

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 郝 艶 彦

本研究は新規ヒト IAP ファミリータンパク質 Apollon による細胞死の制御とその分子機能を解明する目的で研究を行って、下記の結果を得ている。

1. ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞に Caspase 8、9 を一過性に発現させるとアポトーシスを起こすが、Apollon を Caspase 8、9 と同時に発現させると、Caspase により誘導されるアポトーシスを抑制した。また、Apollon の恒常性発現細胞株は抗癌剤、TNF や Fas 刺激等によるアポトーシスに耐性を示した。さらに、Apollon の恒常性発現細胞株を用いて各種細胞死刺激による Caspase 活性化を DEVD-MCA 切断活性で調べた結果、Apollon 発現細胞では Caspase 3 活性化が抑制されていることが示された。
2. Apollon は成熟型 Smac、成熟型 HtrA2、活性化 Caspase 9 と結合した。Apollon の各種欠変異体を用いた実験より、Apollon の全長 4829 アミノ酸のうち 1~1648 番までのアミノ酸からなる Apollon 断片が Smac、HtrA2、Caspase 9 との結合することが示された。この断片に存在する BIR ドメインに変異を加えた 1-1648 C327A は三つのタンパク質との結合活性を失ったことから、Apollon の BIR ドメインは Smac、Caspase 9、HtrA2 との結合に重要であることが明らかになった。一方、未成熟型 Smac、HtrA2 前駆体は Apollon と結合せず、ミトコンドリアターゲットシグナル (MTS) が除去された成熟型 Smac、HtrA2 の N 末端 4 アミノ酸残基が Apollon との結合に重要であることも示された。
3. Apollon は C 末端に他の IAP ファミリーにはない UBC ドメインを持つ。この UBC ドメインは、異種間でよく保存されていることから何らかのタンパク質のユビキチン-プロテアソーム-システムによる制御を行っている可能性が考えられた。Ubiquitination Assay を行ったところ、Apollon は *in vivo* で Smac、活性化 Caspase 9 をポリユビキチン化することを見出した。さらに、Apollon を過剰発現した細胞では、Smac、Caspase 9 の分解が亢進していた。それに対して、Apollon と結合しない Smac の変異体は分解が亢進されなかった。
4. 生理的発現量の Apollon による細胞死の制御を解析するために、Apollon 欠損マウス

胎仔線維芽細胞 (MEF) を用いてアポトーシス刺激に対する感受性を検討したところ、Apollon 欠損 MEF は、抗癌剤や Fas 抗体などさまざまなアポトーシス刺激に高感受性を示した。興味深いことに、Apollon<sup>-/-</sup> MEF 細胞に全長 Smac や細胞質に発現する活性型 Smac を導入すると細胞死が引き起こされることが明らかになった。また、この細胞死は Apollon、XIAP の発現により抑えられた。さらに Smac による細胞死誘導の機能を調べるため、一連の Smac 変異体を作製し、Apollon<sup>-/-</sup>細胞と Apollon<sup>+/+</sup>細胞との感受性の差を検討したところ、アポトーシスの誘導には成熟型 Smac の N 末端 AVPI 配列が必要であることが明らかになった。Smac の発現による細胞死の誘導は siRNA により Apollon の発現をノックダウンさせた細胞でも同様の結果が得られた。

以上、本論文において、Apollon は Smac、Caspase 9 と結合し、これらの分子のユビキチン-プロテアソーム-システムによる分解を促進することにより、アポトーシスを阻害していることが明らかとなった。また、Apollon 欠損マウス由来の細胞はさまざまな刺激に対する細胞死感受性が高まることから、Apollon は生理的にアポトーシス抑制作用に重要であると考えられる。さらに、Smac を過剰発現すると Apollon 欠損細胞において細胞死を誘導したことから、Apollon は Smac による細胞死誘導から細胞を守るために必要な分子であることがはじめて示された。本研究はアポトーシス制御の臨床応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。