

# 論文内容の要旨

論文題目 低酸素誘導アポトーシスにおける HIF-1 複合体の機能

氏名 鈴木 裕之

## [序]

低酸素状態は虚血性疾患や固形腫瘍などで認められ、これら疾患では低酸素によるアポトーシスが重要な役割を果たしている。従って、低酸素環境下での細胞生死の制御機構の解明は重要な課題となっている。細胞が低酸素にさらされると、HIF-1 $\alpha$ が誘導され、HIF-1 $\alpha$ は核内で ARNT とヘテロダイマーを形成する (HIF-1 複合体)。HIF-1 複合体は bHLH-PAS ファミリー転写因子として機能し、血管新生促進因子 VEGF、エリスロポエチンや解糖系の酵素群を誘導し、低酸素環境への適応 (生存) に関与する。一方で HIF-1 $\alpha$ は癌抑制遺伝子 p53 を安定化し、低酸素誘導アポトーシスにも関与することが示されている。しかしながら、このような相反する HIF-1 $\alpha$ の機能がどのように制御されているかについては不明である。そこで本研究では HIF-1 $\alpha$ の低酸素誘導アポトーシスにおける役割を中心に検討し、以下の成果を得た。

## [結果と考察]

### 低酸素誘導アポトーシスと HIF-1 複合体 (HIF-1 $\alpha$ , ARNT) の発現変化

ヒト乳がん MCF-7 細胞を低酸素 (酸素濃度 10 ppm 以下) 処理すると、48 時間後から p53、Bax の誘導、それに伴うミトコンドリアからの Cytochrome c の遊離が認められ、72 時間後には全ての細胞がアポトーシスを起こして死滅する (図 1A)。この時 HIF-1 $\alpha$  の発現をイムノブロット法により調べたところ、主に 2 つのバンドが認められた (図 1B)。免疫沈降した HIF-1 $\alpha$  をフォスファターゼ処理すると高分子量側のバンドが消失し、低分子量側のバンドと一致した (図 1C)。これらのことから、低酸素環境下ではリン酸化型と脱リン酸化型 HIF-1 $\alpha$  が誘導され、アポトーシスの進行とともに脱リン酸化型 HIF-1 $\alpha$  の割合が増加することが明らかになった。

次に、ARNT の発現を調べたところ、分子量 95kDa の ARNT はアポトーシスの進行とともに減少し、新たに 75kDa のバンドが認められた (図 1B)。75kDa の ARNT の出現はカスパーゼ阻害剤で抑制されることから、ARNT はアポトーシスの進行に伴いカスパーゼによって切断を受けることが示唆された。

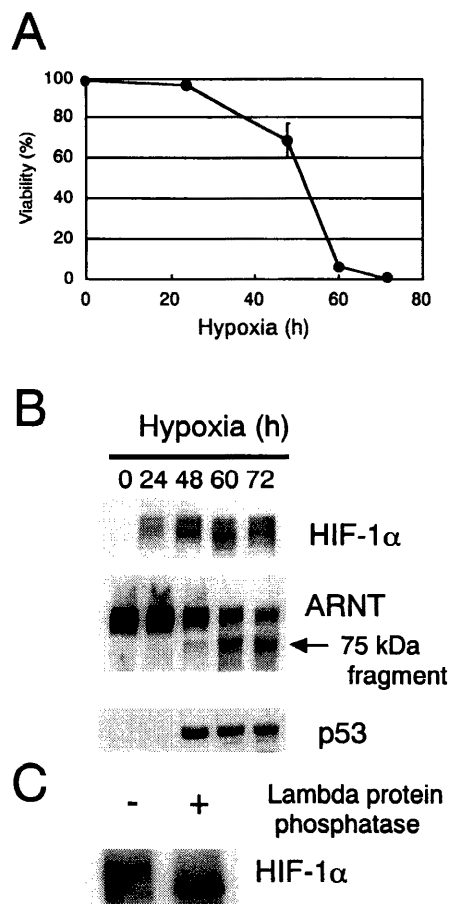


図1 低酸素による細胞死とHIF-1複合体の発現

## ARNT の切断が HIF-1 $\alpha$ との結合とそのリン酸化に及ぼす影響

ARNT のカススペースによる切断部位を同定するため、アスパラギン酸（カススペースの認識アミノ酸）に変異を導入した ARNT を作製し、精製したカススペースを *in vitro* で作用させた。その結果 151 番目のアスパラギン酸に変異を入れた ARNT では、カススペース 3、9 による切断を受けないことが明らかとなった（図 2A）。従って、ARNT はカススペースによって 151 番目のアスパラギン酸で切断を受けるものと考えられた。

