

論文の内容の要旨

論文題目 Effect of Vanadate on Radiation-induced MOLT-4 Cell Death

和訳 MOLT-4 放射線細胞死に対する Vanadate の修飾作用

指導教官 鈴木 紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 朱 瑾

「背景と目的」

p41 は、放射線高感受性メカニズム解明の研究の中でヒト T 細胞白血病細胞株 MOLT-4 に、X 線 10 Gy 照射 6 時間後から、細胞死の過程で新たに出現してくる分子量 41kDa のタンパク質として所属研究室で見出された。更に p41 は、SET β (p42) の、主としてカスパーゼ-7 による切断によって生ずることが明らかとなった。SET β は白血病の転座点の解析から発見され癌遺伝子の可能性が示唆されていた。また、p41 の出現は、チロシンフォスファターゼの阻害剤であるバナジン酸塩 (Vanadate) によって阻害されることが見出された。本研究では、MOLT-4 照射後の p41 生成と細胞死に対する Vanadate の抑制作用とその分子機構を調べた。

放射線誘発細胞死は、照射後分裂を経ずに速やかに死に至る間期死と、持続的な分裂能を失い、照射後数回細胞分裂して死に至る増殖死に大別される。ヒト T 細胞白血病細胞株 MOLT-4 は、放射線高感受性の間期死を示し、照射後に核の凝縮や断片化、DNA の断片化等アポトーシス様の細胞死を示す。MOLT-4 細胞の p53 遺伝子型は野生型とされており、その細胞死には p53 経路と JNK/SAPK 経路を経ている可能性が示唆されている。p53 は、一般にがん抑制遺伝子とされ、X 線照射後に p53 タンパク質の発現量が蓄積することによって標的遺伝子を転写活性化し、細胞周期進行の抑制や細胞死を引き起こすことが知られている。本研究は MOLT-4 の照射後、及

び Vanadate 処理後における p41 の生成過程とそのメカニズム及び、p53 のリン酸化状態の変化と転写活性など、p53 経路の関与の可能性を中心に解析した。

「材料と方法」

- 1) 用いた細胞はヒト T 細胞白血病株 MOLT-4 である。X 線照射は島津 X 線発生装置 (200kV, 20mA, 0.5 mm Cu+1.0 mm Al フィルター) より得られる X 線 (1.46 Gy/min) を用いた。特記なき場合、Vanadate の添加は照射直後に行った。
- 2) MOLT-4 照射後 p41 の生成は、当研究室で開発した p41 特異抗体 AM-4 を用い、Western blotting 法で検出した。更に、Vanadate による p41 生成の抑制濃度を検討した。
- 3) X 線誘発細胞死の判定は、エリスロシン B 染色による色素排除試験を行い、染色された細胞 (死細胞と考えられた) と色素に染まらない細胞 (生細胞と考えられた) を計数し、生存率 (Viability) を算出した。また、細胞死に伴うミトコンドリア膜電位の消失を、MitoTracker 染色によるミトコンドリアの染色性の喪失により検出した。X 線照射後 MOLT-4 細胞の DNA 断片化は、DNA アガロースゲル電気泳動で検討した。
- 4) カスパーゼ活性化、p53 の蓄積、p53 Ser-15 リン酸化、p53 の転写産物のタンパク量などを Western Blotting 法で調べた。
- 5) RT-PCR 法により p53 転写産物の mRNA を解析した。
- 6) 2次元電気泳動法で、照射後の p53 リン酸化の変化を分析した。

「結果と考察」

- 1) p41 生成の Vanadate による抑制、カスパーゼ-3, -7, -9 の切断と DNA 断片化の抑制

X 線 10 Gy 照射後 9 時間、p42 のカスパーゼ切断産物である p41 が検出され、カスパーゼ-3, -7, -9 は照射後 6 時間から切断 (活性化) された。DNA 断片化は照射後 9 時間に見られた。X 線照射と Vanadate との併用処理により、p41 の生成だけでなく、照射後のカスパーゼ-3, -7, -9 の活性化と DNA 断片化のいずれもが阻害されることが明らかとなった。

- 2) Vanadate による MOLT-4 の照射後生存率 (Viability) に対する影響

MOLT-4 は、X 線照射後、速やかに死に至る。10 Gy 照射 24 時間後の Viability は 5.5% を示したのに対し、Vanadate との併用処理では、10 Gy 照射 24 時間後、37% の Viability にまで細胞死が抑制された。更に、添加濃度とタイミングについて検討し、1 mM を原則として照射直後に加えることとした。

