

## 論文の内容の要旨

論文題目 単球系腫瘍細胞に存在するグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の効率的な分解系に関する研究

氏 名 山口 光峰

グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) は古くからグリセルアルデヒド-3-リン酸から 1,3-ビスホスホグリセリン酸への反応を触媒する解糖経路に重要な働きをする酵素として知られてきた。近年ではそれに加えチューブリンの重合、膜融合、転写因子の調節などにも関与する多機能酵素であるという報告が数多くなされている。そのうえ、ある種のアポトーシス誘起過程で増減することが示されて以来、細胞内 GAPDH 含量の変動することが様々な細胞機能に影響を与えられている。細胞内の多くのタンパク質はリソソームに取り込まれ分解される。GAPDH の場合にも栄養飢餓時に誘導されるシャペロン分子 hsc73 と複合体を形成し、リソソーム膜上の LAMP2 分子を介してリソソームに取り込まれアミノ酸まで分解されることが報告されている。このようなシャペロン介在性オートファジーによる GAPDH 分解がある程度促進されても細胞内の GAPDH 含量は多いため、GAPDH の機能が低下する可能性は少ないと考えられている。多くの研究者が未知なる GAPDH の生理機能の解明を試みているが、シャペロン介在性オートファジー以外の GAPDH 分解経路について解明されていないのが現状である。

筆者は細胞内の N 末端アシル化タンパク質の分解に関与するアシルペプチドヒドロラーゼ (ACPH) の細胞内機能を研究する中でその阻害剤アセチルロイシンクロロメチルケトン (ALCK) によりヒト組織球性リンパ腫 U937 細胞中の GAPDH 分解が促進されることを見いだした。この現象は hsc73 量の変動することの無い細胞抽出液で検出されたことより U937 細胞中にはシャペロン介在性オートファジーとは異なる GAPDH 分解経路が存在することが

推測された。新たな GAPDH の分解経路を解明することは細胞内の様々な GAPDH 機能を理解するために役立つと考えられる。

そこで本論文ではまず ALCK により促進される GAPDH の分解現象を見出した研究について触れ、その分解が ALCK によって生じる構造変化が引き金となって誘導されることについて論述する。さらに、その構造変化した GAPDH の分解に関与する酵素の性状を解析した結果を述べ、最後にその GAPDH 分解経路の意義について過去の報告などを参考に考察を行う。

### 1) ALCK により促進される U937 細胞抽出液中の GAPDH 分解現象

筆者は様々な白血病細胞を用いて ACPH の細胞内機能を研究する中でその酵素阻害剤アセチルロイシンクロメチルケトン (ALCK) が試験したすべての白血病細胞株 (U937, Jurkat, K562 および MOLT-3) にアポトーシスを誘起することを見いだした。すべての細胞中の ACPH 活性は ALCK により同程度の阻害であったにも関わらず、ALCK はヒト組織球性リンパ腫 U937 細胞に対しては顕著に抑制効果を発揮した。このため、U937 細胞中には ACPH とは異なる ALCK 感受性の標的分子が存在することが考えられたのでその解析を行うこととした。

まず、ALCK を U937 細胞抽出液に添加し加温することで細胞内タンパク質に変化が生じるか否かを SDS-PAGE により解析したところ、37°C で処理した場合に 36kDa タンパク質バンドの減少が ALCK の濃度依存的に観察された。しかし、この変化は ALCK の合成原料である LCK や 4°C で処理した場合には認められなかった。また、他の細胞抽出液を ALCK 処理してもこの変化は認められなかったため、このタンパク質を解析することが ACPH とは異なる ALCK 感受性の標的分子の解明につながると考え、その同定を試みた。未処理の U937 細胞抽出液よりタンパク質の精製を行ったところ、目的のタンパク質は等電点が塩基性であったため、比較的容易に単離することができ (図 1 A)、29 残基の N 末端アミノ酸配列の情報 (GKVKVG...) が得られた。そこでこの配列を Protein Database Search Programs (BLAST) にて検索した結果、ヒト肝臓由来の cDNA から決定された GAPDH の N 末端付近配列と 100% 一致していた (図 1 B)。そのうえ、抗 GAPDH モノクローナル抗体を用いた Western blotting 法による GAPDH タンパク質ならびに NADH 生成活性の低下も確認できたことより、ALCK 処理により U937 細胞抽出液中で減少した 36kDa タンパク質は GAPDH であると判明した。

