

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

応用動物科学専攻

平成18年度博士課程 入学

氏 名 程 圓

指導教員名 眞鍋 昇

論文題目 Regulation Mechanism of Anti-apoptotic Factors in Porcine  
Follicular Granulosa Cells

(ブタ卵胞顆粒層細胞における細胞死阻害因子の調節機構)

哺乳類の卵胞は、発育の途中で99%以上が閉鎖し、最終的に排卵されるものは1%にも満たない。この選択的閉鎖の誘起に顆粒層細胞のアポトーシスが支配的に関与しているが、その細胞内シグナル伝達経路には未解明な点が多い。アポトーシスの誘導経路には、少なくとも細胞死受容体に依存する cell death receptor-dependent 経路と依存しない mitochondrion-dependent 経路の2種類が存在することが知られている。前者では、細胞死リガンドと受容体が結合すると受容体の細胞膜内にある death domain (DD) にアダプタータンパク (Fas-associated death domain: FADD) がこれの DD を介して結合する。この FADD には、2分子のイニシエーターカスパーゼ (procaspase-8) が、両者が分子内にもつ death effector domain (DED) を介して結合する。このようにして2量体化した procaspase-8 は活性化され、下流のエフェクターカスパーゼ (procaspase-3 など) を順次活性化し、最期にエンドヌクレアーゼが活性化されてアポトーシスが実行される。最近になって、活性化された caspase-8 が直接エフェクターカスパーゼを活性化する (I型アポトーシス) のではなく、一度ミトコンドリアを介してから活性化 (II型アポトーシス) する経路が存在することが分かった。すなわち、活性化された caspase-8 が Bid タンパクを切断し、これがミトコンドリアからの cytochrome C の放出を誘起す

る。放出された cytochrome C が protease-activating factor-1 と procaspase-9 と複合体を形成し、ここで procaspase-9 が活性化される。これが、下流の procaspase-3 を活性化してアポトーシスを実行させる。ブタ卵胞の顆粒層細胞においても II 型アポトーシス経路を介してアポトーシスが誘導されることが分かってきている。

最近になって、卵胞顆粒層細胞は II 型アポトーシス細胞であり、アポトーシスシグナル伝達が阻害因子 (cellular FLICE-like inhibitory protein: cFLIP) によって調節されていることが分かってきた。cFLIP には、2 つの DED だけをもつ short form (cFLIP<sub>s</sub>) と、これらに加えて偽酵素ドメインをもつ long form (cFLIP<sub>l</sub>) の 2 種類の isoform がある。両者とも DED を介した FADD と procaspase-8 の結合を競合的に阻害することでアポトーシスシグナル伝達を阻害する。このようにして cFLIP は顆粒層細胞の死滅を制御しているが、この cFLIP の発現を調節している分子機構が未解明であるので、本研究を行った。加えて、これ以外にアポトーシスシグナルを阻害している因子の存在が推測される現象に遭遇したので、これの探索研究も行った。

第一章では、顆粒層細胞において cFLIP の発現を調節している機構を調べた。初めに、ヒト顆粒層細胞腫由来株化細胞 (KGN 細胞) を様々な成長因子、ホルモン、サイトカインなどを添加した培養液中で培養後、cFLIP タンパクの発現を Western blotting 法にて調べた結果、tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  が用量および処理時間依存的に cFLIP の発現を亢進することが分かった。そこで、予め TNF  $\alpha$  を培地に添加して cFLIP 発現を高めた細胞に、抗 Fas 抗体を用いて細胞死リガンド/受容体依存的にアポトーシスを誘導したところ、TNF  $\alpha$  処理によって細胞の生存率が高まった。次に、RNA interference (RNAi) 法にて KGN 細胞の TNF  $\alpha$  receptor 1 (TNFR1) あるいは TNFR2 の発現を阻害した場合、TNFR1 の発現を阻害しても細胞は生存し続けたが、TNFR2 の発現を阻害したら全てが死滅した。この TNFR1 の発現を阻害した KGN 細胞において、TNF  $\alpha$  による cFLIP の発現誘導は亢進された。さらに TNFR2 の下流のシグナル伝達について調べたところ、TNF  $\alpha$  が TNFR2 と結合して転写因子 (nuclear factor- $\kappa$ B) を活性化し、これが cFLIP の転写を亢進すると考えられる結果を得た。