次に ARNT 切断の影響を調べるため、FLAG tag を付けた野生型 ARNT (WT)、 $\Delta$ N-ARNT (aa152-789) と V5 tag を付けた HIF-1 $\alpha$  を MCF-7 細胞に共発現させた。免疫沈降法により、HIF-1 $\alpha$  と WT-ARNT との結合は認められたが、 $\Delta$ N-ARNT との結合は認められなかった（図 2B）。このことからカススペースによって切断を受けた ARNT は、HIF-1 $\alpha$  との結合能を失うことが明らかとなった。さらに WT-ARNT と結合した HIF-1 $\alpha$  では、リン酸化によるバンドシフトが認められた（図 2B、矢印）。また低酸素処理した細胞の lysate を抗 ARNT 抗体で免疫沈降すると、抗 HIF-1 $\alpha$  抗体で免疫沈降したときと比べて、リン酸化型の HIF-1 $\alpha$  が選択的に共沈降されることが明らかになった（図 2C）。これらのことから HIF-1 $\alpha$  は ARNT との結合に依存してリン酸化されることが明らかになった。

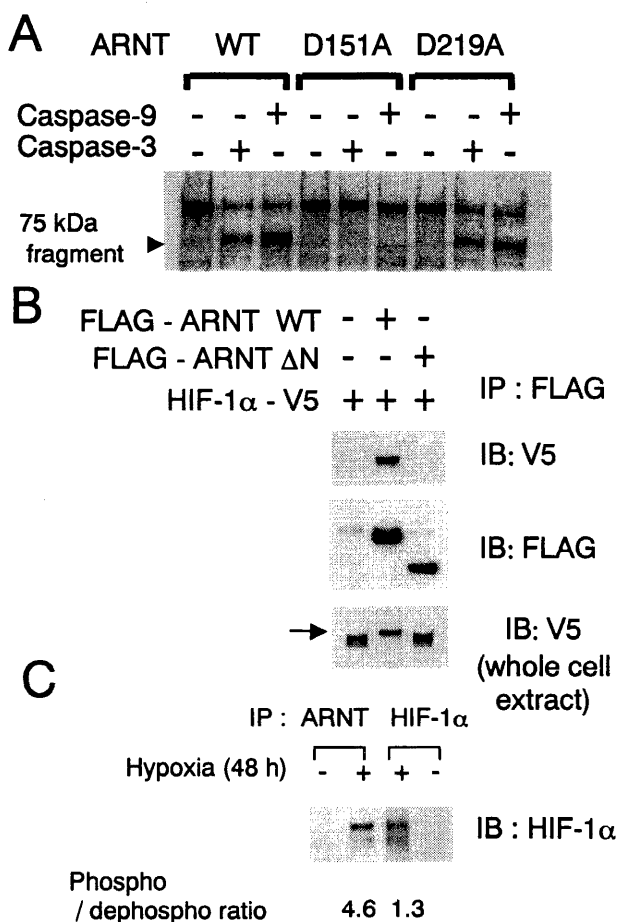


図2 ARNTのカススペースによる切断とHIF-1 $\alpha$ との結合

## HIF-1 $\alpha$ の脱リン酸化と p53 の発現

p53 の発現は HIF-1 $\alpha$ の脱リン酸化型の発現と良く一致している (図1B)。そこで細胞内での p53 と HIF-1 $\alpha$ との結合を免疫沈降法で調べたところ、p53 は HIF-1 $\alpha$ の脱リン酸化型と結合していることが明らかになった (図 3A)。従って HIF-1 $\alpha$ は ARNT、p53 の双方と結合するが、HIF-1 $\alpha$ のリン酸化状態が異なっていることが明らかになった。次に、HIF-1 $\alpha$ のリン酸化に影響を与える阻害剤についてスクリーニングを行った。その結果、Hsp90 阻害剤として知られる Geldanamycin A (GA) が HIF-1 $\alpha$ の脱リン酸化型の発現を抑制することが明らかになった (図 3B)。興味深いことに、GA による HIF-1 $\alpha$ の脱リン酸化型の発現抑制に伴い、p53 の発現も抑制された。さらに GA は低酸素によって誘導されるアポトーシスも抑制した (図 3C)。これらのことから脱リン酸化型 HIF-1 $\alpha$ は、p53 と結合し、その安定化及びアポトーシスの誘導に寄与することが明らかになった。

