



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト神経芽細胞種におけるセラミドのアポトーシス惹起機構とICH-1S結合蛋白質の単離
Author(s)	伊藤, 昭博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	甲第4547号
Issue Date	1998-09-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3145370
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51564
Type	doctoral thesis
File Information	000000330562.pdf



学位論文

ヒト神経芽細胞腫におけるセラミドのアポトーシス惹起
機構とICH-1S結合蛋白質の単離

1998年

伊藤昭博

①

学位論文

ヒト神経芽細胞腫におけるセラミドのアポトーシス惹起
機構とICH-1S結合蛋白質の単離

1998年

伊藤昭博

目次

略号表	5
序章	8
第1章 セラミドの細胞死に対する影響	10
1-1 実験方法	
1-1-1 SK-N-MC細胞の培養	10
1-1-2 Lactate dehydrogenase (LDH) の漏出	11
1-1-3 DNA断片化の検出	11
1-1-4 クロマチン染色	11
1-1-5 使用薬物	12
1-2 実験結果	
1-2-1 C2セラミド処理によるLDHの漏出	13
1-2-2 スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼ処理によるLDHの漏出	14
1-2-3 スフィンゴ脂質処理によるDNA断片化	14
1-2-4 C2セラミド、スフィンゴシン処理によるクロマチンの凝縮	16
1-3 考察	17
第2章 セラミドによるアポトーシス誘導におけるcaspaseの関与	19
2-1 実験方法	
2-1-1 DNA断片化の検出	21
2-1-2 caspase活性の測定	21
2-1-3 total RNAの抽出	21

2-1-4	RT-PCR反応	22
2-1-5	細胞質画分、粗膜画分の調製	24
2-1-6	ウエスタンブロッティング法	24
2-1-7	使用薬物	26
2-2	実験結果	
2-2-1	C2セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼ処理によるDNAの断片化に対するZ-Asp-CH ₂ -DCBの効果	27
2-2-2	H ₂ O ₂ 処理によるDNAの断片化に対するZ-Asp-CH ₂ -DCBの効果	29
2-2-3	C2セラミド、スフィンゴシン、H ₂ O ₂ 処理によるcaspaseの活性化	30
2-2-4	SK-N-MC細胞におけるcaspase mRNAの発現	33
2-2-5	C2セラミド処理によるpro-caspase-2および-3のプロセシングの検討	34
2-2-6	C2セラミド処理によるPARPの切断	35
2-3	考察	37
第3章	セラミドによるアポトーシス誘導におけるcytochrome cの関与	40
3-1	実験方法	
3-1-1	細胞質画分の調製	40
3-1-2	抗cytochrome c抗体によるウエスタンブロッティング法	41
3-1-3	S-100画分の調製	41
3-1-4	S-100 (-cyt c) 画分の調製	41
3-1-5	プラスミドのE. coliへのトランスフォーメーション	41
3-1-6	Small scale preparationによるプラスミドDNAの精製	42
3-1-7	Large scale preparationによるプラスミドDNAの精製	42
3-1-8	プラスミドの構築	43
3-1-9	塩基配列の確認	43
3-1-10	in vitro translationによる ³⁵ S-methionineラベルcaspase-2およびcaspase-3タンパク質の調製	44

3-1-11	S-100画分による ³⁵ S-methionineラベルcaspase-2およびcaspase-3の切断	44
3-1-12	使用薬物	44
3-2 実験結果		
3-2-1	C2セラミド処理によるcytochrome cの細胞質への漏出	45
3-2-2	cytochrome cによるcaspase-2およびcaspase-3の活性化	46
3-3 考察		
第4章 ICH-1S結合タンパク質の単離		50
4-1 実験方法		
4-1-1	bait用プラスミドの構築	52
4-1-2	ヒト胎児脳cDNA libraryの増幅	52
4-1-3	pAS2-1-Ich-1Sの酵母細胞株CG-1945への導入	53
4-1-4	ヒト胎児脳cDNA libraryのCG-1945 (bd/Ich-1S) への導入	53
4-1-5	β-ガラクトシターゼアッセイ (CG-1945)	54
4-1-6	His 3陽性、β-ガラクトシターゼ陽性酵母細胞から library由来cDNAの増幅	54
4-1-7	塩基配列の決定	54
4-1-8	pACT2-ISBPおよびpACT2-CnBの作製	54
4-1-9	β-ガラクトシターゼアッセイ (Y187)	55
4-1-10	ノーザンブロット法	55
4-1-11	COS-7細胞の蛍光標識法	55
4-1-12	GST融合タンパク質の精製	56
4-1-13	in vitro translationによる ³⁵ S-methionineラベルcaspase-2 およびISBPの精製	57
4-1-14	³⁵ S-ISBPとGST-ICH-1Sのin vitro結合実験	57
4-1-15	QIAfilter Plasmid Midi Kitを用いたプラスミドの精製	58
4-1-16	欠失変異体の作製	58

4-1-17	Jurkat 100,000 g cell lysateの調製	58
4-1-18	in vitro cleavage	59
4-1-19	プライマーの設定	59
4-1-20	使用薬物	60
4-2 実験結果		
4-2-1	Two-hybrid systemによるスクリーニング	62
4-2-2	His、 β -Gal陽性クローンの解析	63
4-2-3	ISBP mRNAの組織分布	65
4-2-4	ISBPの細胞内局在	66
4-2-5	in vitroにおけるICH-1SとISBPの結合	66
4-2-6	ISBPとICH-1Sの結合部位	67
4-2-7	caspaseによるISBPの切断	69
4-2-8	ISBPによるcaspaseの活性化の抑制	70
4-3 考察		71
終章		74
参考文献		77

略号表

AIF	: apoptosis-inducing factor
Ala	: alanine
Apaf-1	: apoptotic protease activating factor-1
Arg	: arginine
BSA	: bovine serum albumin
Ca ²⁺	: calcium ion
CAD	: caspase-activated DNase
CAPK	: ceramide activated protein kinase
CAPP	: ceramide activated protein phosphatase
CARD	: caspase recruitment domain
caspase	: cysteine aspartase
C2-ceramide	: N-acetyl-sphingosine
cDNA	: complementary DNA
ced	: cell death abnormal
CHP	: calcineurin B homologous protein
CIAP	: calf intestine alkaline phosphatase
CIB	: calcium- and integrin-binding protein
CnB	: calcineurin B
CPP32	: cysteine protease p32
CsCl	: cesium chloride
Cys	: cysteine
cyt c	: cytochrome c
dATP	: deoxyadenosine 5'-triphosphate
DEPC	: diethylpyrocarbonate
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNase	: deoxyribonuclease
dNTP	: dATP、dCTP、dGTP、dTTPの総称
DTT	: dithiothreitol

ECL	: enhanced chemiluminescence
EDTA	: ethylenediamine N, N, N, N'-tetraacetic acid
EGTA	: ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ester)-N, N, N, N'-tetraacetic acid
EtOH	: ethanol
EtBr	: ethidium bromide
FADD	: Fas-associated protein with a novel death domain
FCS	: fetal calf serum
Gln	: glutamine
Gly	: glycine
GST	: glutathione S-transferase
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His	: histidine
ICAD	: inhibitor of CAD
ICE	: interleukin-1 β converting enzyme
Ich-1	: Ice and ced-3 homolog-1
IL-1 β	: interleukin-1 β
ISBP	: ICH-1S binding protein
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
LB	: Luria-Bertani's broth
LDH	: lactate dehydrogenase
Leu	: leucine
LiAc	: lithium acetate
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MEM	: Minimum Essential Medium
MOPS	: 3- (N-morpholino) propanesulfonic acid
mRNA	: messenger RNA
Nedd	: neuronal precursor cell-expressed, developmentally down-regulated [genes]
NGF	: nerve growth factor
PARP	: poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	: phosphate buffered saline

PCR	: polymerase chain reaction
PEG 6,000	: polyethylene glycol 6,000
RNase	: ribonuclease
RT	: reverse transcriptase
SAPK	: stress-activated protein kinase
SD	: synthetic minimal medium
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEK1	: SAPK/ERK kinase-1
SMase	: sphingomyelinase
sphingosine 1-p	: sphingosine 1-phosphate
SSC	: standard sodium citrate
ssDNA	: salmon sperm DNA
TNF- α	: tumor necrosis factor- α
TRADD	: TNFR1 associated death domain protein
Tris	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Trp	: tryptophan
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
Z-Asp-CH ₂ -DCB	: benzyloxycarbonyl-Asp-CH ₂ COC-2,6,-dichlorobenzene

序章

中性リン脂質であるスフィンゴミエリンは細胞膜の主要な構成成分の一つである。スフィンゴミエリンは従来、構造脂質として知られてきた。しかし、1993年に Hannunらが、TNF- α (tumor necrosis factor- α)による血球系細胞のアポトーシスにおいて、スフィンゴミエリンの分解により生じたセラミド (図1) が情報伝達分子である可能性を報告して以来¹⁾、セラミドが注目を浴びるようになった。その後、TNF- α だけでなく種々のストレス刺激によるアポトーシスにスフィンゴミエリナーゼの活性化とそれに伴うセラミド生成の亢進が起こっていることが見いだされ^{2,7)}、セラミドが様々なアポトーシスにおける脂質メッセンジャーとして働いている可能性が示唆された。興味深いことに、神経細胞においてセラミドは、血球系の細胞と同様に細胞死を誘導する^{8, 9)}一方、NGF (nerve growth factor) 除去、グルタミン酸やアミロイド β タンパク質によって引き起こされる細胞死に対して抑制効果を示すという相反する結果が報告され^{10, 11)}、神経系においてセラミドは、死のシグナル分子としての機能の他に、ストレス抵抗因子や生存因子としての機能をもつことが示唆された。このことから、細胞種によってセラミド産生以降の下流のシグナル伝達機構が異なっていることが推測されるが、その詳細な作用機構について不明な点が多い。

一方、線虫の細胞致死遺伝子として同定されたCed-3の哺乳類のホモログであるcaspaseは、様々なアポトーシスに深く関与している。caspaseファミリーの中のcaspase-2 (Ich-1) は、選択的スプライシングによりIch-1LとIch-1Sの二つの転写産物が産生されることが知られている。このうち、Ich-1Lは細胞死誘導活性を有するが、Ich-1Sは逆に抑制効果を有することから、これらは細胞死を調節する因子であると考えられている¹²⁾。Ich-1はとくに胎児期の脳に高く発現していることから、神経細胞のアポトーシスに深く関与していることが推定されている。しかしながら、現在のところ、その基質や活性化制御機構など、詳細はほとんど不明である。

そこで本研究では、まずヒト神経芽細胞腫SK-N-MC細胞を用いて、セラミドにより惹起されるアポトーシスの細胞内分子機構を検討した。さらに、yeast two-hybrid systemを用いて、ヒト胎児脳cDNAライブラリーより、Ich-1Sと相互作用する因子の単離に成功し、その機能について検討した。

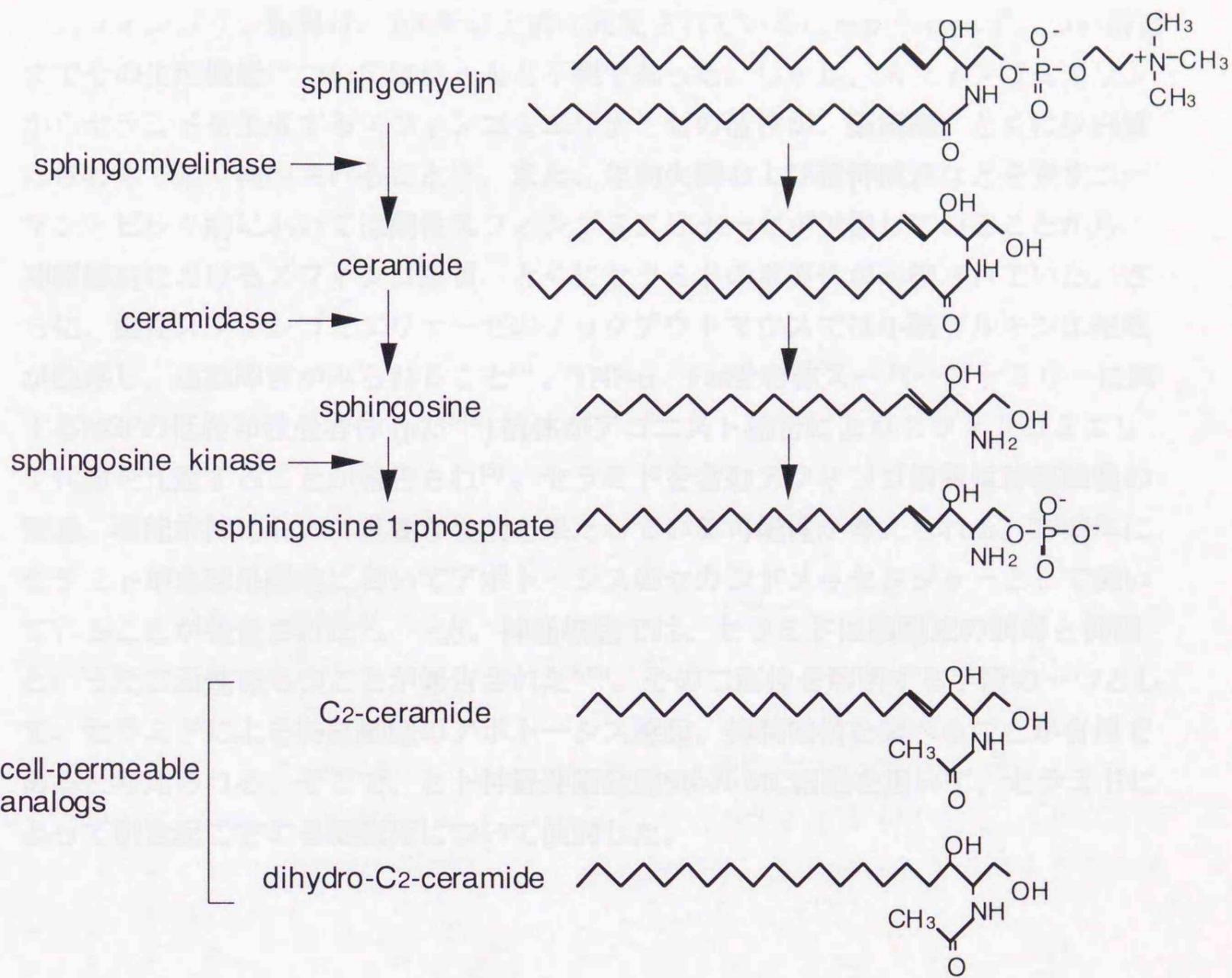


図1 スフィンゴ脂質の構造と代謝経路

第1章 セラミドの細胞死に対する影響

小緒

スフィンゴリン脂質は、100年以上前に発見されているにもかかわらず、つい最近までその生理機能についてはほとんど不明であった。しかし、スフィンゴミエリンからセラミドを生成するスフィンゴミエリナーゼの活性が、脳組織、とくに灰白質にきわめて強く検出されること¹³⁾、また、運動失調および精神減衰などを来すニーマン・ピック病においては酸性スフィンゴミエリナーゼが欠損していることから、神経細胞におけるスフィンゴ脂質、とくにセラミドの重要性が示唆されていた。さらに、酸性スフィンゴミエリナーゼのノックアウトマウスでは小脳プルキンエ細胞が脱落し、運動障害がみられること¹⁴⁾、TNF- α 、Fas受容体スーパーファミリーに属するNGFの低親和性受容体 (p75^{NTR}) 抗体がアゴニスト結合によりスフィンゴミエリン代謝を亢進することが報告され¹⁵⁾、セラミドを含むスフィンゴ脂質は神経細胞の発達、機能維持において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。1993年に、セラミドが血球系細胞においてアポトーシスのセカンドメッセンジャーとして働いていることが報告された¹⁾。一方、神経細胞では、セラミドは細胞死の誘導と抑制といった二面性をもつことが報告された⁸⁻¹¹⁾。その二面性を解明する手段の一つとして、セラミドによる神経細胞のアポトーシス惹起、抑制機構を調べるのが有用であると考えられる。そこで、ヒト神経芽細胞腫SK-N-MC細胞を用いて、セラミドによって引き起こされる細胞死について検討した。

1-1 実験方法

1-1-1 SK-N-MC細胞の培養

ヒト神経芽細胞腫 SK-N-MC細胞は10% fetal calf (FCS) (56℃、30分間非働化処理)を含むMinimum Essential Medium (MEM) において95% air-5% CO₂、37℃の条件下で培養した。

1-1-2 Lactate dehydrogenase (LDH) の漏出

Boehringer Mannheim 社のCytotoxicity Detection Kit (LDH) を用いて行った。12穴プレートに 1.5×10^5 個になるように細胞を培養し、37℃で48時間培養後、血清を含まないメディウムに交換し、各薬物を添加して24時間培養した。培養液を回収後、可溶化buffer (0.1% Triton X100-PBS) を各ウェルに加えて回収、遠心し、細胞質画分を得た。96穴プレートにPBSで1/3に希釈した培養液および細胞質画分を100 μ lと、Reaction Mixture 溶液 (Diaphorase/NAD⁺ mixture、iodotetrazolium chloride (INT)、sodium lactate) 100 μ lずつ加え、25℃で30分間、遮光しながらインキュベートした。HClを最終濃度0.2 Mになるように加え反応停止した後、マイクロプレートリーダー (CORONA MTP-120) を用い、490 nmの吸光度を測定した。

1-1-3 DNA断片化の検出

10 cmディッシュでコンフルエントになるまで培養した細胞をPBSで洗浄し、lystate buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.4)、5 mM EDTA、0.5% Triton X100) を5 ml/dish加え、4℃で20分間インキュベートした。lystateを回収後、27,000 \times g、15分間遠心し、その上清に最終濃度40 μ g/mlになるようにprotenase Kを加え、37℃で30分間インキュベートした。インキュベーション終了後、フェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルム抽出を各1回行い、エタノール沈殿を行った。ペレットを乾燥後、TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に溶解し、最終濃度40 μ g/mlになるようにRNaseを加え、37℃で1時間インキュベートした。260 nmの吸光度を測定することにより各サンプルのDNAを定量し、40~60 μ gを電気泳動に用いた。電気泳動はTAE (20 mM Tris-acetate (pH 8.0)、0.5 mM EDTA) を泳動用緩衝液として、1.8%アガロースゲルで100 Vの定電圧下で行った。泳動終了後、エチジウムブロマイドで染色し、UV下で検出した。