第二章では、ブタ顆粒層細胞を用いて TNF  $\alpha$  が cFLIP の発現におよぼす作用を詳しく調べた。初めに RACE 法にてブタ TNFR2 のクローニングを行った (GenBank accession number: EF120982)。次いで、ブタの卵胞閉鎖に伴う TNF  $\alpha$ 、TNFR1 および TNFR2 の発現の推移を調べた。即ち、食肉処理場にて成熟ブタから卵巣を採取し、卵胞を個別に切り出し、各々から卵胞液と顆粒層細胞を調製した。個々の卵胞は、形態と卵胞液中エストラジオール/プロゲステロン濃度比に基づいて健常、閉鎖初期および後期に分類した。卵胞液中の TNF  $\alpha$  タンパク濃度を ELISA 法にて、顆粒層細胞における TNFR1

および TNFR2 タンパクを Western blotting 法にて定量した結果、閉鎖に伴って TNF $\alpha$  および TNFR2 タンパクが減少し、逆に TNFR1 タンパクは増加していた。免疫組織化学染色法によって、これらが主に卵胞腔側の顆粒層細胞に局在することが分かった。さらに、ブタの不死化顆粒層細胞 (JC-410 細胞) に TNF $\alpha$  を添加した培地中で培養すると用量および処理時間依存的に cFLIP 発現が亢進した。これらから、ブタの顆粒層細胞においても TNF $\alpha$  は TNFR2 を介して cFLIP の発現を促進し、その結果アポトーシスが抑制されると考えられた。

TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE) は、膜に結合している TNF $\alpha$  と受容体を切断してシグナル伝達を阻害する。第三章では、顆粒層細胞において TACE が働いて TNF $\alpha$ /受容体系を修飾しているか否か調べた。初めに、RACE 法にてブタ TACE のクローニングを行った (GenBank accession number: EU113218)。次いでブタ卵胞の閉鎖に伴う TACE mRNA とタンパクの推移を各々 RT-PCR 法と Western blotting 法にて調べたところ、両方とも閉鎖初期卵胞の顆粒層細胞において最も高く発現していた。組織化学的染色の結果から TACE は顆粒層細胞の卵胞腔側に局在し、アポトーシス細胞の局在と一致した。さらに RNAi 法にて TACE の発現を阻害した KGN 細胞では、TNF $\alpha$  と共培養すると cFLIP が顕著に増加することが分かった。これは TACE による TNFR2 の切断が阻害されたためであると考えられた。これらから、顆粒層細胞において、TACE は TNF $\alpha$ /受容体系を修飾し、アポトーシス亢進因子として働いていると考えられた。

第四章では、II 型アポトーシスシグナル伝達系の下流で、procaspase-9 の活性化を阻止してアポトーシスを阻害する X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) がブタの顆粒層細胞においても重要な役割を果たしているか否か調べた。初めに、RACE 法にてブタ XIAP のクローニングを行った (GenBank accession number: EF120983)。ブタ XIAP はヒトやマウスと相同性が非常に高く、抗アポトーシス因子として重要であることが推測された。次いで、第二章と同様にして、卵胞閉鎖にともなう顆粒層細胞における XIAP の mRNA とタンパクの発現と局在の推移を調べた。XIAP は、顆粒層細胞に特異的に発現しており、閉鎖にともなって減少した。これらから、XIAP は顆粒層細胞のアポトーシスを阻害して生存を維持させ、その結果卵胞閉鎖を阻止していると考えられた。

これらの知見から、ブタの健常卵胞では、II 型アポトーシス細胞である顆粒層細胞において、顆粒層細胞が産生する TNF $\alpha$  が自身の TNFR2 に結合し、転写因子の活性化を介して cFLIP の産生を亢進することでミトコンドリアより上流のアポトーシスシグナル伝達を阻害していること、TACE が TNFR2 を切断してこのシグナル伝達を阻害してアポトーシスを誘導すること、および cFLIP とは別に XIAP が下流のシグナル伝

達を阻害していることが分かった。顆粒層細胞でこれらの阻害因子が減少することでアポトーシスが誘導され、その結果卵胞が閉鎖すると考えられた。これら細胞死阻害因子は、様々な生殖工学などに供する卵胞-卵母細胞の健全性を評価するためのパラメターとして有用であると推察された。