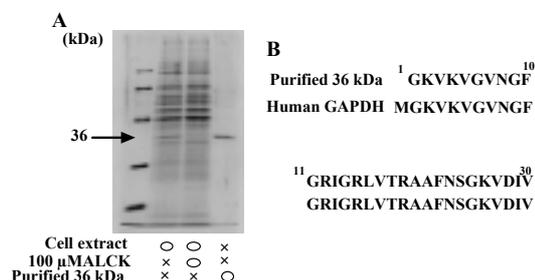


図1 ALCK処理で減少した36kDaタンパク質(A)とそのN末端アミノ酸配列 (B)  
(A) ALCKを添加することでU937細胞抽出液で減少した36kDaタンパク質の単離に成功した。  
(B) 36kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列を分析し、既知タンパク質と比較したところ、ヒト肝臓由来細胞のcDNAから得られたGAPDHの配列と100%一致していた。

ここで認められた GAPDH 分解現象は明らかにシャペロン介在性オートファジーによって行われているとは考えにくく、U937 細胞中にはこれとは異なる GAPDH 分解系が存在するこ

とが示唆された。そのため、筆者はこの分解経路を解明することが多機能酵素である GAPDH をより理解することにつながると考え、ALCK により促進される U937 細胞抽出液中の GAPDH 分解現象の解析を行った。

## 2) ALCK によって生じる GAPDH の構造変化

ALCK により促進される GAPDH 分解機序を探るために、ALCK を添加することで生じる U937 細胞抽出液中の GAPDH 活性阻害と分解の経時的変化を観察した。その結果、両者は同時に生じるのではなく酵素活性の阻害が酵素の分解に先行して起こることが明らかになった。そこで、ALCK が直接 GAPDH に影響を与えるか否かを検討した。精製した GAPDH を ALCK で処理すると活性は阻害されたが分解は起こらなかった。この ALCK による GAPDH の阻害様式は GAP に対しては非拮抗阻害、 $\text{NAD}^+$  に対しては拮抗阻害であった。さらに、ALCK で GAPDH を処理するとその内部蛍光は増加することなどより ALCK は GAPDH の構造変化を誘起することを明らかにした。

さらに、1mM ALCK をヒト赤血球由来 GAPDH に処理しゲルろ過で過剰の ALCK を除いた ALCK 修飾 GAPDH (構造変化した GAPDH) を U937 細胞抽出液に添加することで、23kDa の分解断片を伴う GAPDH 分解が観察されたため、ALCK により生じる GAPDH の構造変化はその分解を誘起する上で重要であると考えられた。従って、この構造変化を何らかの分解酵素が認識し 23kDa の分解断片を形成すると考え、この分解酵素の性状解析を行った。

## 3) ALCK 処理 GAPDH の分解に関与する酵素の性状

ALCK により促進される細胞抽出液中での GAPDH 分解は、セリンプロテアーゼの広域阻害剤である diisofluorophosphate (DFP) の併用で強力に阻害されたため、ALCK 処理 GAPDH の分解には何らかのセリンプロテアーゼが関与することが明らかになった (図 2)。 $3 \times 10^8$  個の細胞抽出液を出発原料として Superose6 によるゲルろ過及び hydroxyapatite カラムを用いて GAPDH 分解活性を示す粗画分を得た。本酵素活性はゲルろ過により超高分子量 (500 万以上) 画分に回収された。U937 細胞中には高分子量プロテアーゼとしては 2 種類 (プロテアソームとトリペプチジルペプチダーゼ II) の存在が報告されているが、これらは各カラムでの挙動、そして阻害剤に対する阻害特性が本酵素とは異なっていた。