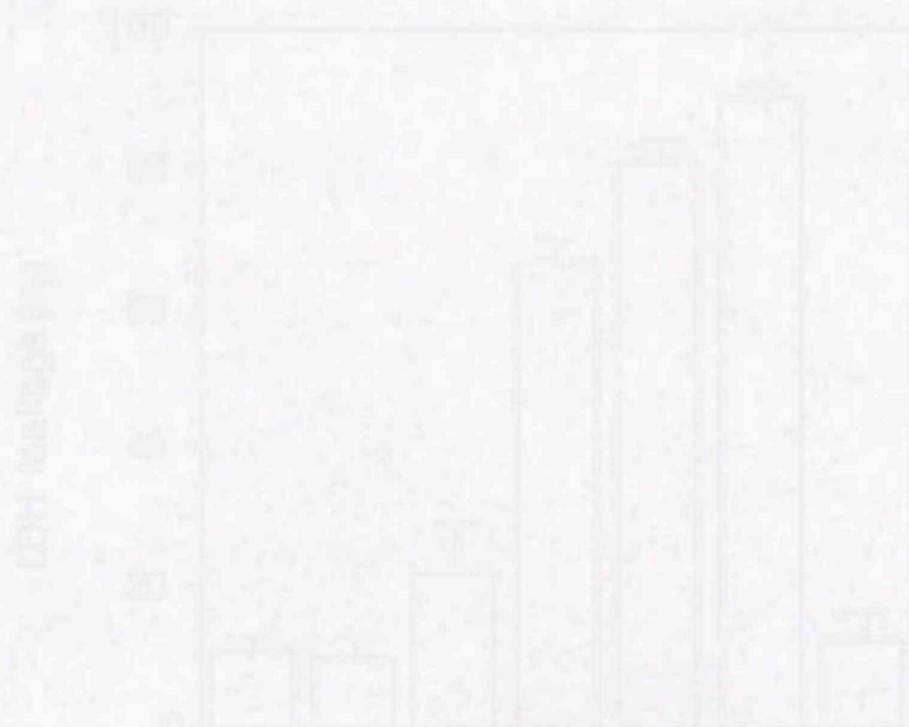
1-1-4 クロマチン染色

6 cmディッシュでコンフルエントになるまで培養した細胞に、各薬物を添加して6時間培養した。その後、PBSで洗浄し、PBSで細胞を回収後、2,000 \times g、3分間遠心した。ペレットを1 mlのPBSで懸濁し、最終濃度1%になるようにグルタルアルデヒドを加え、室温で20分間インキュベートした。インキュベーション終了後、細胞をPBSで4回洗浄した後、20 μ lのPBSで懸濁し、1 mM Hoechst 33258を5 μ l加え、蛍光顕微鏡下で観察した。

1-1-5 使用薬物

本章で用いた主な試薬の入手先はつぎの通りである。

MEM (GIBCO BRL)、FCS (Bio Whittaker)、C₂-ceramide (Sigma)、sphingosine (Sigma)、sphingomyelinase (Sigma)、Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Boehringer Mannheim)、Triton X100 (ナカライテスク (株))、proteinase K (Boehringer Mannheim)、agarose (ニッポンジーン)、Hoechst 33258 (和光純薬 (株))



1-2 実験結果

1-2-1 C2セラミド処理によるLDHの漏出

細胞が障害を受けると細胞内の内容物の漏出が観察される。活性の測定が容易なLDHの漏出を細胞死の指標として測定した。セラミドは直接培地に添加しても、低溶解性および細胞膜不透過性のため細胞内に効果的に取り込まれない。そこで、脂肪酸の短い細胞膜透過性のセラミドであるC2セラミドを用いて行った(図1)。また、血清存在下では、直接培地にC2セラミドを添加しても、細胞死を引き起こさない。これは、血清中に存在する成分がC2セラミドの細胞内の取り込みを阻害する、あるいは、C2セラミドが細胞内に取り込まれた後の細胞死惹起作用を抑制するためと考えられている。したがって、血清0%の条件で以下の実験を行った。SK-N-MC細胞を血清無添加でC2セラミドを24時間処理したところ、C2セラミドは濃度依存的にLDHの漏出を上昇させた(図2)。一方、C2セラミドの4位と5位の2重結合が無い不活性型のジヒドロC2セラミドでは20 μM の濃度でもLDHの漏出は上昇しなかった(図2)。このことから、C2セラミドはSK-N-MC細胞の細胞死を引き起こすことが示され、この細胞死は、C2セラミド特異的な作用であることが明らかとなった。

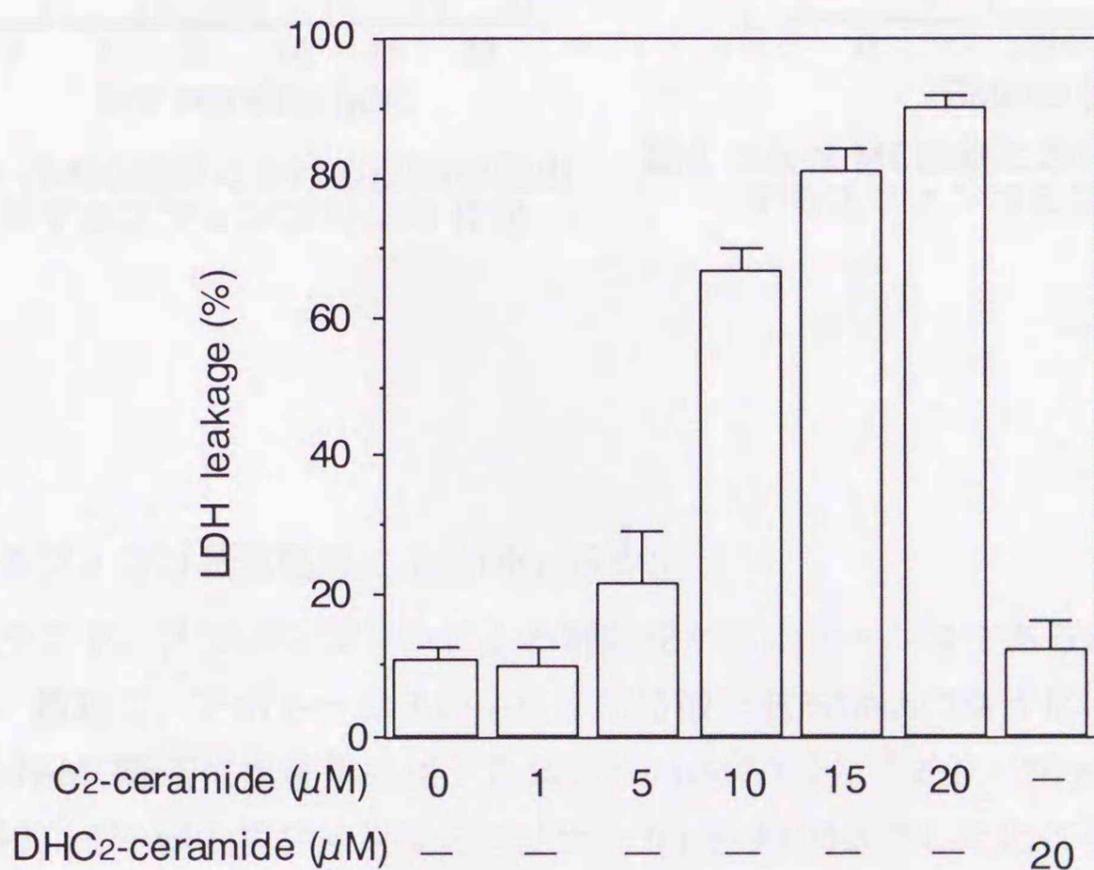


図2 SK-N-MC細胞におけるLDHの漏出に対するC2セラミドとジヒドロC2セラミドの作用

各薬物を24時間処理後のLDHのleakageを測定した。

1-2-2 スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼ処理によるLDHの漏出

SK-N-MC細胞を血清無添加でスフィンゴシンを24時間処理したところ、スフィンゴシンは濃度依存的にLDHの漏出を上昇させた(図3)。この結果より、SK-N-MC細胞においてセラミドの代謝産物であるスフィンゴシンも細胞死を引き起こすことが分かった。また、SK-N-MC細胞を細菌由来の中性スフィンゴミエリナーゼで24時間処理したところ、400 mU/mlの濃度でLDHの漏出が上昇した(図4)。このことから、SK-N-MC細胞においてスフィンゴミエリンから生成された内在性のセラミドが細胞死を引き起こすことが示唆された。

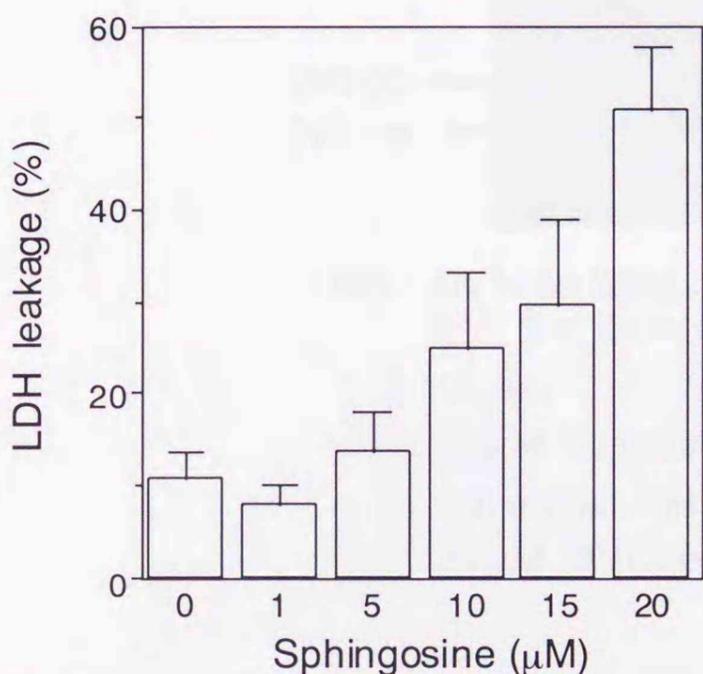


図3 SK-N-MC細胞におけるLDHの漏出に対するスフィンゴシンの作用

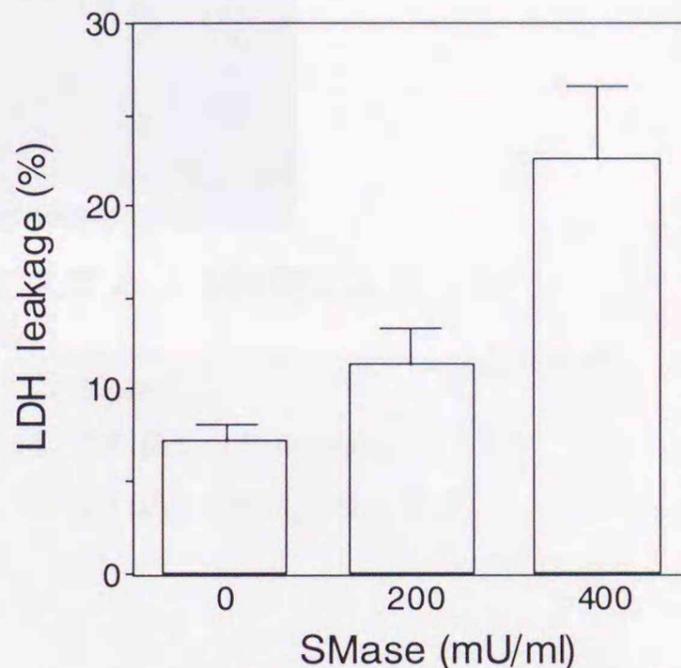


図4 SK-N-MC細胞におけるLDHの漏出に対するスフィンゴミエリナーゼの作用

1-2-3 スフィンゴ脂質処理によるDNA断片化

C2セラミド、スフィンゴシンによる細胞死がアポトーシスであるか否かを検討するため、最初に、アポトーシスの生化学的特徴であるDNAの断片化について検討した。SK-N-MC細胞に血清無添加で各薬物(20 μMのC2セラミド、20 μMのスフィンゴシン、400 mU/mlのスフィンゴミエリナーゼ)を6時間処理したところ、DNAの断片化が生じた(図5)。一方、20 μMのスフィンゴシン1-P、20 μMのジヒドロC2セラミドではDNAの断片化は起こらなかった(図5)。また、C2セラミドにより惹起されるDNA断片化の時間経過を検討したところ、20 μMのC2セラミド処理4時間後から、DNAの断片化が認められ、6時間後には明らかなDNAの断片化が認められた(図6)。

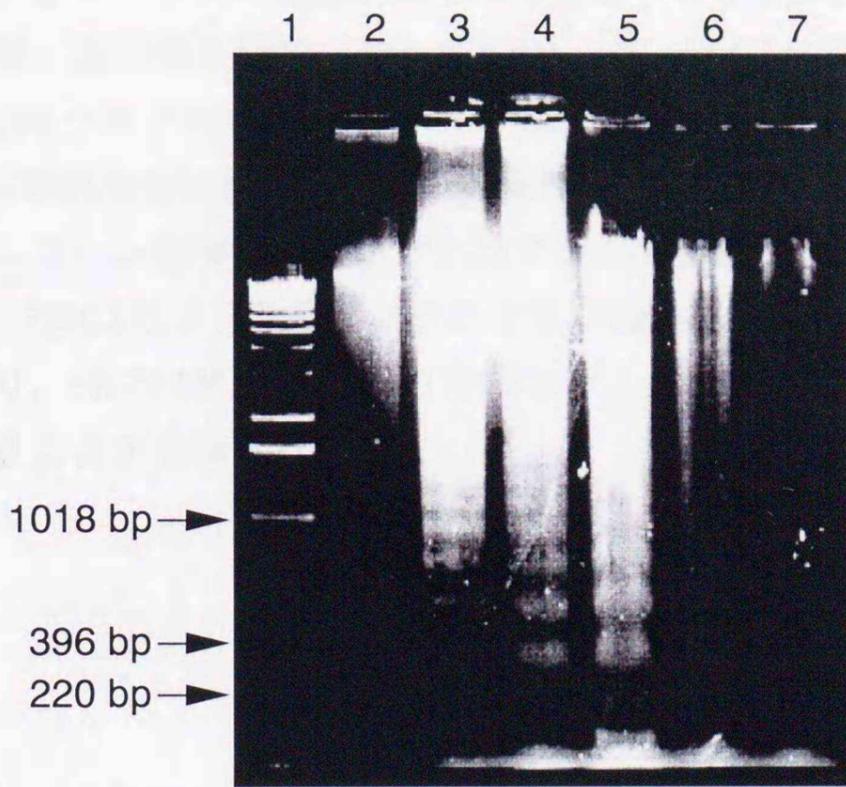


図5 SK-N-MC細胞においてスフィンゴ脂質により惹起されるDNA断片化

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 1. Marker | 2. None |
| 3. 20 μ M C2-ceramide | 4. 20 μ M sphingosine |
| 5. 400 mU/ml SMase | 6. 20 μ M sphingosine 1-P |
| 7. 20 μ M DHC2-ceramide | |

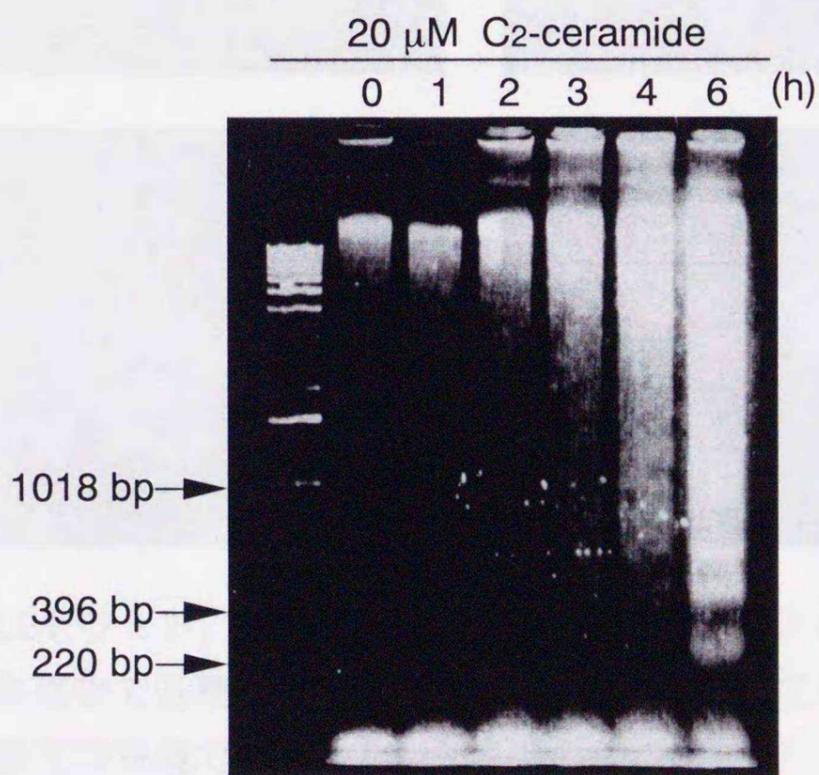


図6 SK-N-MC細胞においてC2セラミドにより引き起こされるDNA断片化

1-2-4 C2セラミド、スフィンゴシン処理によるクロマチンの凝縮

つぎに、アポトーシスの形態学的特徴であるクロマチンの凝縮について検討した。SK-N-MC細胞に血清無添加でvehicle (EtOH)、20 μ M C2セラミド、20 μ M スフィンゴシン、20 μ M ジヒドロC2セラミドを6時間処理後、DNA結合性蛍光色素であるHoechst33258染色を行い核の形態を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、C2セラミド、スフィンゴシン処理した細胞でクロマチンの凝縮が観察された(図7)。一方、EtOH、ジヒドロC2セラミド処理はクロマチンの凝縮は認められなかった(図7)。以上の結果より、SK-N-MC細胞においてC2セラミド、スフィンゴシンはアポトーシスを引き起こすことが示唆された。

