

Title	アポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の役割に関する研究
Author(s)	榎本, 理世
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44648">https://hdl.handle.net/11094/44648</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	榎本 理世
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 18164 号
学位授与年月日	平成 15 年 9 月 30 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	アポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 松田 敏夫
	(副査) 教授 前田 正知 教授 田中 慶一 教授 馬場 明道

### 論文内容の要旨

1972年にWyllieとKerrらにより見出されたアポトーシスは、様々な生命現象や病態においてきわめて重要な意義を有すると考えられている。また、多くの薬物においてアポトーシス誘発作用や抗アポトーシス作用が報告され、それらのシグナルカスケードは薬理的にも注目されている。アポトーシスシグナルカスケードに関しては、受容体、ミトコンドリア障害、小胞体ストレスの面から活発に研究されており、複雑なシグナルカスケードの存在が報告されている。アポトーシスの生化学的特徴の1つであるヌクレオソーム単位のDNA断片化はアポトーシスの最終段階であり、この反応はカスパーゼ活性化DNA分解酵素(CAD)により触媒される。本酵素活性の調節に関しては詳細な研究がなされているが、触媒を受けるDNAの核内での挙動に関する情報は極めて少ない。DNAは核タンパク質で構成されたヌクレオソームコアとともにクロマチンを形成し、密に折りたたまれて核内に収納されている。従って、DNAを標的とする酵素の作用は通常は制限されていると考えられ、転写時などの必要時にクロマチン構造が弛緩し、酵素との相互作用が可能な形態をとることが示されている。このクロマチン構造変化を調節する機構の1つにヒストン化学修飾が知られている。これに関連し、Leeらは、アポトーシス実行過程にヒストンアセチル化によるクロマチン構造変化が関与する可能性を報告している。このような背景において、本研究では、アポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の役割を追究する目的で検討を行った。まず、新規選択的プラスミン阻害薬および*in vitro*細胞障害モデルのアポトーシス誘発作用について明らかにし、これらを含む種々の刺激によるアポトーシスの実行過程においてヒストン化学修飾が変化するかどうかを検討した。さらに、アポトーシス実行過程におけるクロマチンのDNA分解酵素に対する感受性変化について調べた。

抗腫瘍活性を有する選択的プラスミン阻害薬 *trans*-aminomethylcyclohexanecarbonyl-L-(*O*-picolyl)tyrosine-octylamide (YO-2) でラット胸腺細胞を処置することにより、反応時間に依存してDNA断片化が増加した。また、YO-2処置細胞において、アポトーシス細胞の特徴である核の凝縮が見られた。これらの生化学的および形態学的検討より、YO-2がラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることが明らかとなった。さらに、種々のYO化合物のアポトーシス誘発作用について検討し、強力なプラスミン阻害薬のみがアポトーシスを誘発することが確認された。このことから、その詳細は不明であるが、YO-2のアポトーシス誘発作用にプラスミン阻害作用が少なくとも一部関連していることが示唆された。YO-2処置細胞において、チトクロム*c*の細胞質への放出、活性型カスパーゼ-9およびカスパーゼ-3の存在が確認されたことから、本化合物によるアポトーシス誘発作用がミトコンドリア機能障害と関連していることが考えられた。

*In vitro* 細胞障害モデルとして、培養ヒト正常アストロサイトにおいて生理食塩液の短時間暴露後の再灌流でアポトーシスが誘発されるか否かを検討した。培養ヒト正常アストロサイトに生理食塩液を 30 分から 1 時間暴露後、正常培地で培養を継続すると、24 時間から 48 時間後に DNA 断片化および核の凝縮を伴う細胞障害が観察され、本モデルがアポトーシスであることが示された。