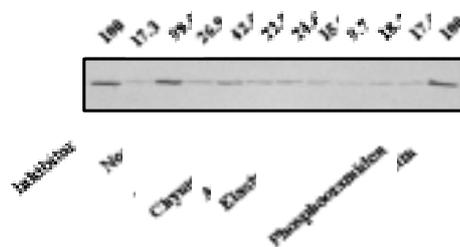


図2 ALCK処理で分解するGAPDH分解機構に対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響

U937細胞抽出液にALCKならびに各種プロテアーゼ阻害剤を添加した時の分解抑制効果

表1 様々な細胞抽出液中でのGAPDH活性の阻害と分解活性

細胞名	% of control		細胞名	% of control	
	活性	分解活性		活性	分解活性
U937	0.5*	47.1*	NALL-1	1.2*	103.0
THP1	1.3*	40.4*	K562	0.3*	98.8
Jurkat	0.8*	92.0	PC10	3.9*	97.6
CCRF-CEM	0.8*	103.9	HT-29	3.6*	97.8
MOLT-3	1.0*	114.4	PANC-1	1.7*	96.0
NALM-6	0.5*	93.0	T-47D	0.3*	97.6
Daudi	1.3*	108.0	HT-1080	0.7*	101.5

それぞれの細胞抽出液に 80 μM ALCK を添加し 37°C、3 時間加温し、残存するGAPDH活性及びGAPDH 抗原量を未添加群と比較し、(% of control)として表した。  
\*Significantly different from untreated cell extract, p<0.001.

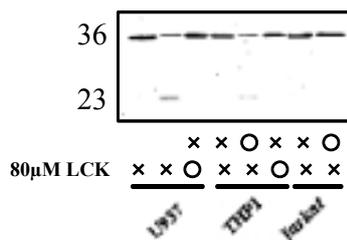


図3 単球系腫瘍細胞の抽出液中での23kDa分解断片の形成  
それぞれの細胞抽出液に 80μM ALCKまたはLCK を添加し 37°C、1 時間加温し、抗GAPDH抗血清を用いたWestern blotting法にて23kDaの分解断片の形成を試験した。

また、ALCK 処理 GAPDH を分解する酵素活性は至適 pH が塩基性で幅広く認められることや、GAPDH 中の Trp195-Arg196 間を切断し 23kDa と 17kDa の分解断片を形成することまでを明らかにした。

最後に ALCK により促進される GAPDH 分解系の細胞特異性を検討した。各種がん細胞株より得られた細胞抽出液に ALCK を添加し、GAPDH 分解が生じるかを検討した。また同時に GAPDH 活性への影響を検討した。その結果、ALCK は試験したすべての細胞の GAPDH 活性を阻害したが（表 1）、単球系腫瘍細胞である U937 細胞ならびに THP-1 細胞でのみ 23kDa 形成を伴う GAPDH 分解を起こした（表 1、図 3）。この酵素の細胞内局在については今後の検討課題である。

#### 4) まとめ

これまでに GAPDH の分解経路としてシャペロン介在性オートファジーが知られてきた。しかし、今回の研究で単球系腫瘍細胞中にはオートファジーの経路とは異なる GAPDH 分解系が存在することを明らかにした。この分解系は ALCK によって GAPDH の構造変化が誘起され、それが引き金となってプロテアソームや TPP II とは異なる未知の超高分子量セリンプロテアーゼが関与することが分かった。この酵素は塩に不安定であるなど精製に困難さを伴うが今後単離同定の実験を引き続き行う予定である。

この ALCK 処理 GAPDH の分解は、予備的な実験ではあるが単球でも観察されたことから、以下のような生理的役割を有するのではないかと推測している。ALCK により GAPDH 分解が促進されるのは何らかの内因性因子による疑似反応であると考えている。

単球系細胞は、酸化ストレスを受ける機会が多く GAPDH が S-ニトロ化や S-チオニル化などにより様々な修飾変性を受けることが知られている。

著者は、今回の研究で見出した GAPDH 分解系は炎症部位などで変成した GAPDH を除去するために働く可能性を提案している。実際、主要な脂質過酸化産物である 4-hydroxynonenal が GAPDH の分解を促進することを示すデータも得ている。今後は酸化障害時におけるこの GAPDH 分解系の意義及び細胞死との関係について解析する予定である。