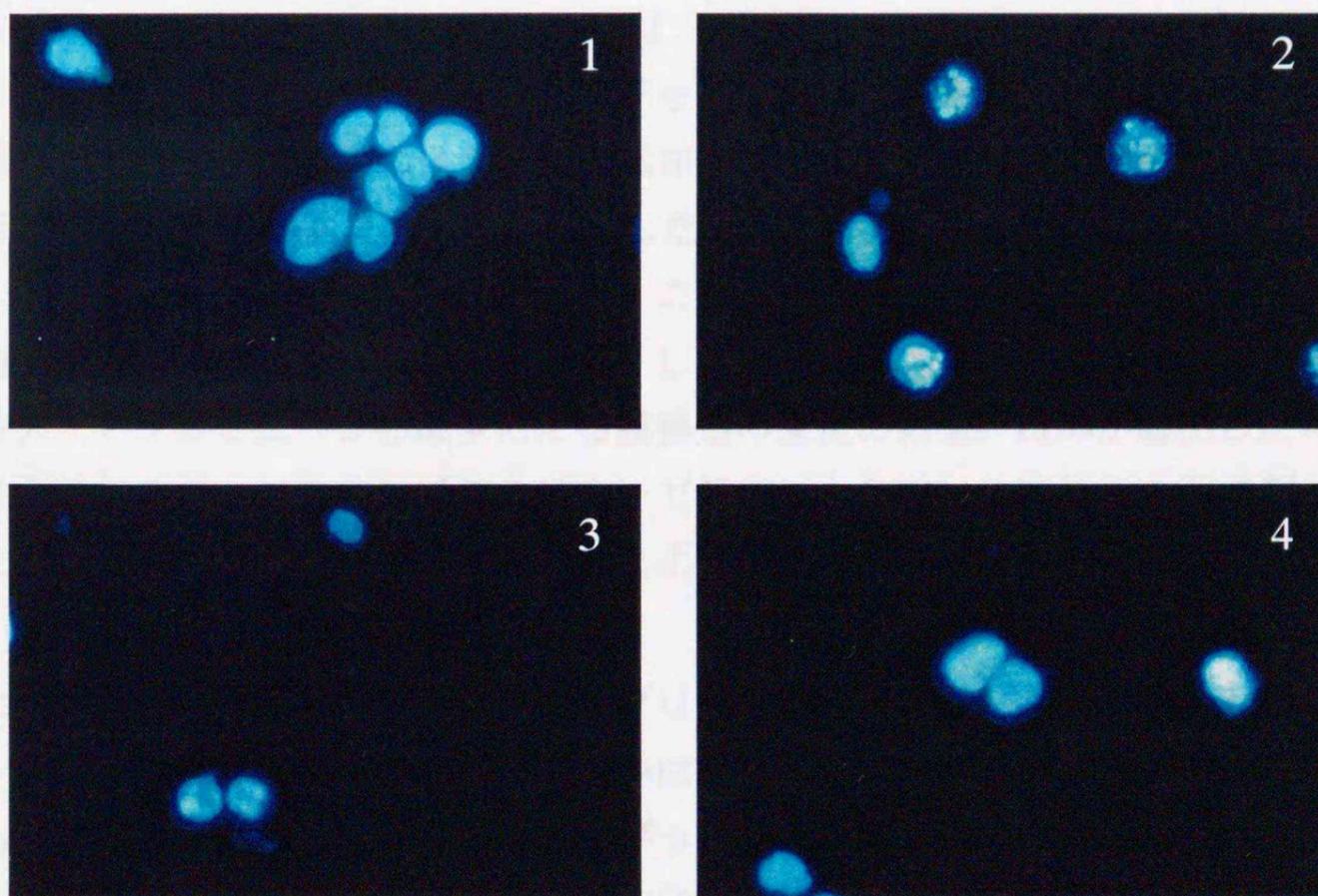


図7 C2セラミド、スフィンゴシン処理によるクロマチンの凝縮
各薬物で処理後、細胞の核をヘキスト33258で染色し、
蛍光顕微鏡で観察した。

1. EtOH vehicle、
2. 20 μ M C2-ceramide、
3. 20 μ M sphingosine、
4. 20 μ M DHC2-ceramide

1-3 考察

細胞が障害を受けると細胞内容物の漏出が引き起こされる。活性の測定が容易なLDHの漏出を細胞死の指標として、セラミドによってヒト神経芽細胞腫SK-N-MC細胞の細胞死が引き起こされるか否かを検討した。

セラミドは直接培地に添加しても細胞に対してほとんど効果を示さない。これは、セラミドが細胞外から受容体を介して作用するものではないこと、細胞膜透過性が低いことによると考えられている。そこで、細胞膜透過性の合成セラミドとして、N-アシル基を短くしたC2セラミドを用いてLDHの漏出に対する作用を検討したところ、C2セラミドは濃度依存的にLDHを漏出させた。また、セラミドからセラミダーゼによって生成されるスフィンゴシンで処理しても濃度依存的にLDHの漏出が引き起こされた。このことから、SK-N-MC細胞においてセラミドおよびセラミドの代謝産物であるスフィンゴシンは細胞死を引き起こすことが示唆された。また、スフィンゴミエリンからセラミドを生成する酵素であるスフィンゴミエリナーゼを直接培地に添加することにより、細胞死が引き起こされることがヒト白血病細胞U937、HL-60において報告されている⁹⁾。これは、細胞膜に存在するスフィンゴミエリンに作用しセラミドを生成するため、細胞死を引き起こすと考えられている。そこで、細菌由来のスフィンゴミエリナーゼの添加によってもLDHの漏出が引き起こされるか否かをSK-N-MC細胞においても検討したところ、スフィンゴミエリナーゼの添加によってLDHの漏出が引き起こされた。このことから、内在性のセラミドの増加が細胞死を引き起こすことが示唆された。しかしながら、スフィンゴミエリナーゼによるスフィンゴミエリンの減少による膜構造の変化の結果、LDHが漏出した可能性も考えられるが、スフィンゴミエリナーゼ処理によりDNAの断片化も引き起こされたことから、スフィンゴミエリナーゼによるLDHの漏出は細胞がアポトーシスを起こした結果、生じたと推測される。

セラミドは細胞内で糖が付加され、グリコシルセラミド、ラクトシルセラミド、ガングリオシドなどの糖脂質に、あるいは、セラミダーゼによりスフィンゴシンに代謝されることが知られている。したがって、細胞外から添加したC2セラミド、あるいは、スフィンゴミエリナーゼの添加によって生成された内在性のセラミドが、スフィンゴシンなどの代謝産物に変換されることなく作用しているかどうか疑問が残る。しかしながら、¹⁴CラベルしたC2セラミドを使用して、ヒト白血病細胞HL-60におけるその代謝を検討したところ、スフィンゴシンなどの脂質は代謝産物として認められなかったことが報告されている¹⁰⁾。このことから、SK-N-MC細胞においてもC2セラミドはスフィンゴシンなどの代謝産物に変換されることなく作用している可能性が示唆されるが、細胞によって異なっている可能性も考えられ、今後検討が

必要である。一方、細胞の外から添加されたスフィンゴシンは不安定で、セラミドや、スフィンゴシン1-Pなどの他の活性脂質に代謝されることが知られている。しかし、好中球、白血病細胞HL-60において、メディウムに添加したスフィンゴシンは細胞死を引き起こすが、同じ濃度の膜透過性のセラミドは引き起こさないという報告があり¹⁷⁻¹⁹⁾、ある種の細胞では、セラミドの代わりにスフィンゴシンがアポトーシスのセカンドメッセンジャーとして働いている可能性が考えられる。今回、SK-N-MC細胞において、C2セラミドとスフィンゴシンの両者とも、細胞死を引き起こしたことから、スフィンゴシン自体が細胞死を引き起こすことが出来るのか否かは今後の検討が必要であるが、セラミドがSK-N-MC細胞の細胞死におけるセカンドメッセンジャーになりうる可能性は高いと思われる。

つぎに、C2セラミド、スフィンゴシン添加によるSK-N-MC細胞死がアポトーシスによるものであるか、ネクローシスによるものであるか調べるため、アポトーシスの生化学的特徴であるDNAの断片化および、形態学的な特徴であるクロマチンの凝縮を検討した。その結果、C2セラミド、スフィンゴシン処理によりDNAの断片化および、クロマチンの凝縮が観察された。このことから、C2セラミド、スフィンゴシンによるSK-N-MC細胞死は、アポトーシスであることが示唆された。一方、スフィンゴシンの代謝産物であるスフィンゴシン1-Pを添加しても、DNAの断片化は起こらなかった。最近、血球系細胞において、スフィンゴシン1-Pが、TNF- α 、スフィンゴミエリナーゼ、膜透過性セラミドによるアポトーシスを抑制することが報告された²⁰⁾。セラミドとスフィンゴシン1-Pはスフィンゴ脂質の代謝物として相互に変換可能である。したがって、セラミドとスフィンゴシン1-Pの細胞内レベルの比が細胞の運命(生死)を左右する可能性が考えられる。このことは、神経細胞においてセラミドが細胞の違いや、添加濃度の違いによってアポトーシスを惹起したり阻害したりするという相反する二面性を考える上で非常に興味深く思われ、今後のさらなる研究が期待される。

第2章 セラミドによるアポトーシス誘導におけるcaspase の関与

小緒

線虫 (*C. elegans*) は、その発生過程で、131個の細胞が特定のステージでアポトーシスを起こし、失われる。広範な遺伝学的スクリーニングによって、線虫の細胞死実行遺伝子として *ced-3*、*ced-4* が同定された²¹⁾。*ced-3* の哺乳類のホモログが検索され、不活性型 31 kDa IL-1 β を活性型 17.5 kDa IL-1 β に変換する IL-1 β converting enzyme (ICE) と 29 % の相同性をもつことが分かった²²⁾。ICE はアスパラギン酸の C 末端側で基質を切断するシステインプロテアーゼで、その活性部位を含む配列 QACRG (Gln-Ala-Cys-Arg-Gly) の配列は、CED-3 でも完全に保存されている。線虫細胞死実行遺伝子 *ced-3* の哺乳類のホモログである Ice がアポトーシスを誘導することが予想されたが、実際にラット線維芽細胞 Rat-1 に Ice を一過性に発現させるとアポトーシスが惹起されることが報告され²³⁾、ICE が哺乳類における細胞死実行因子であることが示唆された。現在、ヒトで 10 種類の ICE family protease が見つかっており、これらは、ICE と同様に、アスパラギン酸の C 末端側で基質を切断することから、caspase (cysteine aspartase) と名付けられた²⁴⁾ (表1)。TNF- α 、Fas などの処理によって惹起されるアポトーシスの過程で caspase が活性化し、caspase の阻害薬はアポトーシスを抑制することが多数報告され²⁵⁻²⁹⁾、アポトーシス誘導の過程に caspase が関与していることが明らかとなった。また、神経細胞のアポトーシス惹起の過程においても caspase の関与が報告されている³⁰⁻³²⁾。そこで今回、セラミドにより引き起こされる SK-N-MC 細胞のアポトーシスにおける caspase の関与について検討した。

表1 ヒトcaspaseファミリーとその基質

enzyme	other name	substrates	tetrapeptide specificity
caspase-1	ICE	pro-IL-1 β , actin, pro-caspase-3	YVAD
caspase-2	ICH-1	pro-caspase-2	-
caspase-3	CPP32, Yama, apopain	PARP, DNA-PK, D4-GDI, SREBP, U1-70kDa, pro-caspase-2, -6, -9	DEVD
caspase-4	TX, ICERel-II, ICH-2	pro-caspase-1	YVAD
caspase-5	ICERel-III, TY	?	-
caspase-6	Mch2	PARP, lamin	-
caspase-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	PARP	DEVD
caspase-8	FLICE, MACH, Mch5	PARP, pro-caspase-2, -3, -4, -6, -7, -9, -10	-
caspase-9	ICE-LAP6, Mch6	PARP, pro-caspase-3	-
caspase-10	Mch4, FLICE2	PARP, pro-caspase-2, -3, -4, -6, -7, -8, -9	-

2-1 実験方法

2-1-1 DNA断片化の検出

DNA断片化の検出は1-1-3の方法に準じて行った。caspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBはアポトーシス誘導刺激の1時間前に前処理した。

2-1-2 caspase活性の測定

10 cmディッシュにコンフルエントになるまで培養した細胞をPBSで洗浄後、3 mlのPBSで回収し、2,000 × g、3分間遠心した。ペレットを600 μlのYAMA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA、10 mM EGTA) に懸濁し、1 mM digitoninを6 μl加え、37 °Cで20分間インキュベートした。インキュベーション終了後、4 °C、18,000 × g、20分間遠心し、上清を回収した。Bio-rad protein assay kitにより各サンプルのタンパク質量を定量し、そのうち40~60 μgにYAMA bufferを加え、最終容量が500 μlになるようにし、caspase活性測定のサンプルとした。37 °Cで10分間インキュベート後、7.5 μlの蛍光基質 (50 μM Ac-YVAD-MCA、50 μM Ac-DEVD-MCA)、1 mlのYAMA bufferを加え、この時の蛍光光度を測定した後、37 °Cで30~60分間インキュベートした。インキュベーション終了後、蛍光光度を測定した。スタンダードとして0.1 μM AMCを用いた。また、蛍光光度は励起380 nm、蛍光460 nmで、F2000型蛍光光度計 (日立) を用いて測定した。caspase活性の値はタンパク質1 mgあたり、1分間に生成されるAMCの量 (pmol/min/mg) で計算した。

2-1-3 total RNAの抽出

total RNAの抽出はAcid guanidium-phenol-chloroform (AGPC) 法に準じて行った。10 cmディッシュにコンフルエントになるまで培養した細胞をPBSで洗浄後、2 mlのguanidine thiocyanate (GTC) 溶液 (4 M GTC、25 mM sodium citrate、0.5 % sodium N-lauroyl sarcosinate、0.1 M 2-mercaptoethanol) を加え、細胞を溶解し、回収した。200 μlの2 M NaOAc (pH 4.0)、2 mlの水飽和phenol、380 μlのchloroform、20 μlのisoamyl alcoholを加え混和した後、4 °Cで15分間静置した。その後、4 °C、10,000 × g、20分間遠心し、上層 (水層) を回収し、1/10容量の3 M NaOAc (pH 4.0)、等量の2-propanolを加え、-80 °Cで15分間静置した。その後、4 °C、12,000 × g、20分間遠心して得られたペレットを300 μlのGTC溶液に溶解し、30 μlの2 M NaOAc (pH 4.0)、300 μlの水飽和phenol、57 μlのchloroform、3 μlのisoamyl alcoholを加え混和した後、4 °Cで15分間静置した。その後、4 °C、10,000 × g、20分間遠心し、上層 (水層) を

回収し、1/10容量の3 M NaOAc、等量の2-propanolを加え、-80 °Cで15分間静置した。その後、4 °C、18,000 × g、20分間遠心して得られたペレットを44 μlの0.1 % diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理滅菌水に溶解し、5 μlの10 × DNase buffer (1 M sodium acetate (pH 5.2)、50 mM MgCl₂)、1 μlのDNase (134 U/μl) を加え、25 °Cで30分間インキュベートした。インキュベーション終了後、phenol/chloroform抽出を行った後、2-propanol沈殿を行った。得られた沈殿を適当量のDEPC処理滅菌水に溶解し、total RNAとした。得られたtotal RNAは260 nmの吸光度を測定することにより定量した。

2-1-4 RT-PCR反応

(1) 逆転写酵素反応

2 μgのtotal RNAに1 μlのoligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (0.5 μg/μl) を加え、DEPC処理滅菌水で全量を10 μlとし、70 °Cで10分間熱変性後、氷中に静置した。その後、4 μlの5 × First strand buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3)、375 mM KCl、15 mM MgCl₂)、2 μlのdNTPs (各10 mM)、2 μlの100 mM dithiothreitol (DTT)、1 μlの25 U/μl RNase inhibitor、0.5 μlの200U/μl reverse transcriptase (RT) を加え、全量をDEPC処理滅菌水で20 μlとし、42 °Cで1時間インキュベートした。インキュベーション終了後、70 °Cで10分間インキュベートして、反応を終了させたものをcDNA試料とした。

(2) プライマーの設定

プライマーの合成は、ホクドー (株) に合成を委託し、以下の様に設定した。

capase-1 (sense)	5'-AACCCAGCTATGCCCACATCC-3'
capase-1 (antisense)	5'-TTAATGTCCTGGGAAGAGGTA-3'
capase-2 (sense)	5'-GTTACCTGCACACCGAGTCACG-3'
capase-2 (antisense)	5'-GCGTGGTTCTTTCCATCTTGTTGGTCA-3'
capase-3 (sense)	5'-GAATATCCCTGGACAACA-3'
capase-3 (antisense)	5'-ACGCCATGTCATCATCAA-3'
capase-4 (sense)	5'-GGTCATCATTGTCCAGGC-3'
capase-4 (antisense)	5'-CCATTGTGCTGTCTCTCC-3'
capase-5 (sense)	5'-ACCACATGCTAAAGAACA-3'
capase-5 (antisense)	5'-CGATTTGCAGAAGAGGTT-3'

capase-6 (sense)	5'-ACCCGCAGGTTTTTCAGA-3'
capase-6 (antisense)	5'-CATGAGCCGTTTCACAGT-3'
capase-7 (sense)	5'-AGCCTGGGTTTTGACGTG-3'
capase-7 (antisense)	5'-ACCGTGGAATAGGCGAAG-3'
capase-8 (sense)	5'-GGACTGCTTCATCTGCTG-3'
capase-8 (antisense)	5'-ATCTGTTTCCCCATGTTT-3'
capase-9 (sense)	5'-TAACAGGCAAGCAGGAAA-3'
capase-9 (antisense)	5'-TCTTGGCAGTCAGGTCGC-3'
capase-10 (sense)	5'-AGAAGTCCAGCTCAGCCT-3'
capase-10 (antisense)	5'-ACTCGGCTTCCTTGTCTA-3'
GAPDH (sense)	5'-AAACCCATCACCATCTTCCAG-3'
GAPDH (antisense)	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'

(3) PCR反応

cDNA試料2 μ lに、2 μ lの10 \times Expand HF buffer (15 mM MgCl₂を含む)、3.2 μ lのdNTPs (各3.2 mM)、0.2 μ lのsenseおよびantisenseプライマー (20 μ M)、0.2 μ lのhigh fidelity PCR system酵素ミックス (3.5 U/ μ l) を加え、滅菌精製水で全量を20 μ lにし、ミネラルオイルを重層した。Astec Program Temp Control System PC-800を用いて、この反応液を94 $^{\circ}$ Cで2分間熱変性を行い、それ以降、94 $^{\circ}$ Cで1分間、各プライマーに対するアニーリング温度で1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間、各プライマーに対応するサイクル数でPCR反応を行った。各プライマーに対するアニーリング温度およびサイクル数を表2に示した。

表2 各caspase primerに対するアニーリング温度およびサイクル数

primer	アニーリング温度	サイクル数	PCR product size (bp)
caspase-1	58 °C	40	858
caspase-2	58 °C	28	234
caspase-3	54 °C	34	462
caspase-4	58 °C	28	203
caspase-5	50 °C	40	354
caspase-6	58 °C	32	458
caspase-7	58 °C	28	371
caspase-8	52 °C	35	468
caspase-9	54 °C	39	359
caspase-10	54 °C	32	462
GAPDH	62 °C	17	361

2-1-5 細胞質画分、粗膜画分の調製

10 cmディッシュにコンフルエントになるまで培養した細胞をPBSで洗浄後、3 mlのPBSで回収し、2,000 × g、3分間遠心した。ペレットを200 μlのlysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、137 mM NaCl₂、2 mM EDTA、1 mM PMSF、10 μg/ml aprotinin、10 μg/ml leupeptin) で懸濁し、氷中で超音波粉碎を行った後、4 °C、18,000 × g、20分間遠心し、この上清を細胞質画分とした。またペレットを100 μlのlysis bufferで懸濁し、粗膜画分とした。各サンプルのタンパク質量はBio-rad protein assay kitにより定量した。

