

村口尚志氏の提出した「低酸素刺激ストレスに対する心筋細胞の応答機構の解明」と題する本論文は、低酸素刺激ストレスを曝露した心筋細胞において、アポトーシスが生じることを細胞形態変化だけでなくアポトーシス誘導分子も解析することで詳細に明らかにした。さらに 15 分の短時間の低酸素ストレス曝露による心筋細胞内応答分子を二次元電気泳動により探索し、同定した分子がアポトーシス誘導分子の活性化に関与することを明らかにし、加えて、その意義を述べたものである。

本論文の前半は、ラット心筋由来 H9c2 細胞を用いた心筋梗塞モデルで、細胞を 0.1% 未満の酸素分圧下に曝露した時の細胞死のメカニズムを解析している。低酸素曝露による H9c2 細胞の細胞死誘導メカニズムに関してこれまでミトコンドリアを介したアポトーシス経路が誘導されることが報告されている。しかし、アポトーシス研究が進むにつれ、TUNEL 法だけでアポトーシス時に見られる DNA 断片化を基にアポトーシスの検出をすることは不十分であることが明らかとなっている。そこでアポトーシスの特徴である DNA 断片化だけでなく、実行因子の cytochrome *c* のミトコンドリアからの遊離、caspase-3 の切断、ミトコンドリアでの Bcl-2 減少、Bax の集積を時間経過とともに確認している。さらに、アポトーシス誘導分子の活性化前に活性酸素産生の増加、ミトコンドリア膜電位の低下が認められた。

本論文の後半は、15 分間の短時間の低酸素ストレス曝露初期での細胞内応答分子の探索と同定した分子の機能解析を行った。低酸素ストレス曝露により心筋細胞がアポトーシスを引き起こすことは知られているが、低酸素ストレス曝露初期での細胞内応答に関する一致した見解は得られておらず、その応答機構がどのようにアポトーシス誘導と関連するかについての情報が非常に少ない。そこで、低酸素ストレス曝露初期での細胞内応答の分子レベルの変化を理解するために、二次元電気泳動法により低酸素ストレス応答因子を探索した結果、低酸素ストレス曝露初期に発現が減少する分子 **prohibitin** を同定した。この **prohibitin** は酵母からヒトに至るまで高度に保存されたミトコンドリアに局在するタンパク質で、ミトコンドリアにおいてシャペロン様の機能を有することや、ミトコンドリア DNA の安定化、アポトーシスに関連する機能が知られている。

prohibitin の心筋細胞での動態を理解するため、低酸素ストレス曝露時における **prohibitin** の時間経過における発現量を検討した。その結果、低酸素に曝露された心筋細胞において **prohibitin** のタンパク質は 15 分で急激に減少し、その後持続的な減少を示した。しかし、**prohibitin** の mRNA の発現量に変化は認められなかった。このことから、**prohibitin** の低酸素刺激曝露によるタンパク質の減少は遺伝子転写レベルによる影響ではないと示唆された。

prohibitin は低酸素ストレス曝露の心筋細胞において減少することから、過剰発現実験を行った。過剰発現実験において、低酸素ストレスによる細胞死誘導が抑制されることが観察された。prohibitin は、様々な細胞外ストレスによって誘導される細胞死を抑制することが報告されているが、本研究で、心筋細胞に対する低酸素ストレスによる細胞死誘導を抑制することを初めて明らかにした。次に、prohibitin はミトコンドリアに局在することからミトコンドリアの膜電位に対する影響を検討した。その結果、prohibitin 過剰発現において低酸素ストレスによるミトコンドリア膜電位の低下を抑制することが明らかとなった。prohibitin 過剰発現により低酸素ストレスによるミトコンドリアの機能不全、細胞死をそれぞれ抑制したことから、ミトコンドリアを介したアポトーシス経路を抑制している可能性が考えられた。そこで prohibitin 過剰発現による cytochrome *c* のミトコンドリアからの遊離、Bcl-2、Bax のミトコンドリアでのタンパク質の発現量を検討した。その結果、prohibitin 過剰発現において低酸素ストレスによるミトコンドリアからの cytochrome *c* の遊離を顕著に抑制し、ミトコンドリアにおける Bcl-2 の減少も抑制していることが明らかになった。Bax のミトコンドリアへの集積は prohibitin 過剰発現において抑制効果は認められなかった。しかし、Bax と Bcl-2 のミトコンドリアでのタンパク質の発現量を Bax/Bcl-2 ratio として示すと、prohibitin 過剰発現は低酸素ストレス曝露による Bax/Bcl-2 ratio の増加を顕著に抑制していた。prohibitin 過剰発現により低酸素ストレスによるアポトーシス誘導を抑制することが示唆された。

本研究で、心筋細胞において 15 分間の短時間の低酸素ストレス曝露初期での細胞内応答分子として prohibitin を同定した。prohibitin は心筋細胞においてミトコンドリアに局在しており、低酸素ストレス曝露によるミトコンドリアの膜電位の低下を抑制することが明らかとなった。また、cytochrome *c* の遊離と Bcl-2 のミトコンドリアでのタンパク質発現量の変化を抑制することが明らかとなった。これらのことから、prohibitin はミトコンドリアでの Bcl-2 の安定化に寄与し、ミトコンドリアの機能を制御し、アポトーシスの誘導を抑制している可能性が示唆された。この知見は、低酸素ストレスに曝露された心筋細胞内ストレス応答分子 prohibitin の減少が、アポトーシスを制御する重要な分子であると示唆され、心筋梗塞におけるアポトーシスシグナル伝達経路の解明を行なった点で重要である。

以上のように村口尚志氏の論文は、低酸素ストレスに対する心筋細胞内でのストレス応答分子 prohibitin を同定し、prohibitin のアポトーシス誘導に関する細胞内分子機能を明らかにしたものであり、新しい知見を提供した。したがって、本審査委員会は全員一致して、博士（学術）の学位を授与されるにふさわしいと認定した。