

論文の内容の要旨

論文題目 キナーゼによるミトコンドリア依存的細胞死制御機構の解析

氏名 鶴田 文憲

生物は、発生や分化の過程、また恒常性維持において、不必要になった細胞を除去する機構を備えている。この機構はアポトーシスと呼ばれ、生物の生存に重要な役割を担っている。また、種々の神経変性疾患で観察される神経細胞死もアポトーシスの異常から発症することが知られている。そのため、アポトーシスの分子機構を解明することは、生命現象を理解するのみならず、様々な神経変性疾患の治療法確立に多大な貢献をするものと考えられる。

近年、アポトーシスの制御にミトコンドリアが重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。様々なストレス刺激で活性化した細胞死シグナルは、一度ミトコンドリアに収束し、シトクロム C を細胞質に放出する。細胞質に放出されたシトクロム C は、アダプタータンパク質である Apaf-1 を介して、カスパーゼ 9 と、その下流のカスパーゼ 3、6、7 を活性化して細胞死を誘導する。カスパーゼとはアポトーシスの実行において中心的な役割を果たすプロテアーゼである。このように細胞死シグナルがミトコンドリアに到達してから細胞死に至るまでの機構は比較的良く研究されているが、細胞死シグナルがミトコンドリアに至るまでの分子機構の詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では、細胞死誘導タンパク質である Bax に着目して解析を行った。Bax とその類似タンパク質である Bak のダブルロックアウト細胞では、様々なストレス刺激を加えてもシトクロム C の放出や細胞死が起こらないことから、Bax がミトコンドリアの上流で、細胞死シグナル伝達に必須の役割を果たしていることが示唆されていた。通常、Bax は細胞質に局在しているが、様々なストレス刺激を受けることでミトコンドリアへと移行し、シトクロム C の放出を誘導する。しかしながら、どのようにして Bax の局在変化が制御されているかは不明であった。そこで本研究では、生存シグナルと細胞死シグナルが、それぞれ Bax の局在を制御する分子機構について検討した。

まず、様々なストレス刺激によって引き起こされる細胞死が Akt や MAPK といったキナーゼにより抑制されることから、これらのキナーゼが Bax のミトコンドリア移行を抑制するか検討した。最初に、血清が細胞の生存促進に働く系において、血清刺激が Bax の局在を制御するかを調べた。その結果、HeLa 細胞では血清を除去することで Bax のミトコンドリア移行が起こり、血清刺激が Bax を細胞質にとどめておくのに必要であることが示唆された。次に、血清刺激や増殖因子刺激の下流で活性化する PI3K-Akt 経路や MAPK 経路のいずれが、Bax のミトコンドリア移行を抑制する働きがあるか検討した。PI3K 阻害剤を用いて、PI3K-Akt 経路を抑制したところ、血清刺激

による Bax のミトコンドリア移行抑制効果が部分的に阻害された。一方、MAPK 経路を抑制する MAPKK 阻害剤を加えた場合は、このような効果は見られなかった。従って、血清刺激は PI3K-Akt 経路を介して、Bax のミトコンドリア移行を抑制している可能性が示唆された。そこで次に、活性化型 Akt を細胞に発現して Bax の移行を抑制できるか検討した。Bax の局在は、GFP と Bax の融合タンパク質 (GFP-Bax) を細胞に発現させてモニターした。GFP-Bax を発現させた細胞に、細胞死誘導剤であるスタウロスポリンを処理すると GFP-Bax がミトコンドリアに移行した。このとき活性化型 Akt を発現させておくと、スタウロスポリン刺激による GFP-Bax の移行が抑制されることが示された。さらに、活性化型 Akt が内在性 Bax のミトコンドリア移行も抑制できるか調べた。細胞を分画し、ミトコンドリア画分中に含まれる内在性 Bax 量を調べたところ、スタウロスポリン刺激はミトコンドリア画分の Bax 量を増加させたが、活性化型 Akt の発現により、この効果が抑制された。以上の結果から、血清刺激による生存シグナルは PI3K-Akt 経路の活性化を介して、Bax のミトコンドリア移行を抑制することが示された。