2-1-6 ウェスタンブロッティング法

調製したサンプルにLaemmi buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2 % SDS、10 % glycerol、2 % 2-mercaptoethanol、0.1 % bromophenol blue) を加え、5分間煮沸し可溶化した。泳動用緩衝液としてSDS-PAGE running buffer (25 mM Tris base、192 mM glycine、1 % SDS) を用いて、SDSを含むポリアクリルアミドゲルにサンプルを4~

20 µg/laneのせ、130 Vの定電圧で約120分間泳動し、タンパク質を分離した。次に、このゲルをtransfer buffer (25 mM Tris base、192 mM glycine、20 % methanol) 中で、100 Vの定電圧でニトロセルロース膜上にトランスファーした。このニトロセルロース膜を以下に示す抗体に対する条件で免疫反応させた後、ECL検出システムで化学発光させ、X線フィルムに露光して目的タンパク質を検出した。

(1) 抗ICH-1L抗体

細胞質画分を上記の方法により15 %のゲルを用い電気泳動し、トランスファー後、ニトロセルロース膜を抗ICH-1L抗体 (TBST (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.1 % Tween 20) で200倍希釈) で4 °Cで一晩軽く振とうした。TBSTで10分、3回洗浄後、2次抗体 (抗ヤギIgG-horseradish peroxidase標識抗体、TBSTで5000倍希釈) で30分間振とうした。TBSTで10分、4回洗浄後、ECL検出システムにより検出した。

(2) 抗CPP32抗体

細胞質画分タンパク質を上記の方法により15 %のゲルを用い電気泳動し、トランスファー後、ニトロセルロース膜をblocking buffer (1 % BSAを含むTBST) で1時間インキュベートすることでブロッキングを行った後、抗CPP32抗体 (blocking bufferで1000倍希釈) 4 °Cで一晩軽く振とうした。TBSTで10分、3回洗浄後、2次抗体 (抗マウスIgG-horseradish peroxidase標識抗体、TBSTで2000倍希釈) で30分間インキュベートした。TBSTで10分、4回洗浄後、ECL検出システムにより検出した。

(3) 抗tubulin α抗体

細胞質画分タンパク質を上記の方法により11 %のゲルを用い電気泳動し、トランスファー後、ニトロセルロース膜をblocking buffer (1 % BSAを含むTBST) で1時間インキュベートすることでブロッキングを行った後、抗tubulin α抗体 (blocking bufferで1000倍希釈) 4 °Cで一晩軽く振とうした。TBSTで10分、3回洗浄後、2次抗体 (抗マウスIgG-horseradish peroxidase標識抗体、TBSTで2000倍希釈) で30分間振とうした。TBSTで10分、4回洗浄後、ECL検出システムにより検出した。

(4) 抗PARP抗体

粗膜画分タンパク質を上記の方法により8 %のゲルを用い電気泳動し、トランスファー後、ニトロセルロース膜をblocking buffer (4 % スキムミルクを含むTBST) で1時間インキュベートすることでブロッキングを行った後、抗PARP抗体 (blocking bufferで5000倍希釈) 4 °Cで一晩軽く振とうした。blocking bufferで10分、3回洗浄後、

2次抗体 (抗マウスIgG-horseradish peroxidase標識抗体、blocking bufferで1000倍希釈) で30分間振とうした。blocking bufferで10分、4回洗浄後、ECL検出システムにより検出した。

2-1-7 使用薬物

本章で用いた主な試薬の入手先はつぎの通りである。

Z-Asp-CH₂-DCB (ペプチド研)、digitonin (和光純薬 (株))、protein assay kit (Bio-rad)、Ac-YVAD-MCA (ペプチド研)、Ac-DEVD-MCA (ペプチド研)、AMC (ペプチド研)、DNase (ニッポンジーン)、oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (GIBCO BRL)、DTT (Sigma)、RNase inhibitor (和光純薬 (株))、superscript RT (GIBCO BRL)、high fidelity PCR system (Boehringer Mannheim)、PMSF (Sigma)、aprotinin (ヘキスト)、leupeptin (Sigma)、SDS (和光純薬 (株))、bromophenol blue (和光純薬 (株))、Tween 20 (和光純薬 (株))、skim milk (雪印乳業)、BSA (Sigma)、nitrocellulose membrane (Bio-Rad)、anti-Ich-1L antibody (Santa Cruze)、anti-CPP32 antibody (Transduction Laboratories)、anti- α tubulin antibody (生化学工業 (株))、anti-PARP antibody (Clontech)、anti-goat IgG (Santa Cruze)、anti-mouse IgG (Amersham)、ECL Western blotting detection reagents (Amersham)

2-2 実験結果

2-2-1 C2セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼ処理によるDNAの断片化に対するZ-Asp-CH₂-DCBの効果

C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導に、caspaseが関与しているか否かを調べるため、caspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBを用いて検討した。各濃度のZ-Asp-CH₂-DCBを20 μM C2セラミド処理の1時間前に前処理し、6時間後、DNAの断片化を調べた。その結果、Z-Asp-CH₂-DCBは濃度依存的にDNAの断片化を抑制し、50~100 μMの濃度でDNAの断片化は完全に抑制された(図8)。このことから、C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、caspaseが関与していることが示唆された。また、スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、caspaseが関与しているか否かをZ-Asp-CH₂-DCBを用いて同様に検討したところ、Z-Asp-CH₂-DCBは濃度依存的に20 μMのスフィンゴシン、400 mU/mlのスフィンゴミエリナーゼによるDNAの断片化を抑制し、100 μMの濃度でDNAの断片化は完全に抑制された(図9、図10)。以上の結果から、スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導に、caspaseが関与していることが示唆された。

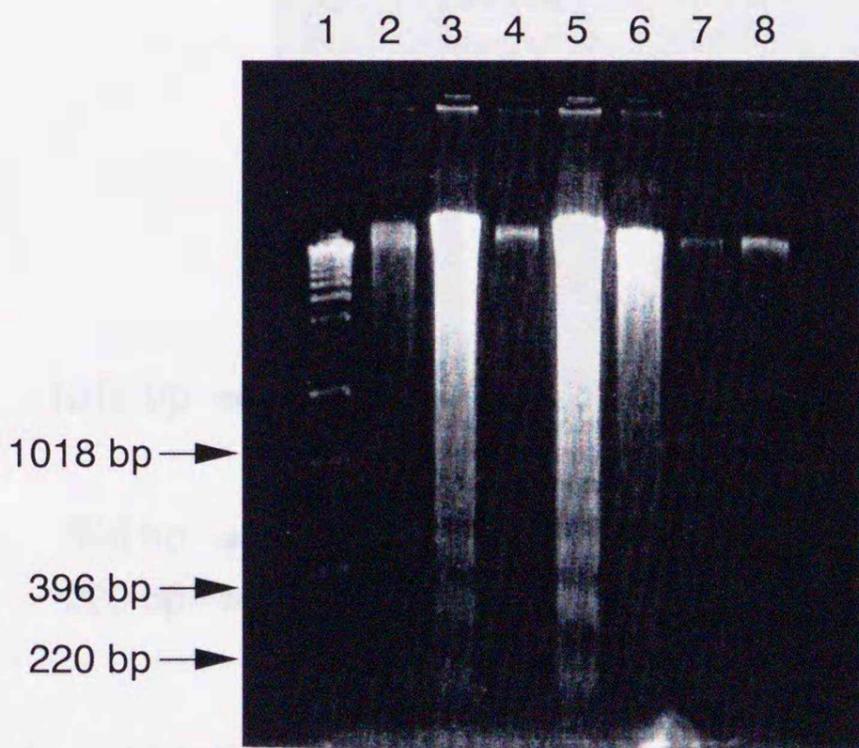


図8 C2セラミド処理によるDNA断片化に対するcaspase非選択的阻害薬Z-Asp-CH₂-DCBの効果

- | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1. Marker | 2. None |
| 3. 20 μM C2-ceramide | 4. 100 μM Z-Asp-DCB |
| 5. 1 μM Z-Asp-DCB + 20 μM C2-ceramide | 6. 10 μM Z-Asp-DCB + 20 μM C2-ceramide |
| 7. 50 μM Z-Asp-DCB + 20 μM C2-ceramide | 8. 100 μM Z-Asp-DCB + 20 μM C2-ceramide |

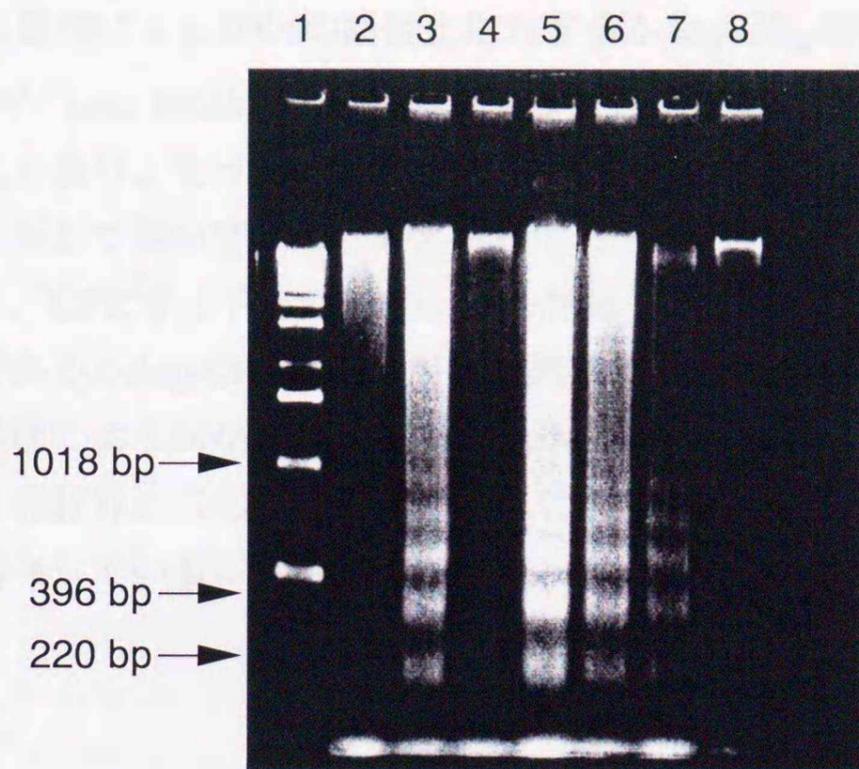


図9 スフィンゴシン処理によるDNA断片化に対するZ-Asp-CH₂-DCBの効果

- | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1. Marker | 2. None |
| 3. 20 μM sphingosine | 4. 100 μM Z-Asp-DCB |
| 5. 1 μM Z-Asp-DCB + 20 μM sphingosine | 6. 10 μM Z-Asp-DCB + 20 μM sphingosine |
| 7. 50 μM Z-Asp-DCB + 20 μM sphingosine | 8. 100 μM Z-Asp-DCB + 20 μM sphingosine |

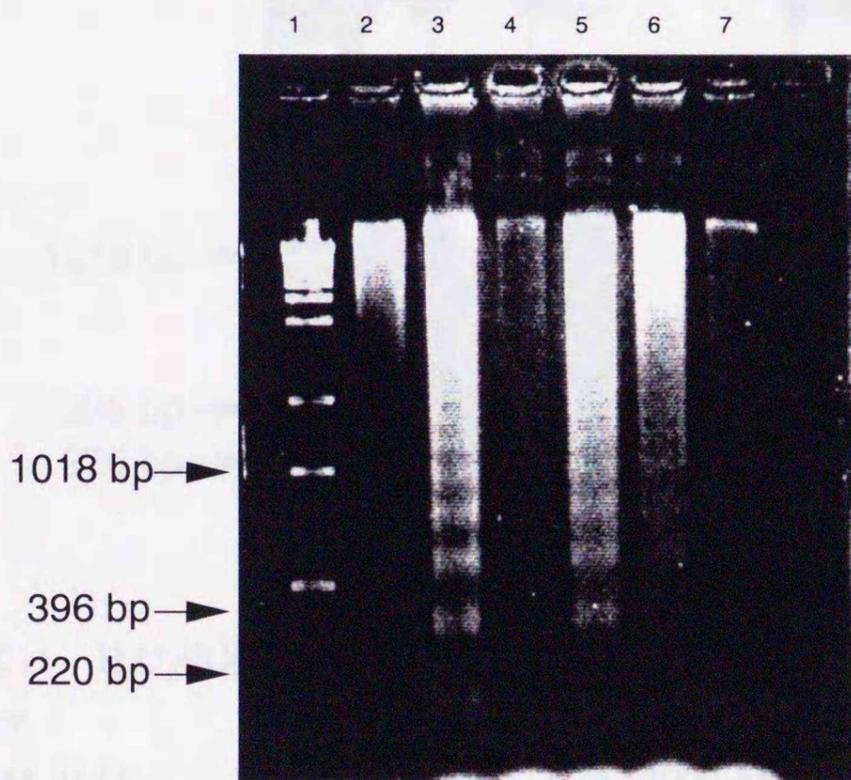


図10 スフィンゴミエリナーゼ処理によるDNA断片化に対するZ-Asp-CH₂-DCBの効果

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Marker | 2. None |
| 3. 400 mU/ml SMase | 4. 100 μM Z-Asp-DCB |
| 5. 1 μM Z-Asp-DCB + 400 mU/ml SMase | 6. 10 μM Z-Asp-DCB + 400 mU/ml SMase |
| 7. 100 μM Z-Asp-DCB + 400 mU/ml SMase | |

2-2-2 H₂O₂処理によるDNAの断片化に対するZ-Asp-CH₂-DCBの効果

H₂O₂、UV、heat shockなどの各種ストレスにより細胞内のセラミドが増加することが知られており、セラミドがこれらのストレスによるアポトーシスのセカンドメッセンジャーとして働いていると考えられている⁴⁾。そこで、H₂O₂によるアポトーシスにおいても、C2セラミドと同様にcaspaseが関与しているかどうか、caspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBを用いて同様に検討した。その結果、100 μM H₂O₂の12時間処理によるDNAの断片化も100 μM Z-Asp-CH₂-DCBの前処理により完全に抑制された(図11)。このことから、H₂O₂によるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導に、caspaseが関与していることが示唆された。

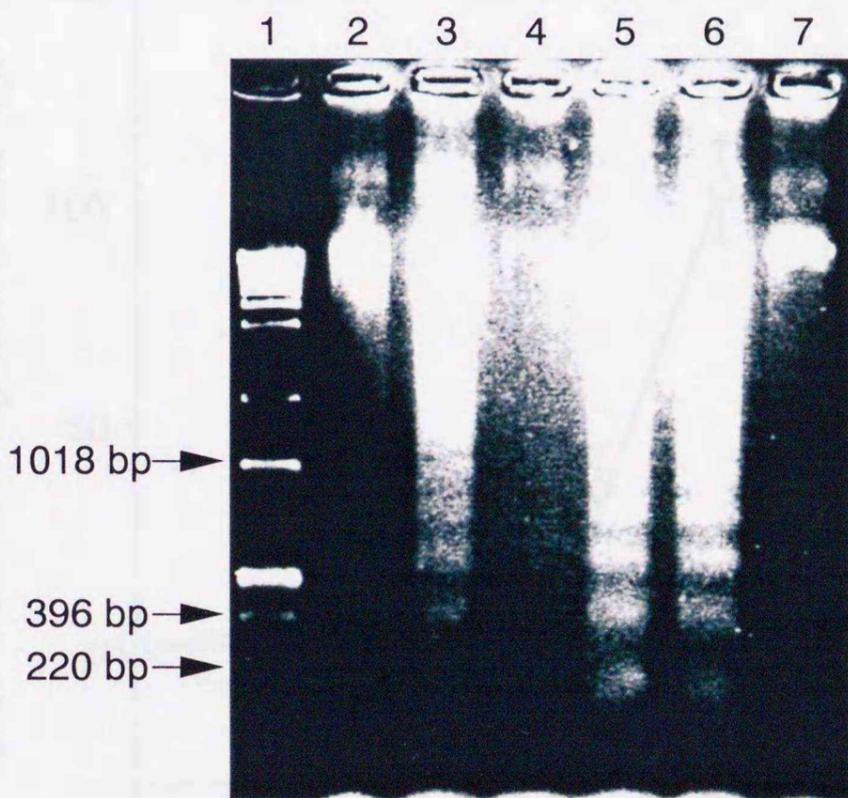


図11 H₂O₂処理によるDNA断片化に対するZ-Asp-CH₂-DCBの効果

- | | |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1. Marker | 2. None |
| 3. 100 μM H ₂ O ₂ | 4. 100 μM Z-Asp-DCB |
| 5. 1 μM Z-Asp-DCB + 100 μM H ₂ O ₂ | 6. 10 μM Z-Asp-DCB + 100 μM H ₂ O ₂ |
| 7. 100 μM Z-Asp-DCB + 100 μM H ₂ O ₂ | |

2-2-3 C2セラミド、スフィンゴシン、H₂O₂処理によるcaspaseの活性化

C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導にcaspaseが関与していることが示唆されたが、つぎに、caspaseが実際に活性化しているか否かについて、2種類の蛍光基質、Ac-YVAD-MCA (caspase-1様プロテアーゼに特異的な発蛍光性テトラペプチド基質) と、Ac-DEVD-MCA (caspase-3様プロテアーゼに特異的な発蛍光性テトラペプチド基質) を用いて検討した。Ac-YVAD-MCAおよび、Ac-DEVD-MCAを基質とするcaspaseの種類は表1に示す。20 μ MのC2セラミドを培養液中に添加後、3~4時間後からAc-DEVD-MCA切断活性が上昇し、5時間後に、この活性は最大となった。このAc-DEVD-MCA切断活性はcaspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBを100 μ Mで1時間前処理することにより完全に抑制された(図12)。一方、Ac-YVAD-MCA切断活性(ICEなどのearly phase caspases活性)はC2セラミド処理により上昇しなかった(図12)。また、不活性型のジヒドロC2セラミドではAc-DEVD-MCA切断活性は認められなかった(図12)。以上の結果より、C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、Ac-DEVD-MCA切断活性、すなわち、caspase-3様プロテアーゼが活性化されていることが確認された。

