

審査の結果の要旨

砂山 潤

様々なストレス刺激によって活性化した細胞死シグナルはミトコンドリアに収束し、膜透過性を亢進してシトクロム C を放出する。細胞質に放出されたシトクロム C はカスパーゼカスケードを活性化し、カスパーゼは様々な基質を切断することで細胞死を誘導する。このミトコンドリア膜透過性を調節する分子群として Bcl-2 ファミリータンパク質が重要であることが示されている。

Bcl-2 ファミリータンパク質は、細胞死抑制性メンバー（Bcl-2 など）と細胞死促進性メンバーに大別され、促進性メンバーさらに Bax などの Bax サブファミリーと Hrk や Bad などの BH3-only サブファミリーに分けられる。BH3-only サブファミリーは抑制性 Bcl-2 メンバーをターゲットとし、その Bax サブファミリーに対する抑制能力を阻害することで細胞死を誘導すると考えられているが、その詳細な細胞死誘導機構は明らかとなっていない。BH3-only サブファミリーは、ほ乳類では少なくとも 10 種が同定されており、細胞死刺激ないしは細胞の種類に応じて特異的に機能するのではないかと予想されている。本研究では、BH3-only サブファミリータンパク質の Hrk と Bad に関しての研究を行った。Hrk については、新しいターゲットについて解析を行い、Bad については細胞死シグナルをミトコンドリアへ伝えるメディエーターの一つである JNK との関係について解析を行った。

第一章では、研究の背景、既往の研究及び本研究の意義について述べた。

第二章では、Hrkによる細胞死誘導機構について解析を行った。Hrkはアミロイドβペプチドによる大脳皮質ニューロンの細胞死の過程で発現が誘導されることなどが知られている。そのターゲットとしては、抑制性Bcl-2メンバーがあるが、本当にこれだけで十分であるかは不明であった。そこで、yeast two-hybrid法によりHrkに結合するタンパク質のスクリーニングを行った。その結果、ミトコンドリアタンパク質のp32を単離した。p32は三量体による孔形成能を持つミトコンドリアタンパク質であるが、その機能はよくわかっていない。in vitro結合実験、免疫共沈実験及び免疫染色実験からHrkとp32は特異的に結合すること、Hrkとp32はミトコンドリアで共局在することが明らかとなった。これらの現象はp32の保存されたC末端側領域に依存していた。また、Hrk過剰発現による細胞死はp32のN末端側ミトコンドリアシグナルシーケンスを欠損したp32ΔNや保存されたC末端側領域を欠損したp32ΔCの発現により抑制できた。p32ΔNはHrkに結合することでHrkに対し優性抑制的に機能し、p32ΔCはこの欠変異体を含む三量体、すなわち不完全な孔の形成により内在性p32の機能を抑制することによるものと考えられる。さらに、RNAiによりp32の発現をノックダウンしたところ、Hrkによる細胞死を顕著に

抑制した。以上の結果はHrkによる細胞死誘導の過程にp32が密接に関わっていることを示唆している。

第三章では、JNK による細胞死誘導機構の解析を行った。JNK は MAP キナーゼファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼで、さまざまなストレス刺激に応答しミトコンドリアへシグナルを伝え、細胞死を誘導する。しかし、JNK の標的因子は必ずしも明らかでなかった。本研究では JNK の基質として 14-3-3 に着目した。14-3-3 は多数の細胞死促進因子 (Bad, FKHL1、Nur77 など) と結合し、その細胞死誘導活性を抑制することが知られている。また、14-3-3 は *in vivo* でリン酸化されていることが分かっていたが、そのキナーゼは不明であった。そこで、14-3-3 が JNK のターゲットである可能性を検証した。14-3-3 の標的因子の一つに BH3-only サブファミリーの Bad がある。Bad は生存シグナルにより活性化された Akt や PKA によりリン酸化され、リン酸化された Bad は 14-3-3 と結合することによってミトコンドリアから細胞質に移行して、その細胞死活性を失う。14-3-3 上の JNK リン酸化部位と 14-3-3 の Bad が結合すると考えられる部位は近傍にあることから、14-3-3 と Bad の結合に JNK による 14-3-3 のリン酸化がなんらかの影響を及ぼすのではと考えた。その結果、JNK は 14-3-3 上の Ser184、14-3-3 の Ser186 をリン酸化すること、それによって 14-3-3 から Bad が遊離することが明らかとなった。さらに JNK は Bad のミトコンドリア移行を促進した。14-3-3 は Bad の細胞質アンカーとして機能しているので、JNK による Bad のミトコンドリア移行は 14-3-3 のリン酸化によるものと考えられる。以上のことは、JNK が 14-3-3 を標的に Bad を解離させ、Bad のミトコンドリア移行を促進している可能性を示唆している。

第四章では、本研究を総括し、今後の研究の展望を述べた。

本研究では、Hrk の新たなターゲットとして p32 を同定した。また、JNK が 14-3-3 のリン酸化を介して Bad を制御していることを示した。アポトーシスは神経変性疾患や癌など様々な疾患と密接に関係していることから、今後、新たな治療法の開発へとつながることが期待される

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。