OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death
Author(s)	相川, 知徳
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54091
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

【121】

氏名	相川知徳（あいかわともり）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　２３６９０　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death （酸化ストレス誘導性アポトーシスの解析）
論文審査委員	（主査） 教授　辻本　賀英 （副査） 教授　遠山　正彌　教授　森　泰丈　教授　金倉　譲

論文内容の要旨

〔　目　的　〕

種々の疾患の原因として、酸化ストレスによる細胞死が着目されているが、その分子メカニズムについては、未だ不明な部分が多い。酸化ストレスは、そのストレス種、暴露量、細胞種の違いによりアポトーシスもしくはネクローシスを引き起こすことが知られている。この差異を引き起こすメカニズムは興味深く、その解明には、先ず酸化ストレス誘導性アポトーシスの詳細な解析が必要である。そこで、我々は過酸化水素刺激により効率良くアポトーシスを起こすJurkat細胞を用いて、そのシグナル伝達経路の解析を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

過酸化水素によるアポトーシス誘導が、ミトコンドリア経路依存的であることを、Bcl-2過剰発現細胞と、Bakをノックダウンした細胞（Baxは発現していない）を用いて確認した。Bakの活性化にはBH3-onlyタンパク質の関与が知られている。Bakを活性化するには、その発現レベルの変化やリン酸化などの化学修飾が重要であるため、種々のBH3-onlyタンパク質の過酸化水素刺激後の変化を解析したところ、幾つかのBH3-onlyタンパク質の量が上昇していることを突き止めた。さらに、各BH3-onlyタンパク質に対するsiRNAを用いてノックダウンしたところ、Noxa、Bim、Bidの場合に有意にアポトーシスが抑制されることがわかった。その中でもNoxa siRNAが過酸化水素によるアポトーシスを最も強く抑制することと、Noxaの発現が上昇することから、Jurkat細胞における酸化ストレス誘導性のアポトーシスにはNoxaが重要な役割を果たしていることが分かった。

BH3-onlyタンパク質は結合を通しBax/Bakを直接活性化できるグループ（activator: Bid、Bim、Puma）と直接活性化できないグループ（inactivator: Noxa、Badなど）に分類されるモデルがCertoらにより以前報告されている。inactivator BH3-onlyタンパク質は結合によるanti-apoptotic member（Bcl-2、Mcl-1など）の抑制を介してBax/Bakを活性化する。NoxaはMcl-1を特異的に抑制することによりBax/Bakを活性化すると考えられている。そこで、過酸化水素刺激によるアポトーシスの場合、BH3-onlyタンパク質の挙動がこのモデルに合うかどうか、免疫沈降法を用いて検討した。その結果、Noxaの増加とともにMcl-1/Noxaの相互作用が増え、一方、Mcl-1/Bimの相互作用が減少していることがわかった。これはCertoらのモデルに矛盾しないことから、同じような仕組みでBakを活性化していることが示唆される。

過酸化水素刺激によるNoxaタンパク質増加のメカニズムを解明するために、RT-PCRを行ったところ、過酸化水素刺激後、mRNAが増加していた。過酸化水素刺激に伴い、Noxaの転写活性化によるものと推測し、Noxa遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、転写開始点から+198 - -153の領域に過酸化水素により転写活性化される部位があるところまで絞り込んだ。この領域には転写因子p53、E2F1、Myc、CREの結合領域が存在する。そこで、それぞれの結合領域に変異を入れ影響を調べたところ、CREに変異を入れた際に過酸化水素による転写活性化が有意に低下したため、CREがNoxa mRNAの増加に重要と考えた。

CREに結合するATF/CREBファミリータンパク質が知られており、これまでCREB1、ATF2、ATF3、ATF4がアポトーシスに関与するとの報告がある。そこで、これらに対応するそれぞれのsiRNAを用いて、Noxa mRNA増加の影響を検討した。ATF4をサイレンシングした場合に、Noxa mRNAの増加が有意に抑制されたため、過酸化水素刺激によるNoxaの転写活性化にATF4が関与することが明らかになった。

多くのタンパク質はproteasome系を介して分解される。過酸化水素刺激によりNoxaの分解に変化があるかどうか、シクロヘキシミドを用いて検討したところ、過酸化水素刺激はNoxaの分解が遅らせることを見出した。さらに、過酸化水素刺激によるproteasome系の影響を調べるために、PEST配列を利用したpZsProSensor-1 vectorを用いて細胞内の分解活性を測定しところ、過酸化水素刺激後、細胞内の分解活性は低下するという結果を得た。

これらの結果から、過酸化水素刺激によるNoxaの発現増加は、転写活性化によるmRNAの増加と、proteasome系阻害による分解の低下が引き金となって生じていることが示された。

〔　総　括　〕

酸化ストレスに対するアポトーシスにはNoxaが重要な役割を果たしているが、その増加には転写活性化と分解抑制が関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

酸化ストレスはストレス種、暴露量、細胞種の違いによりアポトーシスもしくはネクローシスを引き起こす。その細胞死経路選択の分子メカニズムを解明することを目的に、本研究では酸化ストレスによるアポトーシスの分子メカニズムに注目し、研究を行った。酸化ストレス種の

過酸化水素によるアポトーシスはBcl-2タンパク質ファミリーに属するBH3-onlyメンバーの１つであるNoxaが重要な働きをしていることを示した。また過酸化水素刺激後にNoxaタンパク質の発現レベルが上昇することを見出したが、その増加は転写因子ATF4による転写誘導と、過酸化水素によるproteasome系依存的なNoxaタンパク質分解の低下が原因であることを明らかにした。酸化ストレスによる細胞死は神経変性疾患などの様々な疾患の原因として着目されているため、その分子メカニズムの一端を解明したことは、学位に値すると考える。