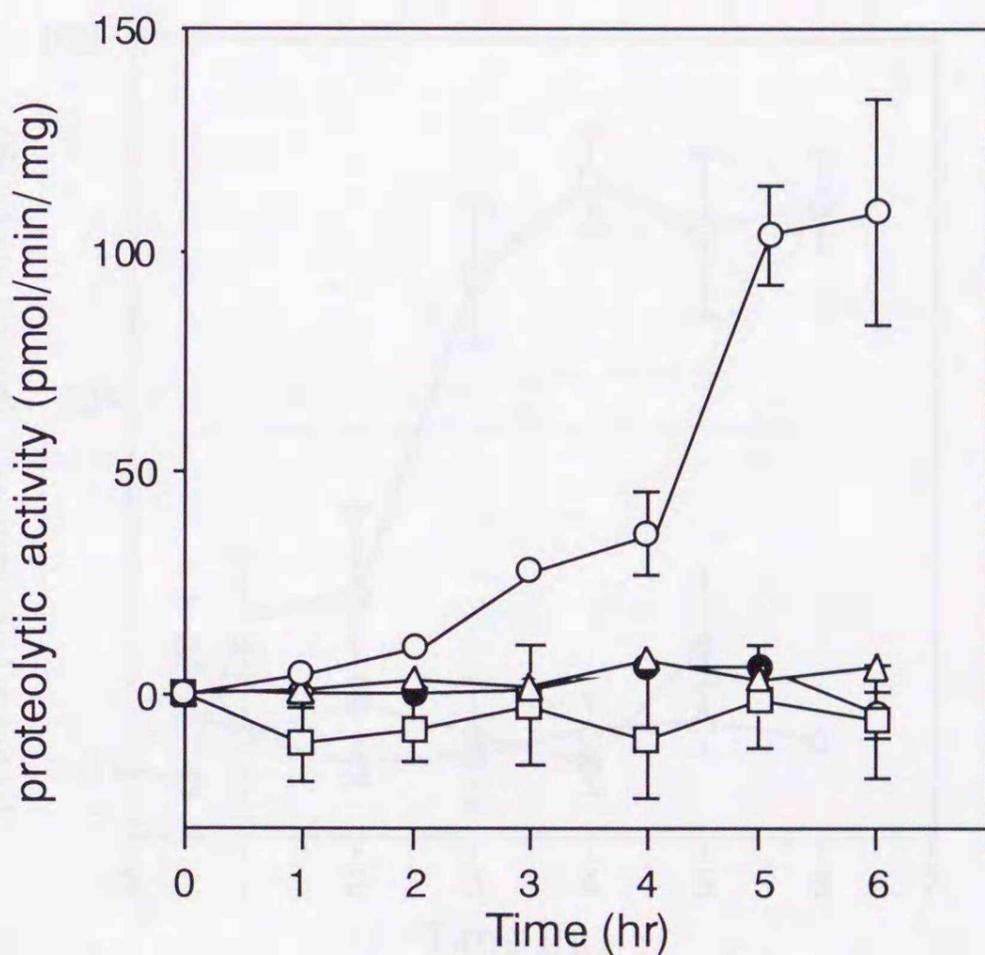


図12 caspase活性化に対するC2セラミドの効果

SK-N-MC細胞に各薬物を0~6時間、Z-Asp-CH₂-DCBは1時間前処理後、caspaseの蛍光基質(DEVDまたはYVAD)に対する切断活性を測定した。

- 20 μ M C2-ceramide (基質DEVDの場合)
- △— 20 μ M C2-ceramide (基質YVADの場合)
- 20 μ M DiC2-ceramide (基質DEVDの場合)
- 20 μ M C2-ceramide + 100 μ M Z-Asp-CH₂-DCB (基質DEVDの場合)

また、スフィンゴシン、 H_2O_2 によるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、caspaseが活性化しているかどうか同様に検討したところ、 $20\ \mu\text{M}$ のスフィンゴシンを培養液中に添加後、2~3時間後からAc-DEVD-MCA切断活性が上昇し、4時間後に、この活性は最大となった(図13)。一方、 $100\ \mu\text{M}$ の H_2O_2 を培養液中に添加後、4~5時間後からAc-DEVD-MCA切断活性が上昇し、6時間後に、この活性は最大となった(図14)。このスフィンゴシンおよび、 H_2O_2 によるAc-DEVD-MCA切断活性はcaspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp- CH_2 -DCBを $100\ \mu\text{M}$ で1時間前処理することにより完全に抑制された(図13、14)。一方、Ac-YVAD-MCA切断活性はスフィンゴシン、 H_2O_2 処理によっても認められなかった(図13、14)。以上の結果より、スフィンゴシンおよび、 H_2O_2 によるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時にもC2セラミドの場合と同様に、Ac-DEVD-MCA切断活性、すなわち、caspase-3様プロテアーゼが活性化されていることが明らかとなった。

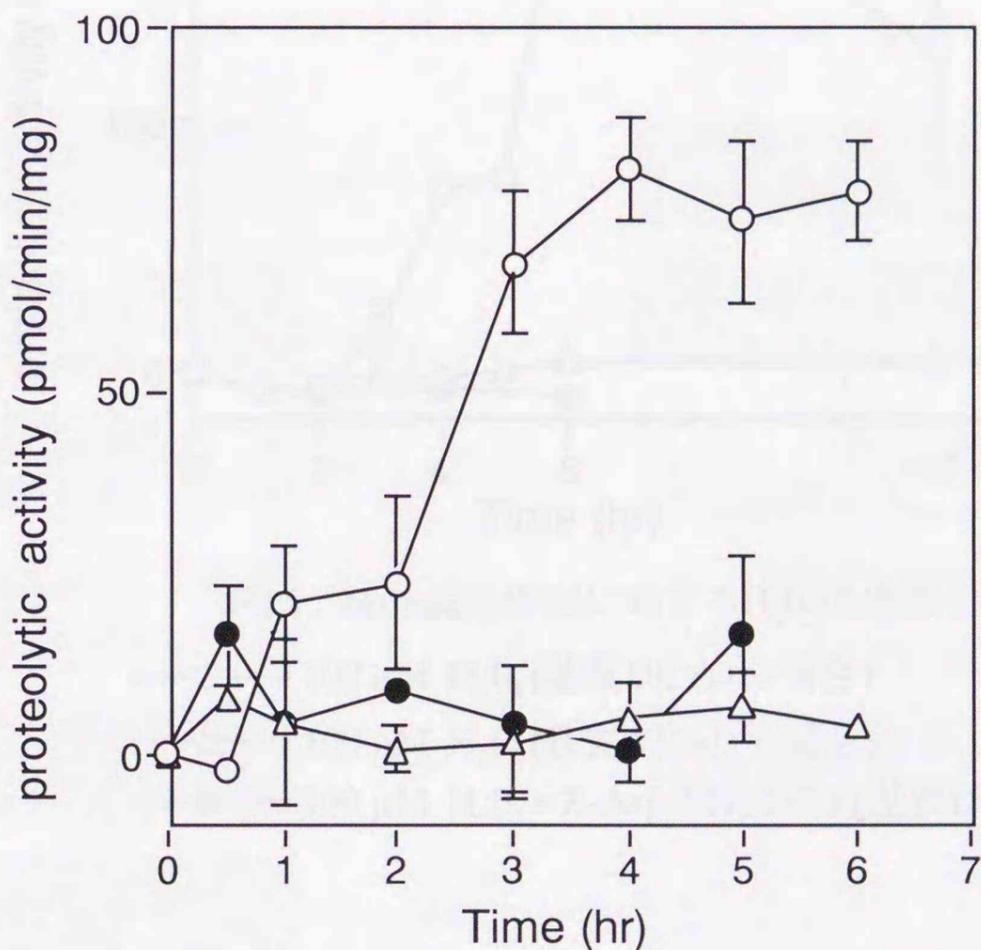


図13 caspaseの活性化に対するsphingosineの効果

- 20 μM sphingosine (基質DEVDの場合)
- △— 20 μM sphingosine (基質YVADの場合)
- 20 μM sphingosine + 100 μM Z-Asp- CH_2 -DCB (基質DEVDの場合)

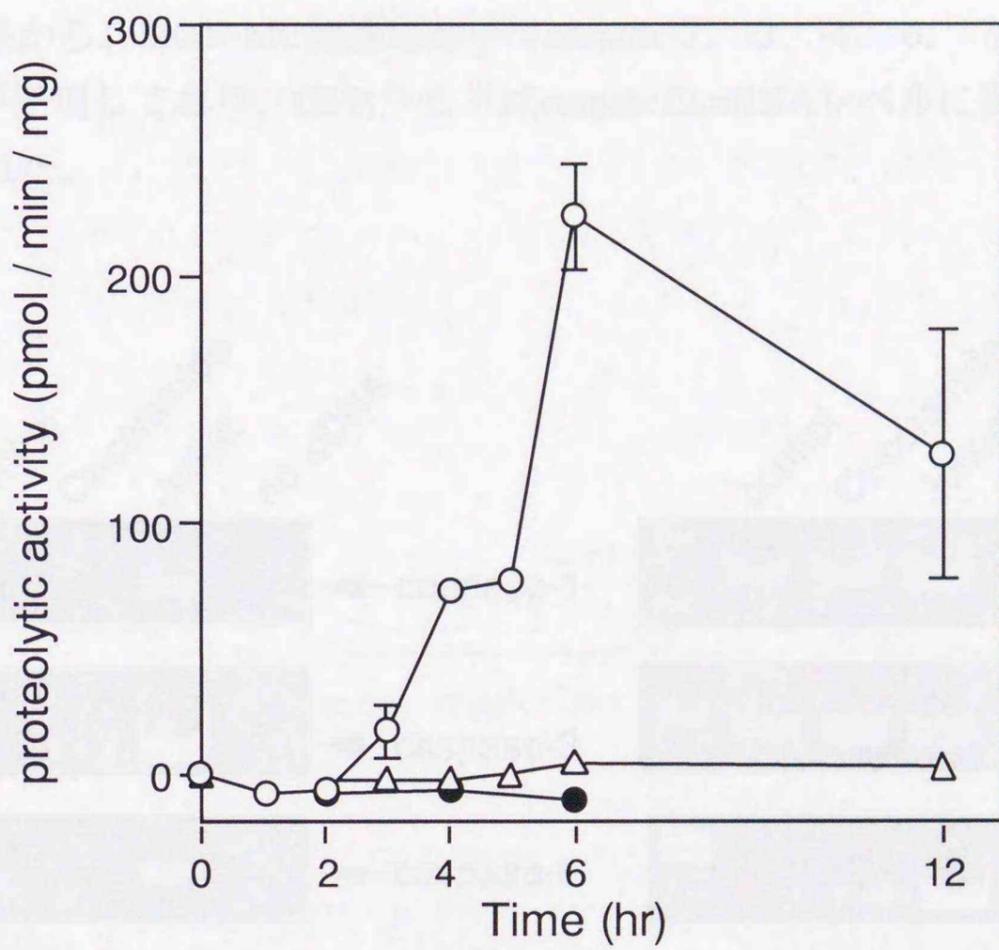


図14 caspase活性化に対するH₂O₂の効果

- 100 μM H₂O₂ (基質DEVDの場合)
- △— 100 μM H₂O₂ (基質YVADの場合)
- 100 μM H₂O₂ + Z-Asp-CH₂-DCB (基質DEVDの場合)

2-2-4 SK-N-MC細胞におけるcaspase mRNAの発現

現在、ヒトで10種類のcaspaseサブタイプが知られており(表1)、アポトーシス誘導の刺激、細胞種によって、関与するcaspaseの種類が異なっていると考えられている。そこで、C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシスに関与するcaspaseのサブタイプを検討するため、最初に、RT-PCR法を用いて、SK-N-MC細胞に発現するcaspase mRNAのサブタイプを調べた。その結果、SK-N-MC細胞においてcaspase-2、-3、-4、-6、-7、-8、-9、-10 mRNAの発現が認められた(図15)。また、20 μ MのC2セラミド 6時間処理は、caspase mRNAの発現レベルに影響を与えなかった。以上の結果から、SK-N-MC細胞においてcaspase-2、-3、-4、-6、-7、-8、-9、-10 mRNAが発現しており、C2セラミドはcaspaseのmRNAレベルに影響を与えないことが示された。

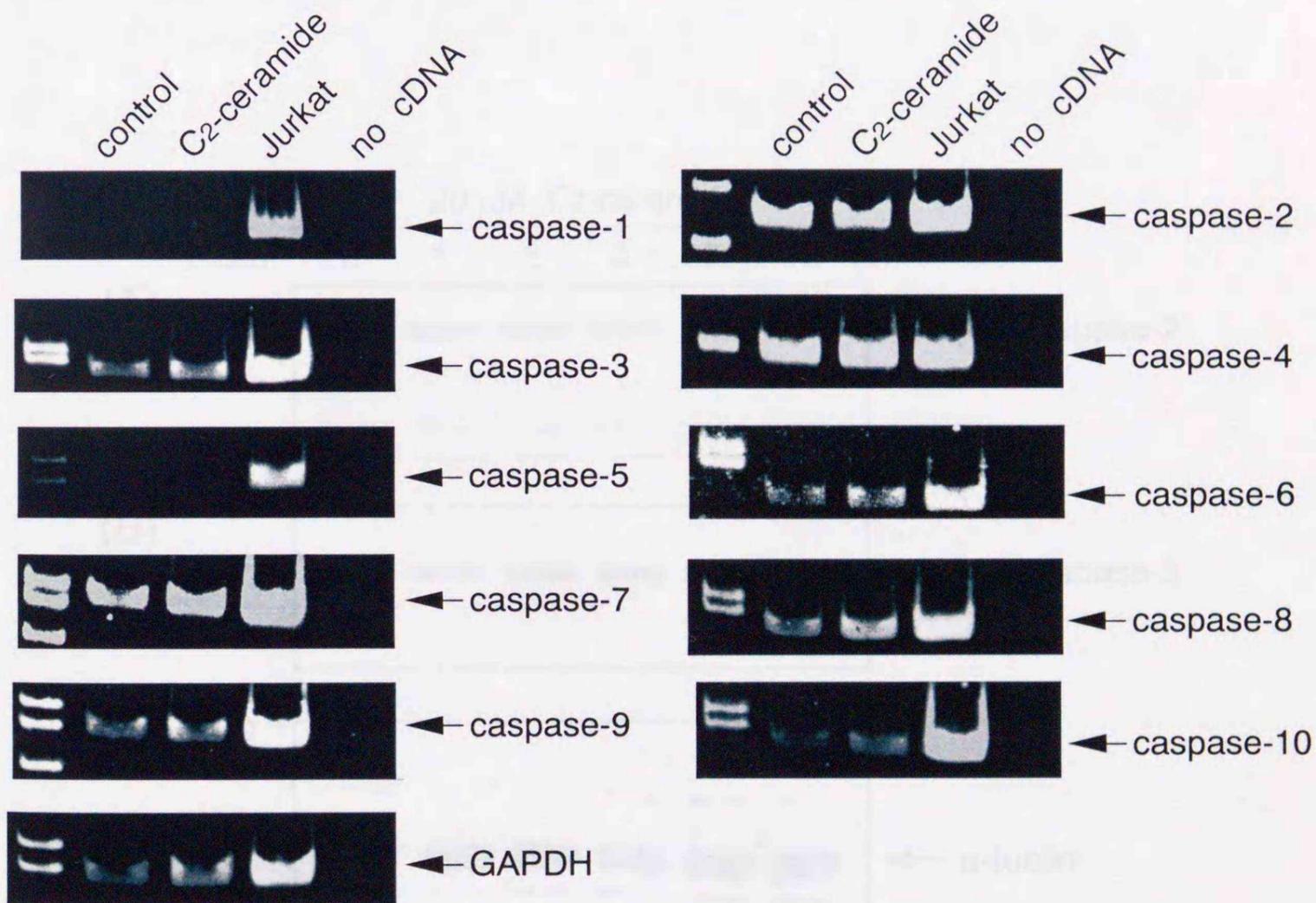


図15 SK-N-MC細胞におけるcaspase family mRNAの発現

SK-N-MC細胞におけるcaspase family mRNAの発現をRT-PCR法を用いて検討した。positive controlとしてJurkat細胞のtotal RNAを用いた。

2-2-5 C2セラミド処理によるpro-caspase-2および-3のプロセシングの検討

一般に、caspaseは活性化に伴いタンパク質レベルでプロセシングされることが知られている。C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシスに参与するcaspaseのサブタイプをタンパク質レベルで検討するため、caspase-2および3に特異的な抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、20 μ MのC2セラミド処理により、caspase-2の前駆体が、処理時間依存的に減少した(図16)。caspase-3の前駆体も、20 μ MのC2セラミド処理により、処理時間依存的に減少した(図16)。また、サンプル間のタンパク質量の差が無いことを確認するため、 α -tubulinに対する抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行い、用いたサンプル間にタンパク質量の差は無いことを確認した。以上の結果から、C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、caspase-2および-3の前駆体が減少することが明らかとなった。このcaspase-2および-3の前駆体の減少は、caspase-2および-3が活性化に伴ってプロセシングされた結果、生じたと推定された。

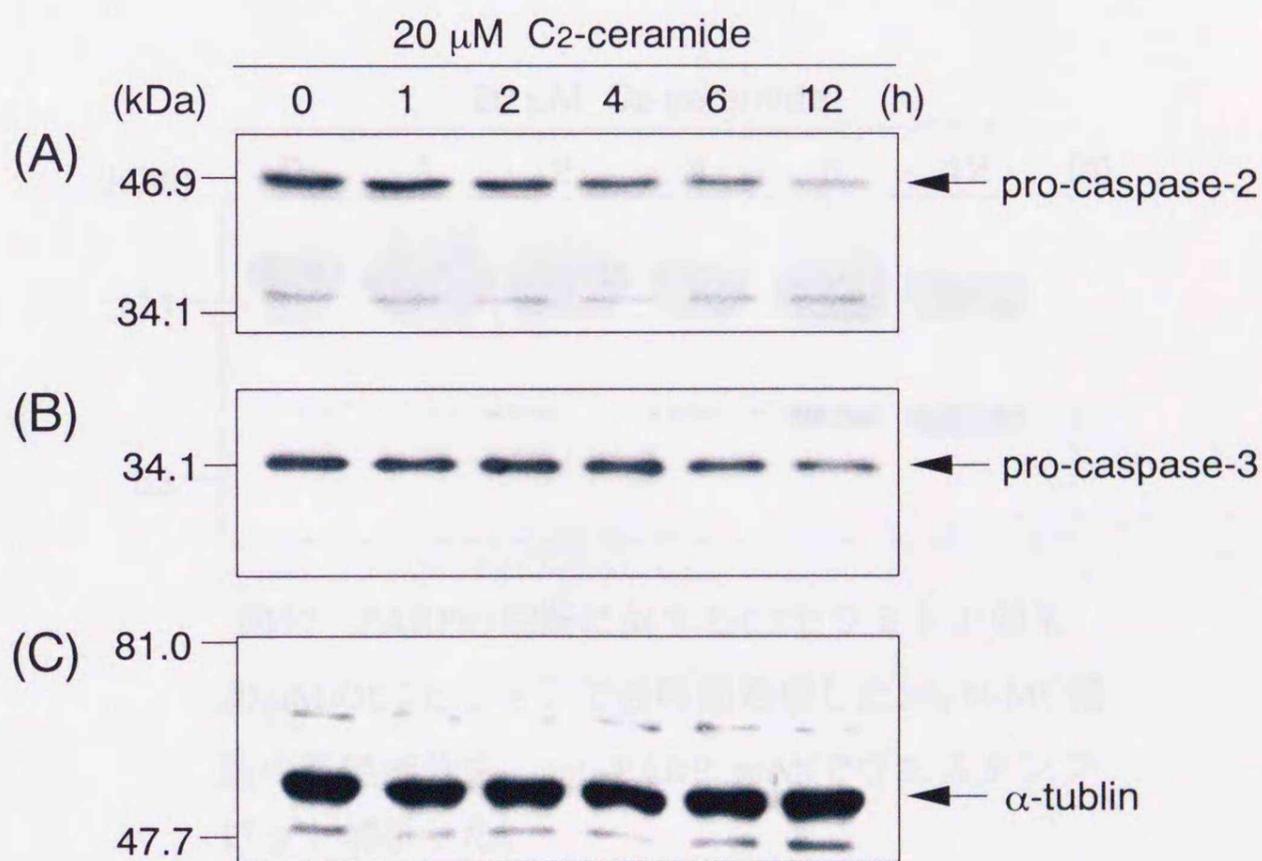


図16 pro-caspase-2、-3のプロセシングに対するC2セラミドの影響
20 μ MのC2セラミドで各時間処理したSK-N-MC細胞の細胞質画分を、
(A) anti-ICH-1L pAb、(B) anti-CPP32 mAb、(C) anti- α -Tubulin mAbでウ
エスタンブロット解析した。