次に、ストレス刺激による Bax のミトコンドリア移行誘導機構について検討した。本研究では、Bax の移行を促進するメディエーターの候補として JNK に着目した。JNK は様々なストレス刺激で活性化するキナーゼで、JNK 遺伝子を欠損したマウス線維芽細胞では、UV 照射によるシトクロム C の放出や細胞死誘導が起こらないことが報告されていることから、JNK はミトコンドリアの上流で細胞死誘導に寄与していることが示唆されている。そこで、JNK が Bax のミトコンドリア移行を促進するか検討した。その結果、活性化型 JNK を GFP-Bax と共に細胞に発現させたところ、GFP-Bax のミトコンドリア移行が促進された。また、JNK 阻害剤を前処理しておくと、JNK 活性化剤であるアニソマイシン刺激による GFP-Bax のミトコンドリア移行が抑制された。このことから JNK は GFP-Bax のミトコンドリア移行を促進するのに重要な働きをすることが示唆された。さらに、JNK が内在性 Bax のミトコンドリア移行を促進するか検討した。ミトコンドリア画分中に含まれる内在性 Bax 量を調べたところ、活性化型 JNK を発現させた細胞では、ミトコンドリア画分に含まれる Bax 量が増加した。以上の結果から、JNK が Bax のミトコンドリア移行を促進する機能があることが示された。次に、どのようなメカニズムで JNK が Bax のミトコンドリア移行を促進するか検討した。最近、14-3-3 が Bax の細胞質アンカーとして機能しているという仮説が報告された。すなわち、通常、Bax は 14-3-3 と結合することで細胞質に局在しているが、細胞死刺激で活性化したカスパーゼが 14-3-3 を切断すると、Bax が 14-3-3 から解離してミトコンドリアへ移行するというモデルである。しかしながら、カスパーゼ阻害剤存在下でも Bax のミトコンドリア移行が起こる系もあることから、カスパーゼ以外にも 14-3-3 と Bax の解離を制御する機構があるものと考えられる。14-3-3 は、細胞内に豊富に存在するタンパク質で、ほ乳類では 7 種類のアイソタイプが報告されている。さらに、これらのアイソタイプのうち β 、 ϵ 、 ζ 、 σ には JNK によってリン酸化される配列 SP が存在する。そこで本研究では、JNK が 14-3-3 をリン

酸化することで、14-3-3 と Bax との結合能が低下するというメカニズムがありうるのではないかと考えた。そこで最初に、JNK が 14-3-3 をリン酸化するか検討したところ、JNK は *in vitro* で 14-3-3 と σ をリン酸化することがわかった。次に、細胞内で JNK が 14-3-3 をリン酸化するかを調べるために、14-3-3 とのリン酸化された S184、14-3-3 σ のリン酸化された S186 に特異的に反応する抗体を用いたウェスタンブロットティングにより検討した。その結果、アニソマイシンで細胞を刺激すると、14-3-3 と σ のリン酸化が有意に上昇していた。また、JNK 阻害剤を前処理しておく、アニソマイシン刺激による 14-3-3 のリン酸化が抑制された。以上の結果より、JNK は細胞内で 14-3-3 と σ をリン酸化することが示された。次に、JNK の活性依存的に 14-3-3 と Bax の結合能が低下するか検討した。Bax 抗体で内在性 Bax を免疫沈降し、共沈してくる 14-3-3 量を調べた結果、活性型 JNK を発現させた細胞では共沈してくる 14-3-3 量が減少することがわかった。さらに、JNK による 14-3-3 のリン酸化依存的に Bax との結合が制御されているか検討した。GST pull down 法により、GST-14-3-3 と結合してくる Bax 量を調べた結果、あらかじめ活性型 JNK でリン酸化反応を行った 14-3-3 は Bax との結合能が減少することを見いだした。一方、不活性型 JNK でリン酸化反応を行った 14-3-3 や 14-3-3 のリン酸化部位変異体ではこのような効果は見られなかった。このことから、14-3-3 は JNK によるリン酸化依存的に Bax との結合能が制御されていることが示唆された。次に 14-3-3 が JNK による細胞死誘導において主なターゲットであるのかを検討するため、14-3-3 とおよび σ のリン酸化部位変異体を細胞に発現させ、GFP-Bax のミトコンドリア移行、シトクロム C の放出、核凝集による細胞死について調べた。その結果、14-3-3 変異体を発現させた細胞は、コントロールと比べ、Bax の移行、シトクロム C の放出、細胞死のそれぞれを有意に抑制することが示された。以上の結果から、JNK は 14-3-3 のリン酸化を行うことで 14-3-3 と Bax の解離を誘導し、その結果、Bax のミトコンドリア移行を促進し、シトクロム C の放出や細胞死を誘導する可能性が示唆された。

本研究の結果より、前半では PI3K-Akt 経路が Bax のミトコンドリア移行を抑制するのに重要であること、後半では JNK が Bax のミトコンドリア移行を促進すること、またこの際、JNK が 14-3-3 をリン酸化することで Bax が 14-3-3 から解離し、ミトコンドリアへ移行するという分子機構が示唆された。本研究で明らかにした Akt や JNK による Bax のミトコンドリア移行の制御機構が、様々な神経変性疾患の発症機構の解明や、それに基づいた治療法の開発につながることを期待される。