/-マウスの約50%が死亡し、5日目までに約70%が死亡した。生存したSmg GDS-/-マウス間の交配で得られた第2世代のSmg GDS-/-マウスも同様の傾向を示し、Smg GDS機能欠損による出生直後の生存の危機には再現性があることが示唆された。Smg GDS-/-マウスの病理組織像では、心房室壁および心室中隔の薄層化、心房室腔の拡張が特徴的であり、心筋細胞の密度は炎症所見を伴わずに減少していた。これはKi-Ras-/-マウスの心臓の病理組織像とよく一致していた。

心臓死の病因を明らかにするために、器官形成期から出生時までの心臓の形態変化を検討したが、BrdUの投与による胎仔期の心筋細胞の増殖能、心筋細胞のサルコメアの構築には異常が認められなかった。しかし、出生直前と生後6時間の心臓を摘出しTUNEL染色法を用いて比較すると、出生直前の心臓では異常が認められなかったが、生後

6時間の心臓ではクロマチン凝縮を呈する心筋細胞およびTUNEL陽性細胞が多数認められた。従って、Smg GDS-/-マウスではアポトーシスの亢進によって心内膜側の心筋細胞が変性脱落し、圧負荷に耐えきれず心腔が拡張するものと考えられた。

Smg GDSは心筋、胸腺、中枢神経系で高い遺伝子発現を示すが、胸腺や中枢神経系でもアポトーシス亢進が観察された。Smg GDS-/-マウスの胸腺は野生型マウスの約1/3のサイズに萎縮し、クロマチン凝縮を伴う胸腺細胞が多数認められ、TUNEL染色ではTUNEL陽性細胞が増加していた。CD4、CD8の発現をFACSで解析した結果、Smg GDS-/-マウスのTリンパ球の分化、成熟には異常が認められなかった。また、E11.5のSmg GDS-/-マウス胎仔切片を用いたTUNEL染色では、延髄、三叉神経節、後根神経節、脊髄運動ニューロンでアポトーシスが亢進し、Ki-Ras-/-マウスの神経細胞死とよく一致していた。

アピトーシス亢進の分子機構を解析するために、初代培養のSmg GDS-/-胸腺細胞を用いて、4種類（dexamethasone、etoposide、UV照射、抗Fas抗体）のアポトーシス誘導刺激に対するcaspase3の酵素活性を比較した。その結果、Smg GDS-/-胸腺細胞では、etoposideとUV照射に対し高いcaspase3活性を示すが、dexamethasoneと抗Fas抗体には野生型と同程度の反応を示した。従って、DNA damage依存性のアポトーシスが亢進する可能性が示唆された。また、レトロウイルスベクターを用いてSmg GDS-/-胸腺細胞にSmg GDS cDNAを導入すると、表現型の回復が観察された。

［総括］

Smg GDS-/-マウスでは、心臓、胸腺、中枢神経系のアポトーシス亢進が特徴的であり、出生時の循環動態の変化がtriggerとなって心不全により死亡することが明らかになった。病理組織学的には胎生致死となるKi-Ras-/-マウスの表現型とよく一致しており、Smg GDSの生理的な標的低分子量G蛋白質がKi-rasである可能性が示唆された。また、Smg GDS-/-胸腺細胞を用いたアポトーシス誘導実験の結果は、DNA damage依存性のp53を介したアポトーシス亢進を強く示唆しており、細胞生存シグナルがSmg GDSおよびKi-Rasの活性化を介してp53の機能を抑制的に制御する機構の存在を予測させるものと考えらえた。

論文審査の結果の要旨

Rasに代表される低分子量G蛋白質は、多数のメンバーから構成され、それぞれ固有の細胞機能を制御している。Smg GDSはin vitroではKi-Rasを含む複数の低分子量G蛋白質に活性化因子として作用することが報告されている。しかし、Smg GDSの生体内における生理的機能や標的低分子量G蛋白質は明らかではない。そこで、本申請者は、本研究においてSmg GDS欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、生後5日以内に、Smg GDS欠損マウスの約70%が死亡し、その死因はうっ血性心不全によるものであった。また、Smg GDSの高発現部位である心臓、胸腺および中枢神経系においてアポトーシスの亢進が認められた。したがって、Smg GDSはアポトーシス誘導系を抑制的に制御することが明らかになった。また、これらの表現型は、Ki-Ras欠損マウスの表現型の一部と一致しており、Smg GDSの生理的な標的低分子量G蛋白質はKi-Rasである可能性が示唆された。

本研究は実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であるといえる。したがって、学位授与に十分値するものと考えられる。