2-2-6 C2セラミド処理によるPARPの切断

つぎに、caspaseの基質であるPARPがC2セラミド処理により切断されるか否かについて、PARP特異的抗体を用いてウエスタンブロット解析により検討した。20 μ MのC2セラミドを各時間処理したSK-N-MC細胞の粗膜画分を用いて、PARPのC末端側を認識する抗体でウエスタンブロット解析を行った結果、C2セラミドの処理時間依存的にPARPの断片に相当する約85 kDaのバンドの増加が認められた(図17)。

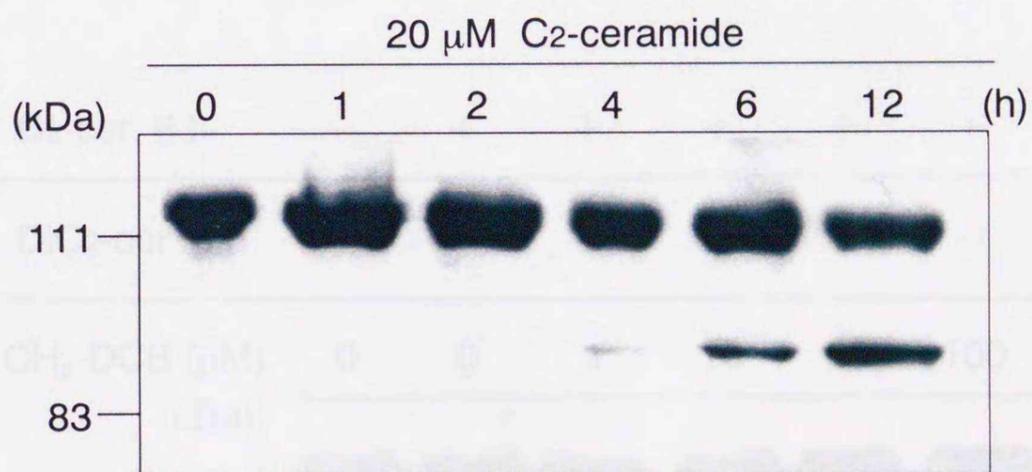


図17 PARPの切断に対するC2セラミドの効果
20 μ MのC2セラミドで各時間処理したSK-N-MC細胞の粗膜画分を、anti-PARP mAbでウエスタンブロット解析した。

このC2セラミド処理によるPARPの断片に相当する約85 kDaのバンドの増加は、caspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBを1時間前処理することにより、濃度依存的に抑制された(図18)。また、不活性型のジヒドロC2セラミドではPARPの切断は認められなかった(図18)。このことから、C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、caspaseの基質であるPARPの切断が引き起こされ、このC2セラミドによるPARPの切断はcaspaseによるものであることが明らかとなった。以上の結果より、C2セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシスの誘導にcaspase-2および-3の活性化が一部関与していることが示唆された。

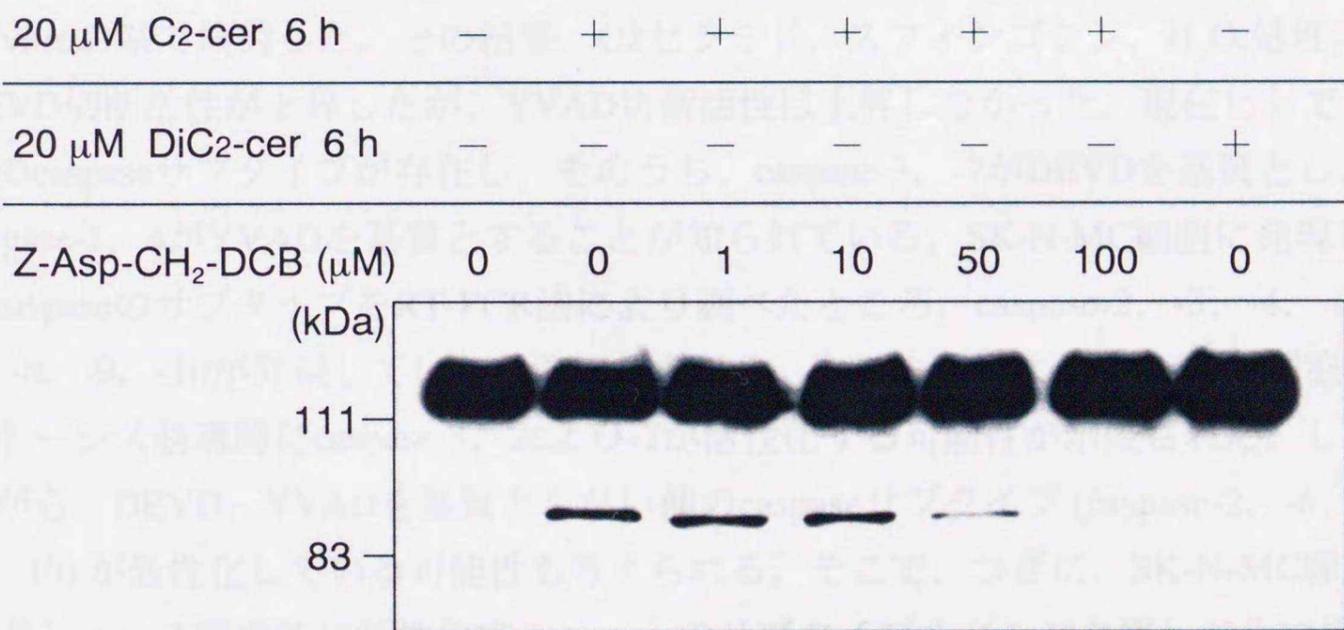


図18 C2セラミドまたは、ジヒドロC2セラミドの各処理によるPARPの切断に対する各種濃度のZ-Asp-CH₂-DCBの効果

2-3 考察

Z-Asp-CH₂-DCBは、caspaseの非選択的ペプチド阻害薬であり、脂溶性の高い benzyloxycarbonyl基をもつため、細胞に効率よく取り込まれると考えられている³³⁾。そこで、セラミドによって惹起されるSK-N-MC細胞のアポトーシスにcaspaseが関与しているか否かを明らかにするため、まず最初に、Z-Asp-CH₂-DCBを用いて、DNAの断片化に対する効果について検討した。その結果、Z-Asp-CH₂-DCBは濃度依存的に、C2セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼにより引き起こされるDNAの断片化を抑制した。このことから、C2セラミド、スフィンゴシン、内在性のセラミドによるアポトーシスの誘導にcaspaseが関与していることが示唆された。また、H₂O₂、UV、熱ショック刺激などの各種ストレスによるアポトーシスの誘導に、セラミドがセカンドメッセンジャーとして働いていると考えられていることから⁴⁾、H₂O₂により引き起こされるDNAの断片化についても同様に検討したところ、Z-Asp-CH₂-DCBは濃度依存的に抑制した。このことから、H₂O₂によるアポトーシスの誘導にもcaspaseが関与していることが示唆された。しかしながら、SK-N-MC細胞において、H₂O₂によるアポトーシスにセラミドがセカンドメッセンジャーとして働いているか否か不明であり、今後検討が必要である。

つぎに、実際にcaspaseが活性化されているか否かを、caspaseの蛍光基質を用いて、in vitroの系で検討した。その結果、C2セラミド、スフィンゴシン、H₂O₂処理によりDEVD切断活性が上昇したが、YVAD切断活性は上昇しなかった。現在ヒトで10種類のcaspaseサブタイプが存在し、そのうち、caspase-3、-7がDEVDを基質とし、caspase-1、4がYVADを基質とすることが知られている。SK-N-MC細胞に発現しているcaspaseのサブタイプをRT-PCR法により調べたところ、caspase-2、-3、-4、-6、-7、-8、-9、-10が発現していた。このことから、セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時にcaspase-3、および-7が活性化する可能性が示唆された。しかしながら、DEVD、YVADを基質としない他のcaspaseサブタイプ(caspase-2、-6、-8、-9、-10)が活性化している可能性も考えられる。そこで、つぎに、SK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に活性化するcaspaseのサブタイプをタンパク質レベルで検討した。

一般に、caspaseは活性化に伴いプロセッシングされることが知られている。caspase-1 (ICE) については、ICEの前駆体(p45)が、活性化によりプロセッシングされ、p20とp10のポリペプチドがつくられ、そのp20とp10がヘテロ二量体を作り、さらに、四量体を形成して活性型酵素となることがX線解析の結果から明らかにされており³⁴⁾、他のcaspaseサブタイプもICEと同様に活性化に伴いプロセッシングされ、四量体³⁵⁾

を形成すると考えられている。そこで、セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、caspaseがプロセッシングを受けるか否か検討した。その結果、caspase-2および-3の前駆体が、C2セラミド処理により減少した。また、caspaseの基質であるPARPの切断もC2セラミド処理により引き起こされたことから、セラミドによるSK-N-MC細胞のアポトーシス誘導時に、caspase-2および-3が活性化されている可能性が示唆された。一方、caspase-6、7、8、9、10については、その特異的な抗体が入手出来なかったことから、解析不可能であった。今後、抗体が入手出来次第、検討するつもりである。

ヒトで10種類のcaspaseが存在しており、組織、細胞の違いにより発現しているcaspaseの種類が異なることが知られている。caspase-1ノックアウトマウスでは、その発生過程は正常に行われ、胸腺細胞において、放射線やステロイドホルモンによる細胞死に対しては影響しないものの、抗Fas抗体による細胞死は抑制されることが報告されている³⁶⁾。caspase-3ノックアウトマウスでは、胎生期に2/3以上のマウスが死亡し、生まれてきたホモ欠損マウスは、脳神経系に異常をきたしており、生後3週間以内に全てのマウスが死亡する。しかしながら、胸腺細胞において、デキサメタゾン、抗Fas抗体による細胞死に影響を及ぼさなかった³⁷⁾。これらの知見から、細胞の種類や、刺激の種類の違いによって、caspaseが使い分けられていることが考えられる。一方、ラット副腎髄質褐色細胞腫細胞PC12において、カルシウムイオノフォアによる細胞死の過程に、caspase-1様プロテアーゼの活性が上昇し、遅れてcaspase-3様プロテアーゼの活性が上昇し、caspase-3様プロテアーゼの活性の上昇にはcaspase-1様プロテアーゼの活性の上昇が必要であることが報告されている³⁸⁾。Fas刺激による細胞死の系では、caspase-8がcaspase-3の上流で働くことが報告されている³⁹⁾。これらの知見は、caspaseファミリーの分子間で補体系のようなプロテアーゼカスケードを構成して、アポトーシスを引き起こす可能性を示唆している。今回筆者が用いたSK-N-MC細胞においてセラミド処理により、少なくともcaspase-2および-3が活性化されることが示唆された。in vitroにおいてcaspase-3がcaspase-2を切断することが報告されていることから⁴⁰⁾、caspase-3がcaspase-2を活性化し、アポトーシスを誘導する可能性が考えられる。しかしながら、caspase-2および-3のウェスタンブロット解析の結果、caspase-2の活性化はcaspase-3の活性化より早く起きていると思われることから、caspase-2とcaspase-3はparallelに活性化されると推測される。一方、他のcaspase (caspase-6、7、8、9、10) も独立に、あるいは、プロテアーゼカスケードを構成して関与している可能性も考えられ、今後、検討していく必要がある。また、セラミドによって引き起こされるアポトーシス誘導時にcaspase-3が活性化されることはすでに報告されているが⁴²⁾、今回初めて、caspase-2が活性化されることを見いだした。セラミドによるcaspase-2の活性化はSK-N-MC細胞、あるいは神経細胞

に特異的な現象であるのか否か、さらには、セラミドによるアポトーシスの誘導に caspase-2とcaspase-3の両方とも必要であるのか、あるいは、どちらか一方のみで十分であるのか否か疑問が残る。今後、SK-N-MC細胞以外の神経系細胞を含む他の細胞においてもセラミドによるcaspase-2の活性化が引き起こされるのか、さらに、caspase-2、-3のドミナントネガティブ体を移入したtransfectantや、アンチセンス法を用いて、caspase-2および-3の活性化がセラミドにより引き起こされるアポトーシスに必須であるのか否か検討していく必要がある。

ところで、セラミドはどのような分子を介してcaspaseを活性化するのであろうか。膜透過性のセラミドにより活性化される因子に、MAPKファミリーであるSAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase)⁴³⁾、セリン/スレオニンキナーゼであるCAPK (ceramide activated protein kinase)⁴⁴⁾、PP2A類似のプロテインフォスファターゼであるCAPP (ceramide activated protein phosphatase)^{45, 46)}などが報告されている。また、CAPKがRas経路のメンバーで、Rafを活性化するKSR (kinase suppressor of Ras) と同一分子であること⁴⁷⁾、CAPPを介してc-Mycをdown regulationすること⁴⁸⁾などが報告されている。これらの因子のうち、SAPK/JNKの活性化がセラミドによるアポトーシスに必要であることが、SEK1 (SAPK/ERK kinase-1)、c-Junのドミナントネガティブ体の強制発現や、アンチセンス法を用いた実験により報告されている^{4, 49)}。また、TNF- α 、UV、放射線、熱ショックなどのストレスや、NGF除去によるアポトーシスにおいても、SAPK/JNKが関与することが報告されている^{4, 50)}。しかしながら、caspaseの活性化にSAPK/JNKの活性化が必須であるか否かは不明であり、逆に、FasによるSAPK/JNK、p38 MAPKの活性化はcaspaseの下流にあり、アポトーシスに関与しないことや^{51, 52)}、TNF- α によるSAPK/JNKの活性化は細胞死と独立した現象であること^{53, 54)}が報告されており、細胞種、刺激により、SAPK/JNKのアポトーシスへの関与は異なっていると考えられる。筆者は、セリン/スレオニンキナーゼの阻害薬であるH-7、チロシンキナーゼの阻害薬であるハービマイシンAを用いて、C2セラミドによるDNAの断片化およびcaspaseの活性化に対する効果を検討したが、ハービマイシンA、H-7自身がアポトーシスのinducerとなり、caspaseを活性化してしまうため、その効果をみる事が出来なかった(データ未提示)。実際、セリン/スレオニンキナーゼの阻害薬であるスタウスロポリンはアポトーシスのinducerとして頻繁に使用されている。したがって、ドミナントネガティブ体を移入したtransfectantや、アンチセンス法を用いて、SAPK/JNKの関与を今後検討する必要がある。

第3章 セラミドによるアポトーシス誘導におけるcytochrome cの関与

小緒

現在、主に二つのcaspaseの活性化機構が明らかにされている。一つはFas、TNF- α などのレセプター刺激によるcaspaseの活性化機構である。抗Fas抗体、Fas ligand、あるいは、TNF- α 刺激によって、FasやTNF- α 受容体の細胞内ドメインに存在するdeath domainと呼ばれる領域⁵⁵⁾に、FADD (Fas-associated protein with a novel death domain) あるいは、TRADD (TNFR1 associated death domain protein) と呼ばれるアダプター分子が結合⁵⁶⁻⁵⁸⁾し、さらに、caspase-8 (FLICE ; FADD-like ICE) がFADDを介して活性化され^{39, 40)}、他のcaspaseを活性化する。caspase-8によってどのcaspaseの活性化がどのような経路で遂行されるのかは、未だ明らかにされていない。もう一つは、Baxの強制発現、UV、スタウソロポリンなど、非レセプター刺激によるcaspaseの活性化機構であり、ミトコンドリアタンパク質であるcytochrome cが関与することが最近明らかになってきた。

ミトコンドリアタンパク質であるcytochrome cは電子伝達系の構成因子である。in vitroにおいてcytochrome cは、dATPの存在下でcaspase-3を活性化し、DNAの断片化を引き起こすことが報告され⁵⁹⁾、cytochrome cがcaspaseの活性化因子であることが示唆された。実際にBaxやスタウソロポリンなどによるアポトーシス誘導時に、ミトコンドリアから細胞質にcytochrome cが漏出されること⁶⁰⁻⁶²⁾、アポトーシス阻害因子であるBcl-2はその漏出を抑制することが報告され^{60, 61)}、cytochrome cがアポトーシスのシグナル伝達因子であることが示唆された⁶³⁾。そこで、本研究では、セラミドにより引き起こされるSK-N-MC細胞のアポトーシスにおけるcytochrome cの関与について検討した。

3-1 実験方法

3-1-1 細胞質画分の調製

10 cmディッシュにコンフルエントになるまで培養した細胞をPBSで洗浄後、3 mlのPBSで回収し、2,000 \times g、3分間遠心した。ペレットを200 μ lのlysis buffer (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、1 mM EDTA、250 mM Sucrose) で懸濁し、液体窒素で凍結、

溶解を行った。その細胞懸濁液を、氷中でDounce homogenizerで10 strokeホモジナイズした後、4℃、2,000 × g、5分間遠心し、その上清をさらに、4℃、18,000 × g、20分間遠心し、その上清を細胞質画分とした。

3-1-2 抗cytochrome c抗体によるウエスタンブロッティング法

細胞質画分タンパク質を2-1-6の方法により15%のゲルを用い電気泳動し、トランスファー後、ニトロセルロース膜をblocking buffer (4% スキムミルクを含むTBST) で1時間インキュベートすることでブロッキングを行った後、抗cytochrome c抗体 (blocking bufferで1000倍希釈) を加え4℃で、一晩軽く振とうしながらインキュベートした。TBSTで10分、3回洗浄後、2次抗体 (抗マウスIgG-horseradish peroxidase標識抗体、blocking bufferで2000倍希釈) で30分間振とうしながらインキュベートした。TBSTで10分、4回洗浄後、ECL検出システムにより検出した。

