Osaka University Knowledge Archive

Title	Monad 結合蛋白質RPAP3及びPIH1D1の細胞死への関与
Author(s)	井上, 美香
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58452
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【30】

氏　　名	井上美香（いのうえみか）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２４４８７　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 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	Monad 結合蛋白質RPAP3及びPIH1D1の細胞死への関与
論文審査委員	（主査） 教　授　丹羽　　均 （副査） 教　授　上崎　善規　　准教授　竹村　元秀　　講　師　相川　友直

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

細胞死は個体発生における形態形成や、恒常性の維持、免疫系の成立など多くの生命現象に重要な役割を果たしている。また、その形態学的特徴からアポトーシス・オートファジー・ネクローシス等に分類されるが、近年各々の細胞死のメカニズムや生理学的意義が解明されてきている。

アポトーシスの実行過程は caspase による特定蛋白質の限定分解が中心的な役割を果たしており、その活性経路はデスレセプターによる経路と、ミトコンドリア経路に分類される。WD40 リピートドメインを持つ蛋白質はシグナル伝達・RNA スプライシング・転写等、様々な機能を持ち、アポトーシスへの関与も示唆されている。Monad はアポトーシス誘導因子として我々がクローニングした分子で WD40 リピートドメインを持つことが分かっている。これまでに、Monad が TNF-α及びシクロヘキシミドによるアポトーシスを増強し、関与することを報告してきたが、その増強メカニズムについては不明である。

本研究では、Monad のターゲット分子である RNA polymerase Ⅱ- associated protein3（RPAP3）及び PIH1 domain containing protein1（PIH1D1）の二つに焦点を当てその機能解析を行なった。

【方法】

Monad 結合蛋白質を同定するため、V5 タグ付の Monad 高発現 HEK293 細胞を作製し、アフィニティー精製により結合蛋白質を精製し、質量分析を行なった。Monad と RPAP3・PIH1D1 の結合を確認するため GST プルダウンアッセイを行なった。Real-Time PCR を用いて、GAPDH を基準にヒト組織中での Monad・RPAP3・PIH1D1 の発現を確認した。データベース解析により RPAP3 に 3 種の isoform が存在することを確認した。骨肉腫細胞である U2OS 細胞を用い、RPAP3 又は PIH1D1 を siRNA によりノックダウンし、ウェスタンブロッティング・Real-Time PCR により確認した。この細胞を用いて Doxorubicin（Dox）処置を行い、MTT により細胞死を検出した。更にアポトーシスを特異的に検出するため Cell death detection ELISA を用いた。Dox 処置を行なった細胞での pro-caspase3 蛋白発現をウェスタンブロッティングにより確認した。U2OS 細胞を用いて RPAP3 isoform1、PIH1D1 の過剰発現細胞を作製し、ウェスタンブロッティングにより蛋白発現の変化を確認した。また、これらの細胞に Dox 処置を行い、MTT により細胞死を確認した。

【結果】

質量分析により、RPAP3・PIH1D1 が Monad に結合することを確認した。RPAP3 は 631 個のアミノ酸からなり推定分子量は 71.9kDa であり tetratricopeptide リピート（TPR）ドメインを持つ。また、3 種の isoform が存在し、今回使用した U2OS 細胞には isoform1 が存在することが確認され、PIH1D1 はこの isoform1 と特異的に結合することがわかった。PIH1D1 はこれまで機能解析が行なわれていない新規遺伝子であった。290 個のアミノ酸からなり、推定分子量は 32kDa でその一部にロイシンジッパー様領域や核移行ドメインがある。GST プルダウンアッセイにより、Monad と RPAP3・PIH1D1 が HEK293 細胞において結合していること、及び U2OS 細胞で RPAP3 と PIH1D1 が結合していることを確認した。Real-Time PCR によりヒト組織中での Monad・RPAP3・PIH1D1 の mRNA 発現を確認したところ、Monad・RPAP3 は精巣において発現が高く、その他に卵巣・膵臓・脾臓などにも高い発現が認められた。PIH1D1 は肺や白血球に高発現していた。RPAP3 及び PIH1D1 をノックダウンした U2OS 細胞に Dox 処置を行い MTT、ELISA により細胞死を確認したところ、RPAP3 のノックダウンではアポトーシスが抑制されたが、PIH1D1 のノックダウンではアポトーシスが増強された。同様の細胞を用いてウェスタンブロッティングにより蛋白発現の変化を確認したところ、RPAP3 のノックダウンでは pro-caspase3 に変化が認められなかったが、PIH1D1 のノックダウンでは pro-caspase3 の分解が促進され、アポトーシスが増強された。また、蛋白レベルにおいて RPAP3 のノックダウンにより PIH1D1 発現が減少し、PIH1D1 のノックダウンでは RPAP3 発現が減少したが、mRNA 発現量は変わらないことを確認した。

【考察】

RPAP3、PIH1D1 は Monad と共に複合体を形成しているが、今回の結果よりそれぞれがアポトーシスに対し相反する働きを持つことが分かった。ウェスタンブロッティング等の結果と総合して考えると、RPAP3 及び PIH1D1 は化学量論的に 1：1 の関係にあり、この複合体自体はアポトーシスに直接関与せず、単独で存在する RPAP3 及び PIH1D1 が各々でアポトーシスに作用するのではないかと考えられる。また、caspase の変化が認められたことより、RPAP3・PIH1D1 はアポトーシスの実行経路に作用することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では骨肉腫細胞（U2OS 細胞）を用いて、Monad 結合蛋白質である RPAP3 及び PIH1D1 が細胞死にどのように関与しているかを調べた。U2OS 細胞に抗癌剤である doxorubicin 処置を行なったところ、RPAP3 をノックダウンした細胞ではアポトーシスが抑制され、PIH1D1 をノックダウンした細胞ではアポトーシスが促進された。また RPAP3 と PIH1D1 は複合体を形成するが、今回の結果よりアポトーシスに対し相反する働きを持つことがわかった。よって、両者は化学量論的に１：１の関係にあり、複合体自体はアポトーシスに直接関与せず、単独で存在する RPAP3 及び PIH1D1 がアポトーシスに作用するのではないかと考えられる。また、caspase の変化が認められたことより、RPAP3、PIH1D1 はアポトーシスの実行経路に関与していることを明らかにした。以上より、今後