



Title	A cell-death-defying factor, anamorsin mediates cell growth through inactivation of PKC and p38 MAPK
Author(s)	齋藤, 有理
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58088
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	齋 藤 有 理
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 3 8 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 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臨床医学専攻
学 位 論 文 名	A cell-death-defying factor, anamorsin mediates cell growth through inactivation of PKC and p38 MAPK (抗細胞死分子アナモルシンはPKC・p38MAPKの活性を抑制して細胞増殖を制御する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金 倉 譲 (副査) 教 授 竹 田 潤 二 教 授 下 村 伊 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

アナモルシン (AM) は当研究室でクローニングした、既知の分子とは相同性を示さない細胞死に抵抗を示す機能を持つ分子である。AM 欠損 (AM KO) マウスは胎生後期に死亡し、その胎児胚は小さく、貧血様である。さらに、肝臓、脾臓などの造血組織は萎縮し、胎児肝細胞を用いた造血コロニーアッセイでのコロニー数が野生型 (WT) に比べ著明に低下していることより、AMは胎児発生および造血において重要な役割を担っていると考えられる。また、我々は一部のB細胞性リンパ腫でAMの高発現を認め、そのような症例では予後が不良であることを示しAMはリンパ腫の病態形成にも関与していると考えているが、その分子機構は殆ど不明であった。本研究では、アナモルシンの作用機序を解明することを目的とし、AM結合分子の同定と、AM KO 胎児線維芽細胞 (AM KO MEF) を用いて、同定した分子に関与するシグナル伝達分子の解析をおこなった。

〔 方法ならびに成績 〕

AMの作用機序を解明する目的で、AMと結合する分子を同定するためにYeast-two-hybrid法を行い、PICOT(thioredoxin-like2)を同定した。また、免疫沈降法にて、両分子が細胞内で結合していることを確認した。さらに、AMとPICOTの結合部位を決定するためにAM、PICOT両分子の変異体を作製し、Yeast-two-hybrid法にて、両分子の結合に重要である領域を特定した。その領域はAM、PICOTともにN末端であった。そこで、PICOTのN末端 (1-146aa) とC末端 (133-335aa) の変異体を作製してGST-Pull down assayを行い、AMがPICOTのN末端で結合し、C末端には結合しないことを確認した。

次に、AMヘテロ欠損マウス同士をかけ合わせ胎生14.5日目のMEFを作製したところ、AM KO MEFではWT MEFに比べて明らかな増殖遅延がみられ、細胞周期制御分子であるサイクリンD1の発現量が減少していた。PICOTはPKC θ に結合しPKC θ の活性を抑制すると報告されている。

AMがPICOTと結合して、PKCを含む種々の細胞内シグナル伝達を制御している可能性を考え、AM KO MEFにおいてPMAの刺激下で種々の細胞増殖関連分子のリン酸化を検討した結果、AM KO MEFではWT MEFに比べ、PKC θ / δ およびp38MAPKが強くリン酸化されていることを見出した。さらに、AM KO MEFにPKCおよびp38MAPKの阻害剤を加えることにより細胞増殖、およびサイクリンD1発現量の回復がみられ、PKC θ / δ とp38MAPKが強くリン酸化されていることがAM KO MEFの増殖遅延の一因となっていることが明らかとなった。また、PKCの阻害剤によりp38MAPKのリン酸化が阻害されたことから、p38MAPKのリン酸化はPKCの下流で起こっていると推測された。

〔 総 括 〕

本研究によってAMとPICOTが細胞内で結合していること、また、AMがPKC θ / δ 、およびp38MAPKを負に制御していることを見出した。最近になり、PICOT KO マウスが胎生致死となり、AM KO マウスと同様のフェノタイプを示すことが明らかとなった (Cha, H. et al: J. Mol. Cell. Cardiology 45, 796-803)。また、酵母においてAMのホモログ分子であるDre2が鉄・硫黄蛋白分子形成に関与すること (Zhang, Y. et al: Mol. Cell. Biol. 28, 5569-558)、さらにPICOTとPICOTのホモログ分子であるGRX3も鉄・硫黄蛋白分子であること (Haunhorst, P. et al: Biochem. Bioph. Res. Co. 394, 372-376) が報告された。これらの報告と、本研究のデータから、AMはPICOTとともに、鉄・硫黄蛋白分子として、PKC θ / δ 、p38MAPKなどのシグナル伝達を制御し、胎児発生や造血において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

アナモルシン (AM) は我々の研究室で同定した、既知の分子とは相同性を示さない細胞死に抵抗性を示す分子である。AMを欠損したマウスは胎生致死であり、その胎児胚は小さく貧血様である。胎児肝細胞を用いて行った造血コロニーアッセイでのコロニー数が野生型と比べ著明に低下していることから、AMは胎児発生および造血に重要な役割を担っていると考えられる。また、我々は、AMが一部のB細胞性リンパ腫において強く発現し、予後不良因子となりうることを報告した。従って、AMの作用機序を解明することは、これらの疾患の病態を理解するために重要であると考えられる。本研究では、AMに結合する新たな分子PICOTを同定した。そして、アナモルシンがPICOTと結合し、細胞増殖関連分子であるPKC θ ・ δ を阻害し、その下流でp38MAPKを制御していることを明らかにした。この研究は、AMが、PICOTと共同してPKCを抑制している可能性を示し、AMが関与する病態の治療法を開発できる可能性を見出した意義のある研究であり、学位の授与に値する。