3-1-3 S-100画分の調製

10 cmディッシュにコンフルエントになるまで培養したSK-N-MC細胞をPBSで洗浄後、3 mlのPBSで回収し、2,000 × g、3分間遠心した。ペレットを10 cmディッシュ1枚につき100 μlのbuffer A (20 mM HEPES (pH 7.5)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM PMSF、1 μg/ml aprotinin) に懸濁し、氷中に15分間静置した。その後、氷中で超音波粉碎を行った後、4℃、2,000 × g、10分間遠心し、その上清を4℃、18,000 × g、20分間遠心し、さらにその上清を4℃、100,000 × g、1時間遠心し、得られた上清をS-100画分とした。

3-1-4 S-100 (-cyt c) 画分の調製

40 μlの抗cytochrome c抗体 (native formを認識、0.5 μg/μl) に、1:1に混合したProtein G-とProtein A-Sepharose (50% slurry) を50 μl加え、氷中で3時間静置後、3-1-3により得られたS-100画分の一部を加え、4℃で一晩回転させながら、インキュベートした。インキュベーション終了後、4℃、10,000 × g、15分間遠心し、得られた上清を、S-100画分からcytochrome cを取り除いて、S-100 (-cyt c) 画分とした。

3-1-5 プラスミドのE. coliへのトランスフォーメーション

Competent E. coli 100 μlにプラスミド50~100 ngを混和し、氷中で30分間インキュベートした。42℃で90秒間インキュベートした後、氷中で2分間静置し、500 μlのLB Broth (1% bacto trypton、0.5% bacto yeast extract、170 mM NaCl) を加え37℃で1時間激しく振とうした。その培養液をLB/ampicilin plate (1% bacto trypton、0.5

% bacto yeast extract, 170 mM NaCl, 1 % bacto agar, 50 µg/ml ampicilin) 上にストリークし、37 °Cで一晩培養した。

3-1-6 Small scale preparationによるプラスミドDNAの精製

LB/ampicilin plate上に生育した各コロニーを、4 mlのLB Brothに、4 µlのampicilinを加えた培養液に接種して37 °Cで一晩振とう培養した。培養後の菌液3 mlを18,000 × g、1分間遠心し、沈殿に100 µlのsolution I (25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、50 mM glucose)を加え懸濁し、200 µlのsolution II (0.2N NaOH、1 % SDS)を加え穏やかに混和した後、氷中で5分間インキュベートした。150 µlのsolution III (3 M potassium acetate、5 M glacial acetic acid)を加え、激しく混和し、氷中で5分間静置後、4 °C、18,000 × g、5分間遠心し、得られた上清に等量の2-propanolを加え、室温で5分間インキュベートした。4 °C、18,000 × g、15分間遠心し、沈殿を50 µlのTE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA)に溶解し、1 µlの1 mg/ml RNaseを加え37 °Cで30分間インキュベートした。インキュベーション終了後、phenol/CHCl₃抽出を1回行い、エタノール沈殿後、得られた沈殿をプラスミドDNAとして適当量の滅菌水に溶解した。シークエンシングを行う場合は、このプラスミドDNA溶液50 µlに対し、30 µlのPEG 6,000-NaCl (20 % PEG 6,000、2.5 M NaCl)を加え、氷中で1時間インキュベート後、4 °C、18,000 × g、20分間遠心し、得られた沈殿をシークエンシング用プラスミドDNAとして適当量の滅菌水に溶解した。

3-1-7 Large scale preparationによるプラスミドDNAの精製

Small scale preparationの際に残しておいた菌液100 µlを、500 mlのLB Brothに500 µlのampicilinを加えた培養液に加え、37 °Cで一晩振とう培養した。培養後の菌液を4 °C、4,000 × g、20分間遠心し、沈殿を10 mlのsolution Iに懸濁し、20 mlのsolution IIを加え穏やかに混和し、氷中で5分間インキュベートした。15 mlのsolution IIIを加え、激しく混和し、氷中で10分間インキュベート後、4 °C、10,000 × g、20分間遠心し、その上清に等量の2-propanolを加え、室温で15分間インキュベートした。18 °C、27,000 × g、20分間遠心し、得られた沈殿を6 mlのTEに溶解し、6 µlの20 mg/ml RNaseを加え、室温で15分間静置した。7.2 mg CsCl、30 µlのEtBrを加え、Quick-Seal Centrifuge Tubeに移しチューブを封入後、18 °C、100,000 × g、16時間超遠心した。超遠心後、分離したプラスミドDNA層をチューブから抜き取り、もう1回同じ条件で超遠心した。超遠心後、分離したプラスミドDNA層をチューブから抜き取り、等量のTE飽和n-butanolを混和後、2,000 × g、3分間遠心し、上層を除去する操作を繰り返す。EtBrを除いた。下層に等量のTEを加え、その総量の2.5倍量のethanolを加え、

室温で10分間静置した後、18℃、12,000 × g、20分間遠心した。得られた沈殿をプラスミドDNAとして適量の滅菌水に溶解した。

3-1-8 プラスミドの構築

caspase-2の全長を含むプラスミド (pBactH37Z) と、Jurkat細胞より抽出したtotal RNAから逆転写して得られたcDNAを鋳型として、PCRを行い、全長のcaspase-2およびcaspase-3 cDNAをそれぞれ得た。得られたPCR産物に、3 μlの10 × PCR buffer (15 mM MgCl₂を含む)、1.8 μlの25 mM MgCl₂、3 μlの10 mM dNTPs、0.3 μlのampliTaq PCR polymerase (5 U/μl) を加え、滅菌精製水で全量を30 μlにし、72℃で20分間インキュベートすることによりdATPを付加した。その後、エタノール沈殿し、PCR産物を精製した後、Eukaryotic TA Cloning Kitを用いて、pCR3.1にサブクローニングした。PCR産物とpCR3.1をモル比で10:1になるように加え、滅菌精製水で5 μlにし、5 μlのsolution I (DNA Ligation Kit Ver. II) を加え全量を10 μlにし、16℃で1時間インキュベートすることにより、ライゲーション反応を行った。このライゲーション反応液をcompetent E. coli TOP10にトランスフォームし、プレート上に生育したコロニーを数クローンずつ、Small scale preparationにより、プラスミドDNAを精製した。pCR3.1-caspase-2に対してはBamH Iで、pCR3.1-caspase-3に対してはHind IIIで消化し、正しい方向をもつプラスミドDNAを選択した。3-1-9に従いシーケンシングし塩基配列を調べ、方向と塩基配列の正しいクローンについてLarge scale preparationにより、pCR3.1-caspase-2とpCR3.1-caspase-3プラスミドDNAを得た。

3-1-9 塩基配列の確認

シーケンシングは、ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用いてプラスミドDNAをラベルし、373A DNA Sequencerを用いて行った。プラスミドDNA 1 μgに、1 μlの3.2 μM primer、8 μlのDye Terminatorを加え、滅菌精製水で全量を20 μlにした。Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400-Rを用いて、この反応液を96℃で3分間熱変性を行い、それ以降、96℃で30秒、50℃で15秒、60℃で4分間サイクルを25回行った。反応終了後、エタノール沈殿し、6 μlのloading buffer (formamide, 50 μM EDTA, Blue dextran) に溶解後、泳動bufferとしてTBE (89.2 mM Tris, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA) を用い、6%のシーケンシングゲル (6% acrylamide, 1 × TBE, 50% Urea) に電気泳動し、373A DNA Sequencerを用いて解析し、塩基配列を決定した。

3-1-10 in vitro translationによる³⁵S-methionineラベルcaspase-2およびcaspase-3タンパク質の調製

³⁵S-methionineラベルcaspase-2およびcaspase-3タンパク質の調製は、TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systemを用いて行った。1 μlの1 μg/μl pCR3.1-caspase-2あるいは1 μg/μl pCR3.1-caspase-3に、25 μlのTNT Rabbit Reticulocyte Lysate、2 μlのTNT Reaction buffer、1 μlの1 mM Amino Acid Mix Minus Methionine、1 μlのTNT T7 RNA polymerase、1 μlの25 U/μl RNase inhibitor、4 μlの1000 Ci/nmol ³⁵S-methionineを加え、全量をDEPC処理滅菌水で50 μlとし、30 °Cで1.5時間インキュベートすることで、³⁵S-methionineラベルcaspase-2およびcaspase-3を得た。

3-1-11 S-100画分による³⁵S-methionineラベルcaspase-2およびcaspase-3の切断

50 μgのS-100あるいはS-100 (-cyt c) 画分に、1 μlの20 mM MgCl₂、1 μlの20 mM dATP、1 μlの³⁵S-caspase-2あるいはcaspase-3を加え、全量をbuffer Aで20 μlとし、30 °Cで2時間インキュベートした。また、S-100 (-cyt c) 画分にcytochrome c標品を0.2 μg加えたサンプルも同様に行った。5 μlの5 × SDS buffer (78.125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2.5 % SDS、12.5 % glycerol、2 % 2-mercaptoethanol、0.125 % bromophenol blue)を加え、反応を停止した後、5分間煮沸し、15 %ゲルでSDS-PAGEを行った。泳動終了後、ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色後、脱染し、乾燥させた後、BAS 2000 (Fuji) を用いて解析した。

3-1-12 使用薬物

本章で用いた主な試薬の入手先はつぎの通りである。

anti-cytochrome c antibody (Pharmingen)、anti-cytochrome c antibody (native formを認識、Pharmingen)、Protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech)、Protein A-Sepharose (Pharmacia Biotech)、bacto trypton (Difco)、bacto yeast extract (Difco)、bacto agar (Difco)、ampicillin sodium (和光純薬 (株))、Quick-Seal Centrifuge Tubes (Beckman)、Eukaryotic TA Cloning Kit (Invitrogen)、TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)、³⁵S-methionine (NEN)、cytochrome c (和光純薬 (株))、各種制限酵素 (Takara)、DNA Ligation Kit Ver. II (Takara)、ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)、ampliTaq PCR polymerase (Perkin Elmer)

3-2 実験結果

3-2-1 C2セラミド処理によるcytochrome cの細胞質への漏出

最近、アポトーシスの初期段階でミトコンドリアタンパク質cytochrome cが細胞質に漏出し、caspaseを活性化することが報告された^{59, 60}。そこで、SK-N-MC細胞においてC2セラミド処理によるアポトーシス誘導時に、cytochrome cの細胞質への漏出が起きているか否かを抗cytochrome c抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討した。その結果、20 μ M C2セラミド処理4時間後からcytochrome cの細胞質への漏出が認められた(図19)。このcytochrome cの細胞質への漏出はcaspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBを100 μ M、1時間前処理しても抑制されなかった(図20)。したがって、C2セラミド処理によるアポトーシス誘導時に、cytochrome cの細胞質への漏出が生じること、またこの現象は、caspaseの活性化より上流で起きていることが示唆された。

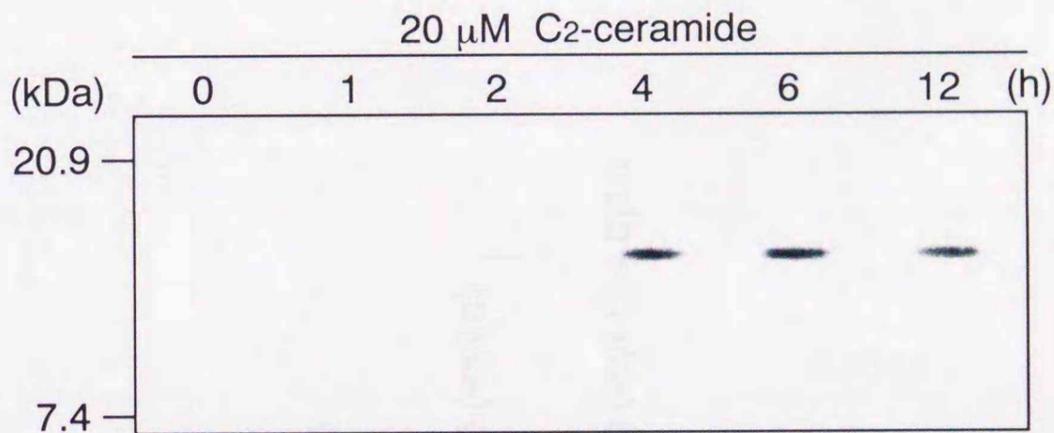


図19 cytochrome cの細胞質への漏出に対するC2-ceramideの効果
各時間C2-ceramide処理したSK-N-MC細胞の細胞質画分を
anti-cytochrome c mAbでウエスタンブロット解析した。

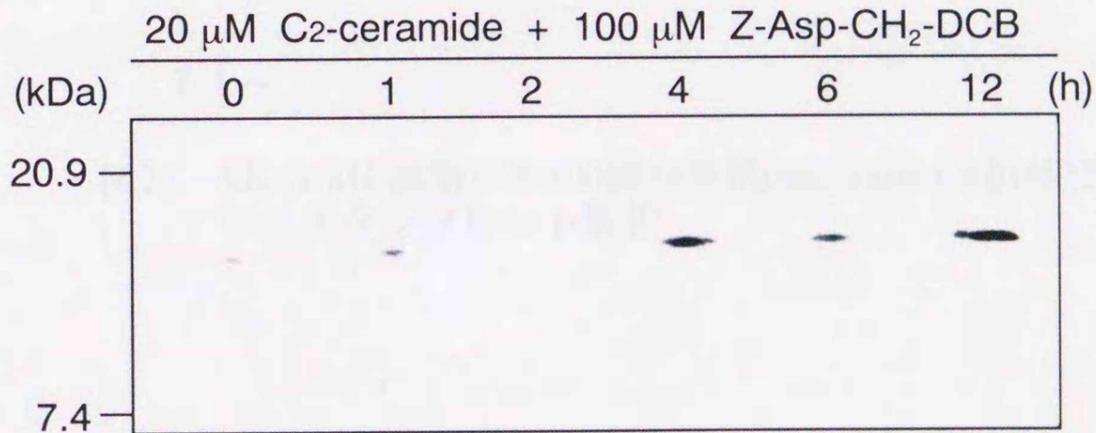


図20 C2-ceramideにより引き起こされるcytochrome cの細胞質への漏出に対するZ-Asp-CH₂-DCBの効果

3-2-2 cytochrome cによるcaspase-2およびcaspase-3の活性化

現在、cytochrome cがcaspase-3を活性化することが報告されているが⁵⁹⁾、caspase-2を含む他のcaspaseサブタイプを活性化するか否かは不明である。そこで、cytochrome cがcaspase-2を活性化するか否かを、SK-N-MC細胞のS100画分を用いて、in vitroの系で検討した。まず最初に、S100画分およびS-100 (-cyt c) 画分が正しく調製されているか否か調べるため、抗cytochrome c抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討した。その結果、S100画分においてcytochrome cの存在が確認された。一方、免疫沈降法によりS100画分からcytochrome cを除去したS-100 (-cyt c) 画分においてはcytochrome cのバンドは検出されなかったことから、S100画分およびS-100 (-cyt c) 画分が正しく調製されていることが確認された(図21)。また、S-100 (-cyt c) 画分に馬心臓から精製したcytochrome c標品を0.2 μ g加えたサンプルにおいてcytochrome cのバンドが検出された(図21)。

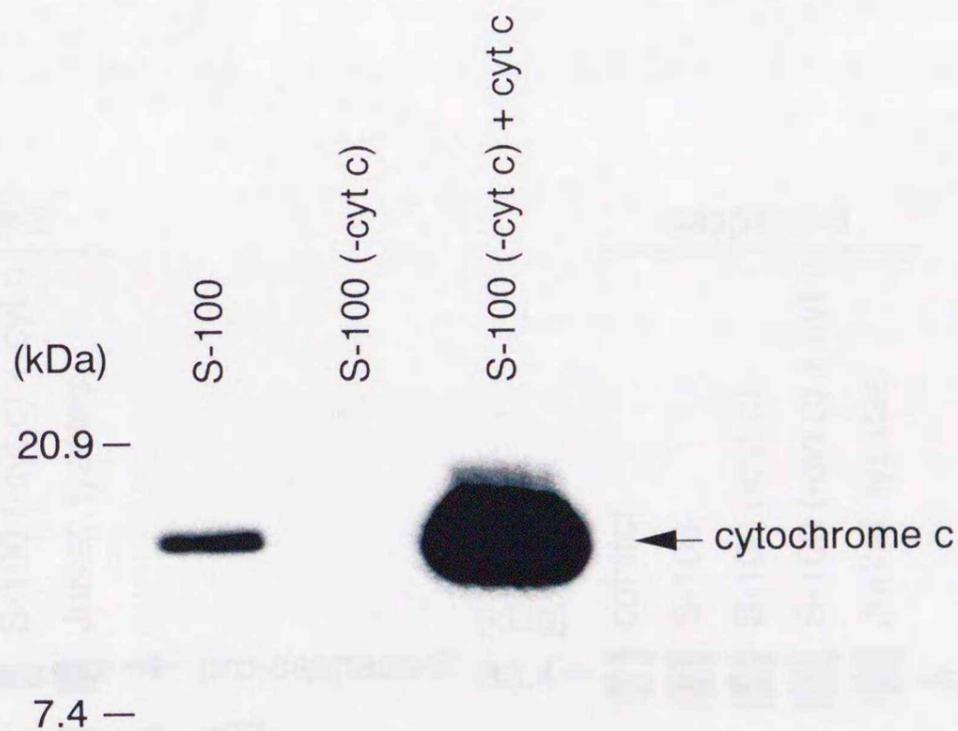


図21 SK-N-MC細胞のS-100画分を抗cytochrome c抗体でウエスタンブロット解析

この三つの画分を用いて、*in vitro*においてcytochrome cがcaspase-2を活性化するか否かを検討した。その結果、S100画分とともにインキュベートしたサンプルにおいて、³⁵S-caspase-2の前駆体がプロセッシングされて生じたと推定される33 kDaのバンドと、14 kDaのバンドが検出された。一方、S100画分からcytochrome cを除去したS100 (-cyt c) 画分においては、この二つのバンドは検出されなかった(図22)。さらに、S100 (-cyt c) 画分に、cytochrome c標品を0.2 μg加えたサンプルでは、再びこの二つのバンドが検出された(図22)。以上の結果から、*in vitro*において、cytochrome cにより活性化されるシグナルはcaspase-2の前駆体を切断すること、すなわち、caspase-2を活性化することが示唆された。また、caspase-3についても同様に行ったところ、S100画分とともにインキュベートしたサンプルにおいて、³⁵S-caspase-3の前駆体がプロセッシングされて生じたと推定される11 kDaのバンドが検出された(図22)。一方、S100 (-cyt c) 画分において、11 kDaのバンドは消失した(図22)。S100 (-cyt c) 画分にcytochrome c標品を0.2 μg加えたサンプルで、再びこの11 kDaのバンドが検出された(図22)。以上の結果より、*in vitro*において、cytochrome cはcaspase-3を活性化することが示唆された。

