

別紙 その1

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成11年博士課程進学

氏名 孫偉勇

指導教官名 塩田邦郎

論文題目 細胞増殖関連分子 PAL31 の機能に関する研究

はじめに

私たち個体の生命は、細胞の増殖、分化、死のバランスの上に成り立っている。このバランスが失われると発生の異常や、ホメオスタシスおよび感染防御の異常に基づく、様々な病気を引き起こす原因になる。アポトーシスやプログラム細胞死は、ネクローシスと違い、死亡する細胞は自らの死に積極的に参加している。

細胞増殖は細胞周期に制御されている。細胞周期の研究は、その主たる制御機構であるサイクリン—CDK 複合体活性の周期メカニズムを中心として、またその上流に位置するシグナル伝達機構や、下流に位置する DNA 複製調節との三層構造として、その各々が密接に絡み合いながら進歩してきたが、実はこの各層の間にはまだまだ埋めがたいギャップが存在している。つまりどのような機構で細胞外からのシグナルが細胞周期エンジンに連結しているかという素朴な疑問に対する明快な答えはまだ得られていない。

PAL31 はロイシンの繰り返し構造と核移行シグナルを持つ分子量 31 KDa の蛋白質であり、またセリン/スレオニン・ホスファターゼ 2A (PP2A) の阻害蛋白と相同性を持つ新規分子で、当研究室で胎仔神経細胞から発見された分子である。その性質と構造から、PAL31(Proliferation-Associated Leucin Rich Protein, MW31KDa)と呼ばれている。マウス PAL31 はラット PAL31 と 98.9%の相同性

をもち、種間でも高く保存されている。

第一章

PAL31 の発現は、胎児脳以外では脾臓、胸腺で高く、免疫細胞においても重要な役割を持つ可能性が考えられた。Nb2 細胞はプロラクチンや成長ホルモンによって増殖が促進されるラット T リンパ腫由来の細胞株である。BAF3 は IL-3 依存性に増殖するラット B リンパ腫由来の細胞株である。プロラクチンおよび IL-3 は共に JAK-STAT 系および Ras-Raf 系をシグナル伝達系に用いるため、プロラクチン受容体を BAF-3 に発現させると、BAF-3 はプロラクチンによっても増殖が促進される。Nb2 細胞と BAF3 細胞を用いて、まず、プロラクチン、IL-3 および胎盤性プロラクチンメンバーの一つである PL-I が PAL31 の発現を誘導するか否かを調べ、PAL31 のリンパ球系細胞の増殖における役割を検討した。PL-I の組み換えタンパク質を作り、PL-I、プロラクチンおよび IL-3 存在下で Nb2 細胞と BAF3 細胞を培養し、細胞増殖に及ぼす影響と PAL31 mRNA の発現を調べた。これらの細胞の増殖と PAL31 mRNA の発現は、PL-I、プロラクチンおよび IL-3 濃度依存的であることが明らかになった。一方、増殖刺激を加えない静止期においては PAL31 mRNA 発現量は低下した。次に、フローサイトメーターを用いて Nb2 細胞の各細胞周期における PAL31 の発現を調べた結果、PAL31 mRNA の発現は G1/S 期に増加し、S 期にピークに達し、G2/M においてもその発現が維持されていることが明らかになった。また、PAL31 に対する特異的なポリクローナル抗体を作製し PAL31 タンパクの増減を調べた結果、PAL31 は S 期に最も高く、しかも核に存在していることがわかった。これらより、PAL31 の発現制御機構はプロラクチン、PL-I、IL-3 の細胞増殖シグナルの下流に存在し、細胞周期依存的に制御されていることが明らかになった。

PAL31 の機能をアンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンス）を用いて解析した。培養 Nb2 細胞にプロラクチンの刺激と同時にオリゴヌクレオチドを添加し、48 時間後に生存細胞の数を調べた結果、アンチセンス処理により生存細胞数が著しく減少することが明らかになった。この時、対照としたセンスオリゴヌクレオチド(センス)では細胞数に影響がなく、アンチセンスにより PAL31 の蛋白質の発現は特異的に減少していることも確かめられた。したがって、PAL31 は細胞の増殖に必須の分子であると考えられる。フローサイトメーターを用いた解析では、センスを導入した Nb2 細胞の 69%が S 期に入ったのに対し、アンチセンスを導入した Nb2 細胞は 34%しか S 期に入れなかったことから、PAL31 は G1/S 期への進入に必要な因子であると考えられた。