3) Vanadate はシトクローム *c* の放出、ミトコンドリアの膜電位低下を抑制するが、カスパーゼに対する直接の不活性化作用はない

MOLT-4 は X 線照射後 6 時間で、シトクローム *c* のミトコンドリアからの細胞質への放出が検出された。Vanadate 処理は、照射後の MOLT-4 ミトコンドリアのシトクローム *c* 放出と膜電位低下を抑制した。また、リコンビナントの活性化カスパーゼを用いた *in vitro* での活性測定では、Vanadate は直接カスパーゼを阻害しなかった。これらの結果から、Vanadate はシトクローム *c* の上流に位置し、作用していると結論した。

4) Vanadate が照射後の p53 のリン酸化と、転写活性化の抑制を介して細胞死を抑制する可能性

我々の研究室で作製した p53 Ser-15 のリン酸化抗体を用いて調べた結果、照射 3 時間後、Ser-15 のリン酸化が検出され、Vanadate 処理では抑制された。また、2 次元電気泳動法による p53 のリン酸化スポット量の比較からも、同様のリン酸化抑制効果がみられた。更に、p53 によって転写誘導される細胞周期調節因子 p21/Waf1 の誘導も Vanadate 処理で抑制された。

p53 によって転写誘導され細胞死誘導に関与するとして、これまでに Bax、PIG3、Noxa、p53AIP1、PUMA 等が提示されている。そこで、MOLT-4 のアポトーシス様放射線急速細胞死にこれらの因子の遺伝子発現が関わっているか、RT-PCR 法と Western Blotting 法により、これらの mRNA やタンパクの定量を行って検討し、Vanadate の細胞死抑制効果との関連を調べた。RT-PCR の結果、PIG3 は非照射で既に発現しており、照射による変化は見られなかった。また、PUMA は、BH3 ドメインを持たないアポトーシス非誘導性の δ 型が照射 1 時間後に発現誘導されたが、アポトーシスを引き起こす活性のある α 型と β 型は 4 時間以降も検出されなかった。Bax、Noxa、p53AIP1 については、誘導や増加の時間や程度、発現量に違いはあるものの、照射後の mRNA の

増加誘導が見られ、時間的には Bax、Noxa は照射後 1 時間から mRNA 量の増加が、p53AIP1 は照射 4 時間後から発現が見られた。しかしながら、Western Blotting では Bax 量の変化は顕著でなく、p53AIP1 の誘導は、カスパーゼが活性化、照射 6 時間後より遅く、照射 12 時間後であった。これら結果から、Bax、PIG3、p53AIP1、PUMA が MOLT-4 のアポトーシス様放射線急速細胞死の誘導に関与している可能性は低いと考えられた。一方、Noxa は、RT-PCR で照射 1 時間後から、Western Blotting でも照射 3 時間後から発現の増加が認められ、時間的な誘導のタイミングはカスパーゼの活性化が生じる照射 6 時間後より前であり、Vanadate 処理により抑制されることから、MOLT-4 細胞死の誘導に関わっている可能性が示唆された。

転写因子である p53 の制御には発現量と、リン酸化やアセチル化などの特定部位の翻訳後調節がその活性調節に重要な役割を果たしていることが知られている。特に近年、リン酸化による p53 転写活性化機構の研究は目覚ましく進展しつつあり、Ser-15、Ser-46 を初めとする発現量の蓄積やアポトーシスの誘導に関わるリン酸化部位を同定する試みが盛んに行われているが、p53 分子内に 9 個あるチロシン残基のリン酸化について報告はあるものの、その部位の同定や意義については未解明のままである。Vanadate 処理による p53 の抑制は、チロシンリン酸化の亢進が一因かもしれない。Vanadate の抑制効果における p53 のチロシンリン酸化の検出、リン酸化部位の特定を現在進めている。一方、細胞死における情報伝達経路は複雑で、JNK/SAPK 経路等、他の可能性について検討の余地も残る。

以上の結果から、Vanadate 処理により、ミトコンドリアからのシトクローム *c* の放出とカスパーゼの活性化、放射線誘発 MOLT-4 細胞死が抑制されていることが明らかとなった。更にその原因として、p53 経路とくに、p53 から Noxa の経路の可能性を示した。