

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 鳥海 和也

ポリアラニン鎖によるミトコンドリアを介した毒性誘導機構の解明

近年、トリプレットリピート病と呼ばれる、特定の遺伝子内に存在する三塩基リピートが伸長することにより発症する遺伝性疾患が次々と発見されてきている。このトリプレットリピート病の中でも、原因遺伝子内のアラニンリピートが伸長することにより発症するのが、ポリアラニン病と呼ばれる一連の疾患群である。現在までに、眼咽頭性筋ジストロフィーや合多指症など、9つの疾患が含まれることが分かっている。ポリアラニン病原因遺伝子の多くは転写因子であり、そのほとんどが約20残基以上の伸長により発症するのが特徴である。また、症状は全身様々な組織に現れるが、共通の特徴として、患部細胞内において、ポリアラニン鎖を介した原因タンパク質どうしの分子間結合により、主に細胞質においてオリゴマー化や凝集体形成が確認されることが挙げられる。

先行研究により、YFPを融合させた長いポリアラニン鎖のみでも、培養細胞において、ポリアラニン病の特徴である凝集体を形成し、細胞毒性を再現することが明らかにされた。これは、伸長したポリアラニン鎖自体に細胞毒性を誘導する何らかの機能が備わっていることを示唆するものである。しかし、現在までに、このポリアラニン鎖が直接どの様な経路に沿って、細胞に毒性をもたらすのかを詳細に調べた報告はない。

そこで、本論文提出者は、修士課程での研究においてスクリーニングされたポリアラニン結合タンパク質の中に、ミトコンドリアタンパク質が多く含まれていたという結果から、ポリアラニン鎖がミトコンドリアを介し細胞毒性を誘導しているのではないかと、という仮説をたて本論文において検証した。

まず、ポリアラニン鎖がミトコンドリアと直接相互作用している可能性を、培養細胞を用い検討している。YFP融合ポリアラニン鎖を発現させたCOS-7細胞より、細胞分画を行ったところ、ミトコンドリア画分からYFPが検出され、ポリアラニン鎖とミトコンドリアとの相互作用が示唆された。さらに、この相互作用に必要なポリアラニン鎖の長さの閾値の検討を、様々な長さのYFP融合ポリアラニン鎖を発現させた細胞を用い、分画により行ったところ、23残基以上のポリアラニン鎖がミトコンドリアと相互作用するという結果を得た。この結果は新規の知見であるのみならず、ポリアラニン病の発症がポリアラニン鎖の20残基以上の伸長により引き起こされていることを考えると、このミトコンドリアとポリアラニン鎖との相互作用がポリアラニン病の発症に関与している可能性が強く示唆される結果であった。

次に、このミトコンドリアとの相互作用により、ミトコンドリアの機能が変化している

かを検討した。ミトコンドリア機能の指標となるミトコンドリア膜電位の測定をフローサイトメトリーを用いたところ、ポリオアラニン鎖を発現している細胞において、ミトコンドリアの膜電位が低下していることが示された。この結果は、ポリアラニン鎖の発現がミトコンドリア膜電位の低下を引き起こしていることを示していた。

近年、ミトコンドリアはエネルギー産生のものであるというだけでなく、プログラムされた細胞死であるアポトーシス過程においても、重要な役割を担っていることが明らかにされてきている。このミトコンドリアを介したアポトーシス誘導過程において、膜電位の低下は初期の現象として知られている。この膜電位低下を受けて、次にミトコンドリアの膜間腔から細胞質へシトクロム c の放出が起きる。シトクロム c はアポトソームを形成し、次いでアポトーシスの実行因子としてのカスパーゼ 3 を活性化することで、細胞死を誘導することが知られている。そこで、本論文提出者は、次に、ポリアラニン鎖の発現がこのミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導しているのかを明らかにするため、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出を検討した。その結果、ポリアラニン鎖を発現している細胞からはその長さ依存的に、細胞質へのシトクロム c の放出が確認された。

次いで、このミトコンドリアからのシトクロム c の放出は、他の因子を介さず、ポリアラニン鎖の相互作用により直接引き起こされたものかを検討するため、マウスミトコンドリアを用いた *in vitro* の系でのシトクロム c の放出実験を行った。マウスの肝臓より単離したミトコンドリアに、大腸菌より精製した GST 融合ポリアラニン鎖を添加したところ、反応液中へのシトクロム c の放出が確認された。さらに、同様の実験を、添加するポリアラニン鎖の濃度を変えて行ったところ、1.5 μ M 以上の添加でミトコンドリアからのシトクロム c の放出が確認された。また、ポリアラニン鎖を 4.0 μ M 以上添加したミトコンドリアでは、その溶液中において、通常ミトコンドリア内膜に存在するはずの COX4 タンパク質が検出された。この結果は、高濃度のポリアラニン鎖の添加によってミトコンドリア膜構造の破綻が起こったことを示している。

また、シトクロム c の放出を受け、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ 3 が活性化されているかを、カスパーゼ 3 の特異的な蛍光基質である Ac-DEVD-MCA を用いて調べた。その結果、ポリアラニン鎖の発現により、その長さ依存的にカスパーゼ 3 が活性化されているのが明らかになった。この結果は、ポリアラニン鎖の発現が最終的にアポトーシスを誘導していることを示唆するものである。

さらに、本論文提出者は、スクリーニングの結果同定された SDHA というミトコンドリアタンパク質に着目し、ポリアラニン鎖発現による影響を検討した。SDHA は、ミトコンドリア内膜に存在するコハク酸脱水素酵素 SDH のサブユニットのひとつである。ポリアラニン鎖の発現により、ミトコンドリアにおける SDHA 量を定量化したところ、長さ依存的に減少しているのが示され、SDH 活性も低下しているのが明らかになった。この結果より、ポリアラニン鎖の発現によってミトコンドリア機能の低下が引き起こされたことを示しており、ATP 産生能を低下させている可能性が考えられる。

以上をまとめると、本研究において、ポリアラニン鎖がミトコンドリアと直接相互作用することにより、膜間腔からのシトクロム c の放出を促し、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導していることが明らかになった。また、ポリアラニン鎖によるミトコンドリア自体の機能の低下も示された。本研究で明らかにされたポリアラニン鎖による細胞毒性誘導機構は新たな知見であるだけでなく、ポリアラニン病において有効な治療法がない現状を考えると、この一連の機構の解明は直接治療法の開発に結びつくような有意義な結果である。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するに相応しいものと認定した。