各種刺激で誘発されるアポトーシスの実行におけるヒストン化学修飾の役割について明らかにするために、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬（カリキュリン A、オカダ酸）のラット胸腺細胞に対するアポトーシス誘発作用を明らかにし、本アポトーシスおよび上述の YO-2 誘発アポトーシス、培養ヒト正常アストロサイト *in vitro* 細胞障害モデルにおけるヒストンリン酸化について検討した。ラット胸腺細胞をカリキュリン A やオカダ酸存在下で培養すると、反応時間に依存して DNA 断片化が増加した。さらに、これらのタンパク質脱リン酸化酵素阻害薬処置により核の凝縮が観察され、本阻害薬が胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることが示された。このとき、タンパク質リン酸化がどのように変化するかを調べたところ、カリキュリン A およびオカダ酸処置により、DNA 断片化に先立ってヒストン H2A および H1 のリン酸化亢進が認められた。さらに、*in vitro* 細胞障害モデルにおいてもアポトーシスに先立ってヒストン H2A リン酸化の著しい変動が観察された。このように、異なる細胞系および刺激で誘発されるアポトーシスにおいても核の凝縮に先立ちヒストン H2A リン酸化の亢進が起こることが示された。一方、YO-2 および胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることがよく知られているデキサメタゾンによるヒストンリン酸化についても同様に検討したが、これらの化合物処置によるヒストンリン酸化亢進は見られなかった。

各種アポトーシス刺激がクロマチンの DNA 分解酵素感受性を変化させるかどうかについて調べた。カリキュリン A 存在下または非存在下で一定時間培養した細胞から核を調製し、その核をそれぞれ緩衝液中で 37°C、1 時間反応し、内在性 DNA 分解酵素に対する感受性を評価した。カリキュリン A 処置細胞核の DNA 断片化はコントロールに比べて著明に亢進していた。また、この核の DNA 断片化は細胞の化合物処置時間に依存して増加した。このことより、タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬誘発アポトーシスの実行過程において内在性 DNA 分解酵素の感受性が変化していることが示唆された。この内在性 DNA 分解酵素感受性の亢進は YO-2 およびデキサメタゾン誘発アポトーシスにおいても観察された。さらに、デキサメタゾンによる本酵素感受性の増加はグルコルチコイドレセプターアンタゴニストの共存により抑制された。

以上の研究成果より、アポトーシスにおいて、CAD などの DNA 分解酵素の活性化と平行して、クロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性変化がアポトーシス実行過程に関与している可能性が示唆された。また、このクロマチンの DNA 分解酵素感受性を調節する機構の 1 つとしてヒストン化学修飾が関わっていることが考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

アポトーシスは様々な生命現象や病態において極めて重要な意義を有していると考えられている。その複雑なカスケードについては詳細に研究されているが、アポトーシス実行過程で断片化される DNA の核内における挙動に関する情報は極めて少ない。アポトーシスの最終段階で重要な役割をしているのは DNA 分解酵素であるが、著者はその基質 DNA に着目し、アポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の役割を追究する目的で種々検討し、以下の結果を得た。

1. 新規プラスミン阻害薬 YO-2 がラット胸腺細胞にアポトーシスを誘発させることを明らかにした。またこの作用はプラスミン阻害作用と関連していた。
2. 培養ヒト正常アストロサイトを生理食塩液に暴露しその後再灌流すると、アポトーシスが誘発されることを明らかにした (*in vitro* 細胞障害モデル)
3. タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬（カリキュリン A、オカダ酸）によりラット胸腺細胞にアポトーシスが誘発されることを示した。
4. タンパク質脱リン酸化酵素阻害薬によるアポトーシスにおいて、DNA 断片化に先立ってヒストン H2A、H1 の

リン酸化の亢進が起こることを示した。また、培養ヒト正常アストロサイト *in vitro* 細胞障害モデルのアポトーシスにおいても、核の凝縮に先立ってヒストン H2A リン酸化の亢進が起こることを明らかにした。

5. 種々の刺激によるアポトーシス誘発において、クロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性が亢進していることを明らかにした。

以上の結果は、アポトーシス刺激の種類に関わらず、クロマチンの DNA 分解酵素に対する感受性変化がアポトーシス実行に関与していること、また、このクロマチンの DNA 分解酵素感受性を調節する機構の一つとしてヒストン化学修飾が関わっていることを示唆している。本研究は、アポトーシス実行過程におけるヒストン化学修飾の重要性を明らかにし、また病態や薬物作用へのアポトーシスの関与を明らかにした点で、博士（薬学）の学位に十分値するものである。