

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular Mechanism of p41-induction in Radiation-induced Cell Death

(放射線誘導細胞死における細胞死指標タンパク質p41の生成機構)

氏名 森田 明 典

### 【序】

p41は、放射線高感受性のヒトT細胞性白血病細胞株MOLT-4に、X線10Gy照射6時間後から、銀染色した2次元電気泳動ゲルに検出されるようになる分子量41kDa、等電点4.0のタンパク質である（図1）。p41のマイクロシーケンスに基づいて作成されたウサギ抗合成ペプチド抗体AM-iによるイムノブロットングの結果、p41と共に反応し、非照射、照射に関わらず検出される分子量42kDa、等電点4.1のタンパク質p42が新たに見出されていた（図2）。

所属研究室で見出されていたp41に関する以上の結果をふまえ、本研究では、細胞死指標タンパク質となり得る可能性があるp41の生成機構、およびp41とp42の関係について研究を進め、p41生成の分子機構を明らかにした。

### 【1. X線照射MOLT-4細胞からのp41、p42の精製およびN末端シーケンス】

X線10Gy照射18時間後のMOLT-4細胞抽出液から、60-80%飽和硫酸分画、350-650 mM NaCl濃度勾配溶出によるQ-Sepharose FF陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、および遠心限外濾過法によりp41、p42の濃縮部分精製画分を得、更にこの画分の2次元電気泳動ゲルをPVDF膜に転写、CBB染色スポットを切り出すことによりN末端アミノ酸配列決定に必要なp41、p42を分離することができた。

p41、p42のN末端シーケンスの結果、p42は白血病細胞の転座点の解析から見出され、がん遺伝子の可能性が示唆されていたSETβであること、p41は、SETβのN末端から18番目のアスパラギン酸残基のC末端側切断産物であることが明らかになった（図3）。このAsp-C切断性は、細胞死進行の過程で活性化し、アポトーシス実行に中心的役割を果たすことが示唆されていたプロテアーゼ、カスパーゼに特徴的な基質特異性であることから、照射後、p42が細胞死関連プロテアーゼによる切断を受け、p41に変換されるという分子機構が想定された。

### 【2. p41、p42解析に有用な抗p41/p42特異的抗体の作成】

AM-1抗体作成に用いた免疫抗原ペプチドは、N末端シーケンスの結果、p41とp42の共通アミノ酸配列部分（SETβ<sup>123-137</sup>）にあることが判明し、p41とp42の両方に反応する結果となった（図2）。

そこで、p41、p42解析に、より有用な抗p41/p42特異的抗体を得ることを目標に、新たに3種の抗合成ペプチド抗体を作成した。具体的には、p41とp42両方に反応するよう設計したSETβ<sup>13-28</sup>ペプチド、p42、p41それぞれに特異的に反応するよう設計したN末端部ペプチド（それぞれSETβ<sup>3-14</sup>、p41<sup>1-10</sup>）をウサギに免疫することにより、抗血清を作成、それぞれの抗原ペプチドカラムによりアフィニティー精製抗体AM-2、-3、-4を得た。なかでもp41特異的抗体AM-4は、p42切断部位特異的抗体と言い換えることができ、p42切断後に露出するようになるグリシン 19のアミノ基とその後続アミノ酸配列を特異的に認識するペプチド抗体である。この抗体はアフィニティー精製画分を、更に非切断p42に相当するSETβ<sup>13-28</sup>ペプチドカラムに通し、p42反応抗体を吸着除去することによりp41反応抗体のみを分離、精製した特殊抗体である。

得られた抗体によるイムノプロットングの結果、計画当初の構想通り、AM-2抗体はAM-1抗体と同様、p41とp42の両方に反応し、AM-3、AM-4抗体はそれぞれp42、p41のみに反応することが、MOLT-4細胞のp41、p42（図4）、およびリコンビナントp41、p42を用いて明らかとなった。

また、AM-4抗体では、作業の難易度が高い2次元電気泳動を経ず、容易な1次元の電気泳動（SDS-PAGE）でp41の検出が可能となり、技術的にも優れた抗体であることが示された（図5）。

### 【3. p42切断プロテアーゼの同定】

p42切断プロテアーゼの性質を検討するため、カスパーゼ活性や活性化を阻害することが知られていたカスパーゼ阻害剤処理や *bcl-2* 遺伝子導入による照射MOLT-4細胞のp42切断阻害効果を調べた。その結果、*bcl-2* 遺伝子導入、あるいはカスパーゼ-3等に阻害効果が高いAc-DEVD-CHOを照射後に添加することにより、p42切断および照射後のMOLT-4細胞死が抑制された(図6)。また、炎症性サイトカインの産生に關与するカスパーゼ-1等に阻害効果が高いAc-YVAD-CHOでは、p42切断および照射後のMOLT-4細胞死の抑制効果はみられなかった。これらの結果から、p42切断プロテアーゼおよびMOLT-4放射線細胞死には、Ac-DEVD-CHOによって阻害されるカスパーゼが關与していることが示された。

さらに、作成したp42発現プラスミドを用い、*In vitro translation*法により<sup>[35S]</sup>メチオニン標識したリコンビナントp42を作製、アポトーシスのエフェクターとされるカスパーゼ-3, -6, -7のp42に対する切断活性を*In vitro*で検討し、p42が、カスパーゼ-7に特に切断の感受性が高いことが判明(図7)、p42は主としてカスパーゼ-7によって切断されていると結論された。

### 【考察】

カスパーゼはその配列特異的な限定分解活性により、種々の特異的基質タンパク質を切断し、細胞を不可逆的な死の経路へ導くと考えられている。また、いくつかの基質タンパク質ではカスパーゼによって切断されることによりアポトーシスの特徴であるDNA断片化や細胞核の凝縮、断片化といった変化を引き起こす因子が同定されてきている。