第二章

PAL31 の発現制御可能な系を用いて PAL31 の機能解析を試みた。Tet-off 発現ベクターPTre2 に FLAGPAL31 を組み込んで、細胞株 Rat1 にトランスフェクションし、PAL31 の発現がテトラサイクリン依存的に調節できる細胞 Clone A34 と Clone B27 を作製した。Clone A34 と Clone B27 を、テトラサイクリンを $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ に増やして 72 時間インキュベートし、PAL31 のタンパク量をウエスタンブロッティング法を用いて調べた結果、いずれも PAL31 蛋白の発現はテトラサイクリン依存的に抑制されることが確認された。興味深いことに、PAL31 を強制発現した細胞は S 期へ進入する細胞が 1.5 倍に増え、細胞増殖も速くなった。第一章の結果とこの結果から PAL31 は細胞増殖シグナル、特に G1/S 期への進入を促進する因子であると考えられた。

Clone A34 と Clone B27 を、 $0-2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンと 72 時間インキュベートした後、それぞれ抗ガン剤 etoposide で 24 時間処理した。アポトーシスしたかどうかは Hoechst33258 を用いた蛍光染色で観察した。その結果、PAL31 の発現により、アポトーシスに特徴的な核の断片化およびアポトーシス小体の形成は阻害されることが確認された。スライド 1 枚あたり 400 個の細胞を数えた結果、PAL31 を発現する Tet-off Rat1 細胞におけるアポトーシスが PAL31 の発現量依存的に減少した。また Nb2 細胞にアンチセンス PAL31 をトランスフェクションさせ、48 時間後、PI で染色し、フローサイトメーターにより測定したところ、DNA の含量の低下したアポトーシスの細胞が認められた。以上の結果から、PAL31 はアポトーシスを抑制する遺伝子であると考えられた。

多くのアポトーシス誘導系において、ミトコンドリアからシトクローム c が放出される。シトクローム c の抗体を用い、ウエスタンブロッティング法を用いて調べた結果 PAL31 はこの過程を抑制していないことが確認された。その代わりに、アポトーシスの重要な媒体であるカスパーゼの活性を測定した結果、PAL31 はカスパーゼの活性を抑制することが分かった。カスパーゼはアポトーシスが起る際に細胞内で活性化されるシステインプロテアーゼであり、様々な細胞死の刺激によって活性化する。PAL31 はカスパーゼの活性を阻害し、各種の細胞死を抑制することから、細胞死実行経路の主要な部分に PAL31 が深く関与することが明らかとなった。

ところで、分子量 31KDa の PAL31 は、Rat1 細胞において、etoposide により引

き起こされたアポトーシスでは、19KDa の断片が生じた。アポトーシスを引き起こす刺激によりカスパーゼのカスケードが活性化され、さまざまな細胞内タンパク質が分解される。PAL31 は、カスパーゼ 3 により切断される DXXD のアミノ酸配列をもつことから、カスパーゼ 3 により切断されることが考えられる。その可能性を検討するため、GSTPAL31 の融合タンパクを精製し、*in vitro* でカスパーゼ 3 により切断されるかどうかを調べた。その結果 58 KDa の GSTPAL31 はカスパーゼ 3 により切断され、46KDa の断片を生じた。GST は 27KDa のタンパクであり、*in vivo* と *in vitro* の結果は良く一致したことから、PAL31 は、カスパーゼ 3 により切断されることが分かった。しかし、カスパーゼの阻害剤である Z-VAD は PAL31 の分解を阻害できなかった。これを考え合わせると、PAL31 の分解はカスパーゼ 3 により切断されることとカスパーゼ以外の未同定の PAL31 分解因子が存在することが示唆された。

まとめ

以上の結果から、新規分子 PAL31 は細胞増殖とアポトーシスのバランスを保つために重要な遺伝子であると考えられる。すなわち増殖因子の刺激に応答して、PAL31 が細胞周期特異的 (G1/S 期) に誘導された。さらに、アンチセンスを導入した Nb2 細胞は細胞増殖と S 期への進入が阻害されたこと、また PAL31 を強制発現した Rat1 細胞は細胞増殖と S 期への進入が促進されたことから、PAL31 は、細胞増殖機構、特に G1/S 期への進入機構に関与していることが示された。増殖調節機構と G1/S 期への進入機構の間に、PAL31 が不可欠な因子として存在している点は興味深い。さらに PAL31 を発現する Tet-off Rat1 細胞におけるアポトーシスが PAL31 の発現量依存的に減少すること、アンチセンス PAL31 がアポトーシスを起こすこと、また PAL31 はカスパーゼの活性を抑制することから、PAL31 は抗アポトーシス分子として機能していることが明らかとなった。アポトーシスの制御不全は多くのヒト疾患の病因に関与している。アポトーシスの実行因子カスパーゼの阻害タンパクである PAL31 は治療薬開発の標的となる可能性も考えられる。また PAL31 はリンパ腫細胞での発現が高いことから、発癌機構との関連性も考えられる。今後の細胞周期研究および癌研究の新たな標的分子になる。