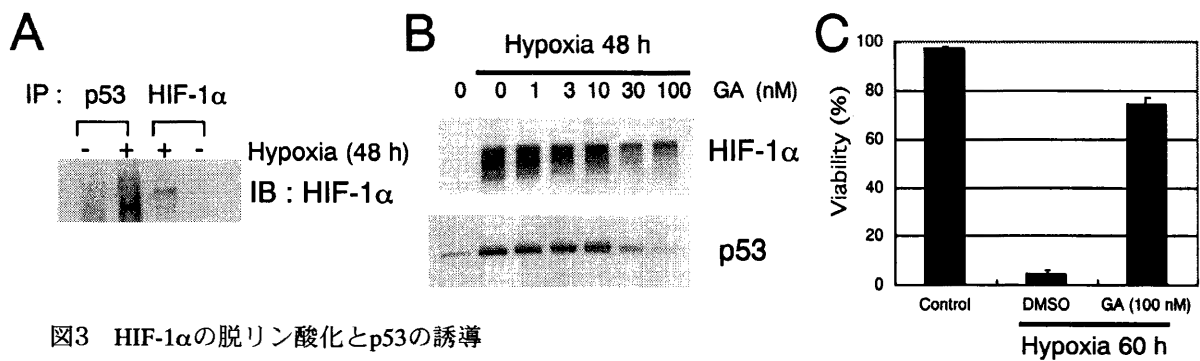


図3 HIF-1 $\alpha$ の脱リン酸化とp53の誘導

[まとめ]

本研究により、低酸素環境での細胞生死の制御が HIF-1 $\alpha$  のリン酸化レベルで制御されていることが示された (図 4)。即ちリン酸化型 HIF-1 $\alpha$  は ARNT と結合し、低酸素環境下での生存に重要な遺伝子の発現を促進する。一方、脱リン酸化型 HIF-1 $\alpha$  は p53 と結合し、安定化することによって、p53 依存的なアポトーシスを促進すると考えられた。Hsp90 阻害剤 Geldanamycin A (GA) は脱リン酸化型 HIF-1 $\alpha$  の誘導を選択的に抑制し、さらには p53 依存的なアポトーシスの誘導を抑制した。またアポトーシスの際に活性化されたカスパーは ARNT を切断し、ARNT と HIF-1 $\alpha$  との結合を阻害することにより、HIF-1 複合体の転写活性を抑制するものと考えられた。さらにこの際、ARNT との結合に依存した HIF-1 $\alpha$  のリン酸化が抑制され、脱リン酸化型 HIF-1 $\alpha$  を増加させることによってアポトーシスの進行が促進されるものと考えられた。以上のように、HIF-1 $\alpha$  は、そのリン酸化状態に依存して低酸素環境下での細胞生死の制御に重要な役割を果たしており、虚血性疾患や固形腫瘍等において HIF-1 $\alpha$  のリン酸化を標的とした新たな治療法の開発につながるものと期待される。

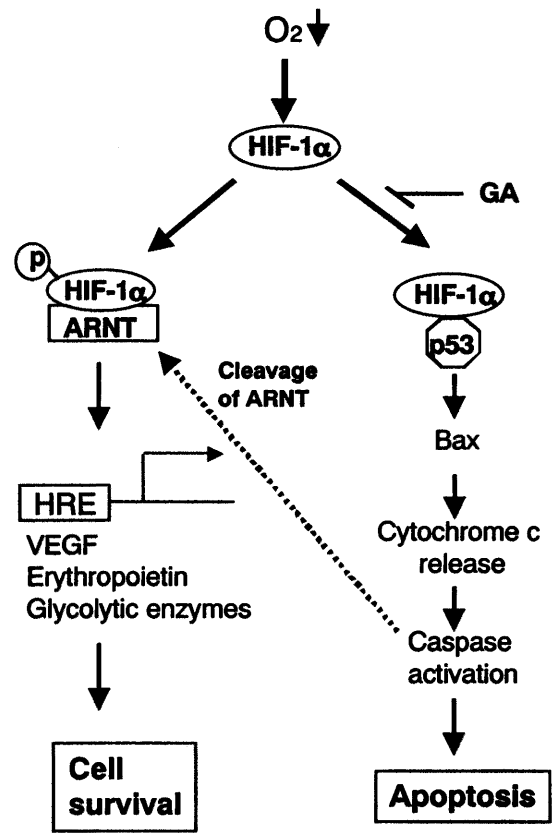


図4 HIF-1 $\alpha$ のリン酸化による細胞生死の制御モデル