本研究ではp42/SETβがカスパーゼファミリーメンバーの新規基質となることを明らかにした。SETβは白血病細胞の転座点の解析から見出され、がん遺伝子の可能性があり、また複製の開始に必要な因子として提示され、クロマチンリモデリング活性、転写との関連が示されているが、本研究では新たに細胞死における關与の可能性を示した。

更に、研究の過程で作成した3種の抗p42/p41抗体AM-2, -3, -4の内の1つであるp41特異的抗体AM-4は、p41の解析に有用であるだけでなく、カスパーゼ活性化やアポトーシス検出の指標として有効な抗体と考えられる。また、その切断部位は哺乳類から魚類までアミノ酸配列が完全に保存されていることから、AM-4抗体はヒト細胞だけでなく、様々な動物種の細胞死指標タンパク質検出抗体となりえる可能性が期待される。

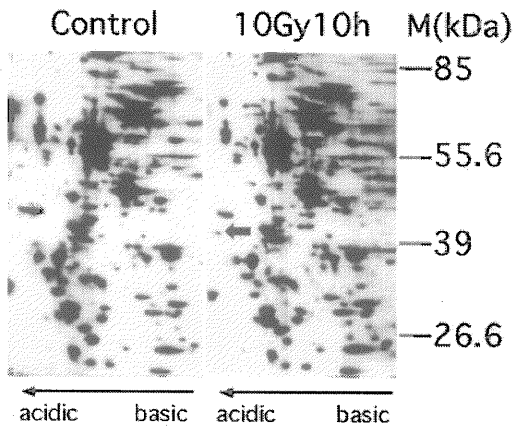


図1 X線10Gy照射10時間後のMOLT-4細胞におけるp41の出現。2次元電気泳動後の銀染色。照射後に出現したp41を矢印で示した。

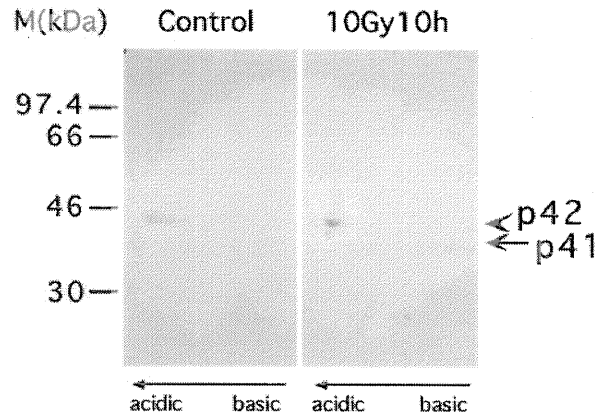


図2 AM-1抗体によるイムノブロッティング。p42を矢頭で、p41を矢印で示した。

N-Terminal Sequences

p42 β2 SAPAAKVSKKEL β13  
 p41 β19 GADETSEKEQQE β30

Proposed Cleavage Site

p42 β2 SAPAAKVSKKELNSNHDGADGDETSEKEQQEAIEHIDEVQN β40  
 (SET β1 MSAPAAKVSKKELNSNHDGADGDETSEKEQQEAIEHIDEVQN β40)

図3 p42、p41のN末端シーケンス結果及びp42切断部位。p42切断部位を矢印で示した。

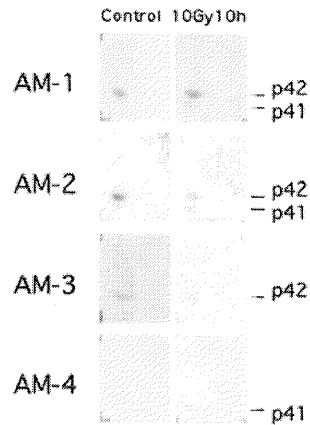


図4 抗ペプチド抗体AM-1、-2、-3、-4のp42、p41に対する特異性。

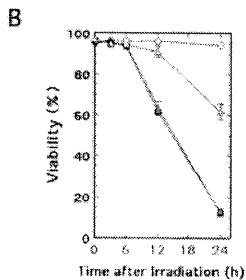
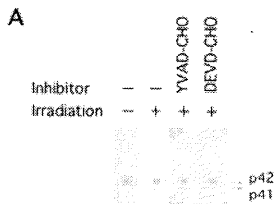


図6 カスパーゼ阻害剤Ac-DEVD-CHOによるX線10Gy照射MOLT-4細胞のp42切断及び細胞死の抑制。  
 A Ac-YVAD-CHO、Ac-DEVD-CHOのp42切断阻害効果。  
 B Viability (色素排除試験)。  
 ○: コントロール、●: 10Gy、  
 ▲: 10Gy+40 μM Ac-YVAD-CHO、  
 △: 10Gy+40 μM Ac-DEVD-CHO。

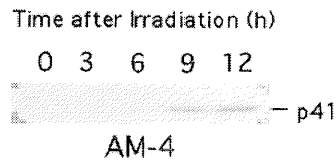


図5 AM-4抗体によるイムノブロッティング。10Gy照射MOLT-4細胞におけるp41誘導の経時変化を1次元の電気泳動で検出した。

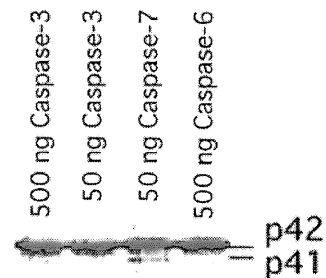


図7 カスパーゼ-3、-7、-6によるp42切断実験。混合後、37 °C、2時間反応させた。