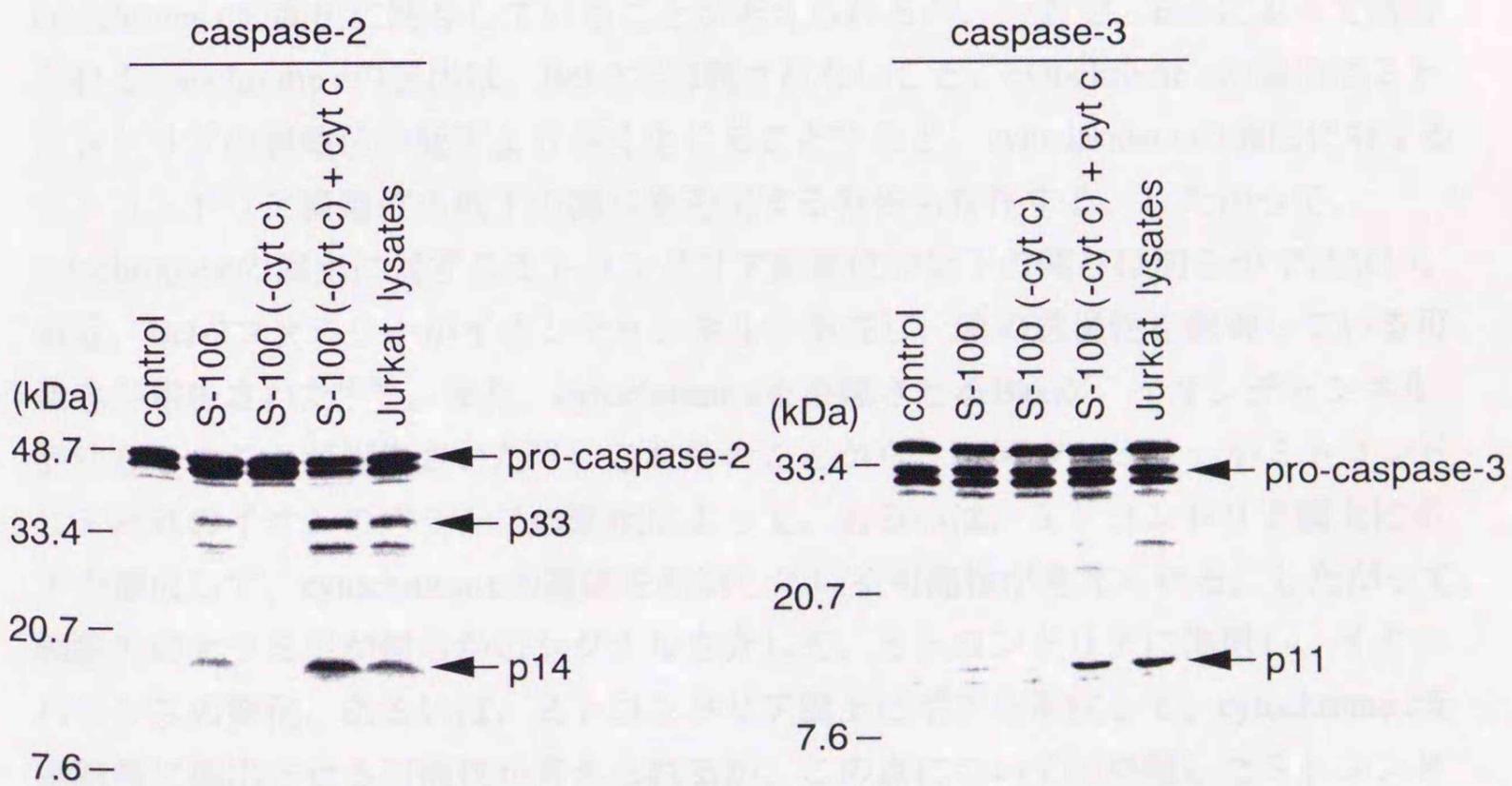


図22 caspase-2、-3の切断に対するcytochrome cの効果

3-3 考察

C2セラミド処理によりミトコンドリアタンパク質であるcytochrome cが細胞質に漏出するか否かを検討した。その結果、C2セラミド4時間処理後から細胞質への漏出が観察された。C2セラミドによるcaspase-2および-3の活性化は、C2セラミド処理後、4~6時間後から引き起こされることを第2章で示した。また、caspaseの非選択的阻害薬であるZ-Asp-CH₂-DCBは、cytochrome cの細胞質への漏出を抑制出来なかった。以上のことから、cytochrome cの細胞質への漏出は、あらゆるcaspaseの活性化に先行して起こることが示唆された。

しかしながら、cytochrome cがどのような機序でミトコンドリアから遊離されるのか明らかではない。ミトコンドリアタンパク質で、電子伝達系の構成因子であるcytochrome c oxidase subunit IIは、スタウスロポリンなどのcytochrome cを漏出させる刺激によって、細胞質へ遊離はしない⁶¹⁾。このことから、cytochrome cの細胞質への漏出は、ある程度の特異性があるように思われる。アポトーシスの誘導の初期の段階でミトコンドリアの膜電位が低下し、Bcl-2がそれを抑制することが報告されている⁶⁴⁻⁶⁶⁾。さらに、Bcl-2はcytochrome cの細胞質への漏出を抑制することも報告されている^{60, 61)}。また、ミトコンドリアタンパク質であり、単独でcaspaseを活性化するAIF (apoptosis-inducing factor) は、ミトコンドリア膜電位の損失にともなって遊離することが知られている⁶⁷⁾。これらのことから、ミトコンドリアの膜電位の低下がcytochrome cの漏出に関与していることが考えられるが、一方で、Baxによって誘導されるcytochrome cの漏出は、Bcl-2で抑制されないこと、cytochrome cの漏出はミトコンドリアの膜電位の低下より早く生じること⁶⁰⁾など、cytochrome cの漏出に対するミトコンドリア膜電位の低下の関与を否定する報告も存在する。したがって、cytochrome cの漏出に対するミトコンドリア膜電位の低下の関与は明らかではない。最近、Bcl-2ファミリーがイオンチャンネルを形成し、膜の透過性を制御している可能性が報告された⁶⁸⁻⁷⁰⁾。また、cytochrome cを遊離させるBaxが、イオンチャンネル活性をもつことが報告された⁷¹⁾。これらのことから、Bcl-2ファミリーがミトコンドリア内外のイオンのバランスの変化によって、あるいは、ミトコンドリア膜上にポアを形成して、cytochrome cの遊離を制御している可能性が考えられる。したがって、細胞内のセラミドが何らかのシグナルを介して、ミトコンドリアに作用し、イオンバランスの変化、あるいは、ミトコンドリア膜上にポアを形成して、cytochrome cを細胞質に漏出させる可能性が考えられるが、この点については単離したミトコンドリアを用いて、セラミド添加のこれらの影響を調べるなどさらなる検討が必要である。

現在までに、in vitroでcytochrome cがcaspase-3を活性化することは報告されているが⁵⁹⁾、caspase-2を活性化するか否かは未だ明らかではない。そこで、SK-N-MC細胞のS-100画分を用いて検討したところ、in vitroにおいてcytochrome cはcaspase-3と同様に、caspase-2を活性化することを初めて見いだした。しかしながら、cytochrome cがどのような機序でcaspase-2を活性化するのは明らかではない。最近、cytochrome cによるcaspase-3の活性化機構が報告された⁷²⁾。細胞質へ遊離したcytochrome cは、線虫のCed-4のヒトのホモログとして同定されたApaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)⁷³⁾と結合し、このcytochrome c、Apaf-1複合体がcaspase-9と結合することにより、caspase-9が活性化され、下流のcaspase-3を活性化するというものである。また、cytochrome c、Apaf-1複合体とcaspase-9の結合には、dATPが必要である。第2章のcaspase-2および-3のウエスタンブロット解析の結果は、caspase-2とcaspase-3の活性化が独立して起こっていること、すなわち、caspase-3がcaspase-2を活性化するのではないことを示唆しており、したがって、cytochrome cによるcaspase-2の活性化機構として、次のような機構が考えられる。細胞質へ遊離したcytochrome cはdATPとともにApaf-1と結合し、caspase-9を活性化し、活性化されたcaspase-9が直接、あるいは、他のcaspaseを介してcaspase-2を活性化するという機構である。一方、Apaf-1とcaspase-9の結合は各々のN末端に存在するCARD (caspase recruitment domain) と呼ばれる領域で結合することが知られている⁷²⁾。N末端にCARDをもつcaspaseは、caspase-9の他に、caspase-1、-2、-4、-5が存在し、Apaf-1がcaspase-9の他に、他のCARDをもつcaspaseと結合する可能性も考えられる。SK-N-MC細胞において、caspase-9とcaspase-2の両方とも存在していることをRT-PCR法により明らかにしたが、PCRサイクルの違いから、caspase-2の方が、caspase-9よりも多く発現していると思われる。したがって、cytochrome cがApaf-1とともに、直接caspase-2と結合し、活性化する可能性も十分に考えられる。今後、Apaf-1とcaspase-2が結合出来るか否か、セラミド刺激によりcytochrome c、Apaf-1、caspase-2の複合体が形成されるのか否かを検討する必要がある。

第4章 ICH-1S結合タンパク質の単離

小緒

caspase-2 (Ich-1) は、マウスの神経系の発生初期に発現する遺伝子としてクローニングされたNedd2 (neuronal precursor cell-expressed, developmentally down-regulated [genes])^{74, 75)} cDNAをプローブとして、ヒト胎仔脳cDNAライブラリーよりクローニングされた¹²⁾。Ich-1は胎児期の各組織で発現が認められるが、とくに神経細胞死が亢進している胎児期の脳での発現が顕著であることから、神経細胞のアポトーシスに深く関与していると推定されるが、詳細はほとんど不明である。Ich-1はスプライシングの違いにより2種類のmRNAが合成され、一方は435アミノ酸から成るタンパク質 (ICH-1L)、他方は312アミノ酸から成るタンパク質 (ICH-1S) をコードする (図23)。ICH-1Lは他のcaspaseと同様に、過剰発現によりアポトーシスを誘導する¹²⁾。一方、ICH-1Sの高発現はIch-1Lを発現しているRat-1細胞の血清除去によるアポトーシスを抑制することから¹²⁾、ICH-1は細胞の生死を、その異なるスプライシングによる二つの産物を介して制御する因子であると推測される。しかしながら、その基質、活性化調節機構および、ICH-1Sの細胞死抑制機構など、ICH-1の生理的役割の詳細については不明な点が多く残されている。そこでまず、ICH-1Lに対する調節因子の解明をyeast two-hybrid systemを用いて試みたが、酵母における本遺伝子の強制発現は細胞死を惹起するために解析不可能であった。そこでつぎに、ICH-1Sと相互作用するタンパク質の単離をyeast two-hybrid systemを用いて試みた。

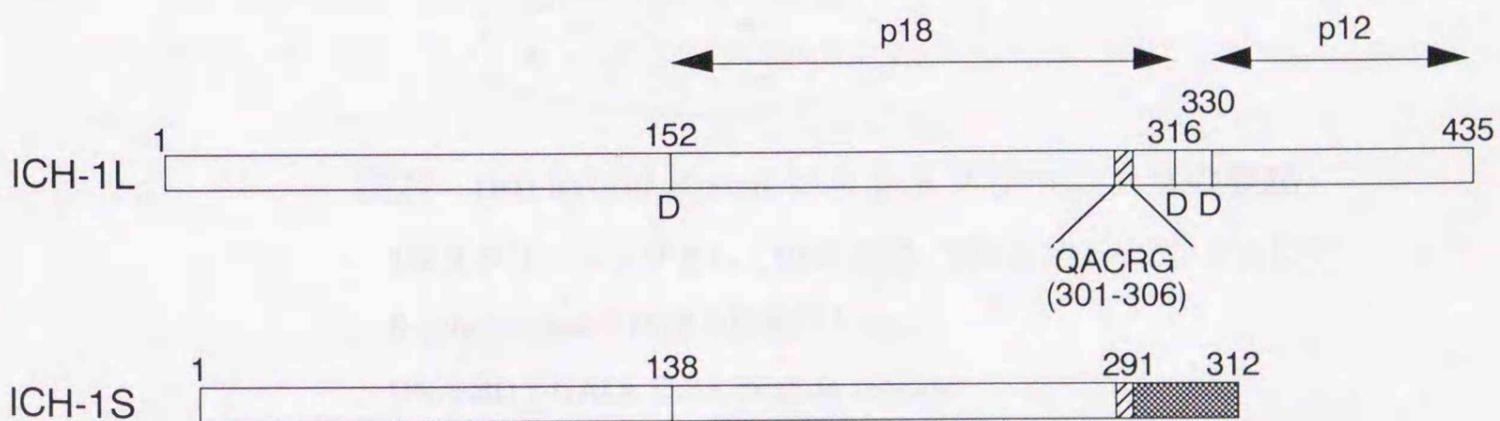


図23 ICH-1LおよびICH-1Sの構造

図中に、caspaseの活性部位であるQACRGアミノ酸配列 (▨)、ICH-1Sに特異的なアミノ酸配列 (■)、予想されるICH-1Lのプロセッシング部位 (D) を示した。

4-1 実験方法

two-hybrid systemによるスクリーニングはClontech社のMATCHMAKER Two-hybrid system 2を用いて添付のプロトコールに従って行った。またその概要を図24に示した。

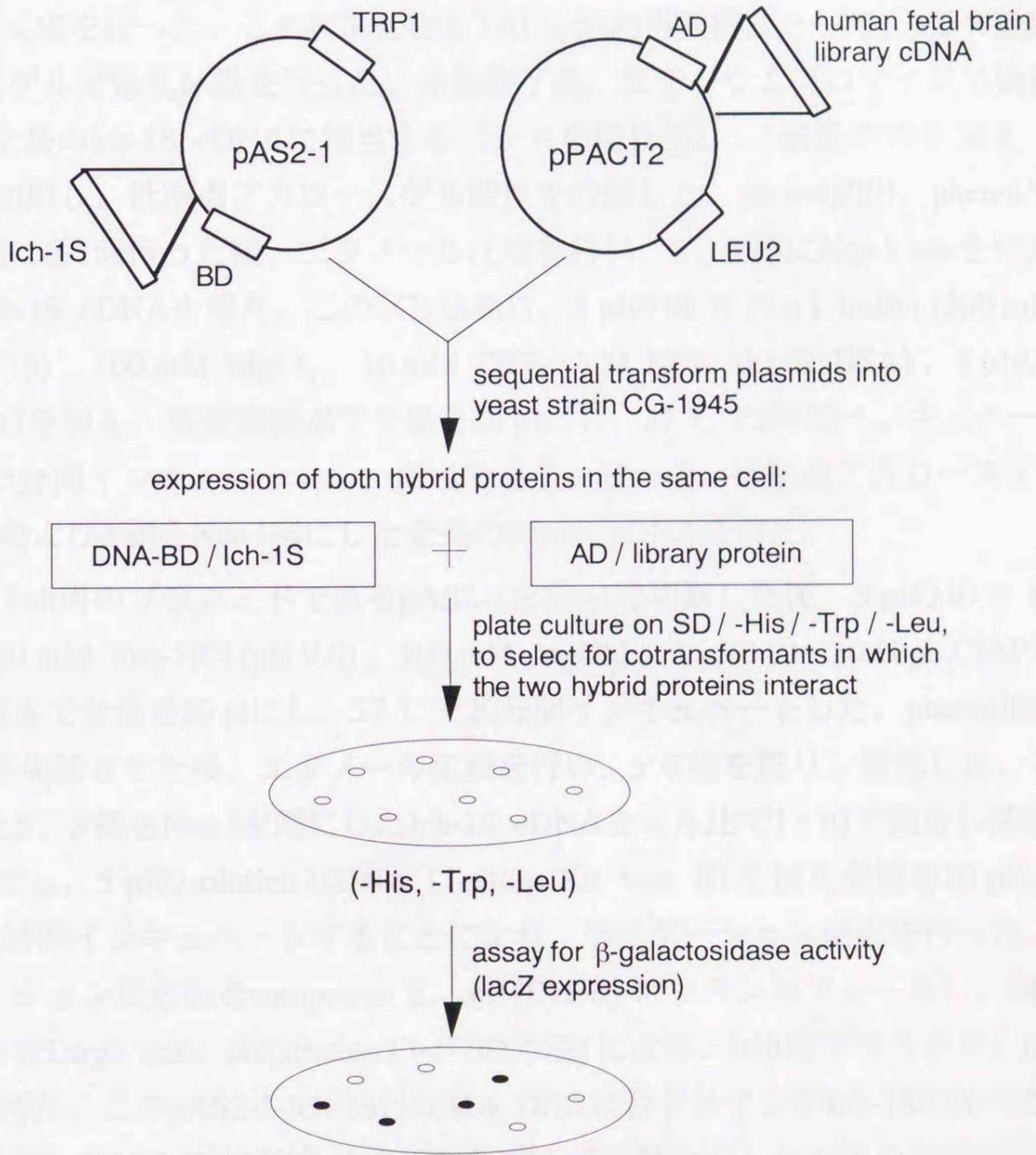


図24 two-hybrid systemによるスクリーニングの概略

1次スクリーニングとしてHisの発現、2次スクリーニングとしてβ-galactosidaseの活性を指標にした。

DNA-BD : GAL4 DNA-binding domain

AD : GAL4 activation domain

● : β-gal-positive colonies are candidates for interaction of the two hybrid proteins.

○ : β-gal-negative colonies are false positives.

4-1-1 bait用プラスミドの構築

Ich-1Sの全長を含むプラスミド (pBactH30Z1) 1 ngに、2 μ lの10 \times Expand HF buffer (15 mM $MgCl_2$ を含む)、3.2 μ lのdNTPs (各3.2 mM)、0.2 μ lのsenseおよびantisenseプライマー (20 μ M)、0.2 μ lのhigh fidelity PCR system酵素ミックス (3.5 U/ μ l)を加え、滅菌精製水で全量を20 μ lにし、ミネラルオイルを重層した。Astec Program Temp Control System PC-800を用いて、この反応液を94 $^{\circ}C$ で2分間熱変性を行い、それ以降、94 $^{\circ}C$ で1分間、60 $^{\circ}C$ で1分間、72 $^{\circ}C$ で1分間のサイクルを30回を行い、PCR反応を行った。このPCR産物をTAEを泳動用緩衝液として、1.2%低融点アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイドで染色し、UV下で全長のIch-1S cDNAに相当するバンドを切り出し、5倍量のTEを加え、60 $^{\circ}C$ で5分間加熱し、低融点アガロースゲル断片を溶解した。phenol抽出、phenol/ $CHCl_3$ 抽出の順に各1回行った後、エタノール沈殿を行い、5'、3'側にNco I siteを付加した全長のIch-1S cDNAを得た。このPCR産物に、2 μ lの10 \times Nco I buffer (500 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM $MgCl_2$ 、10 mM DTT、1 M KCl、0.1% BSA)、1 μ lの4~12 U/ μ l Nco Iを加え、滅菌精製水で全量を20 μ lにし、37 $^{\circ}C$ で2時間インキュベートした。65 $^{\circ}C$ で15分間インキュベートし、反応を終了させた後、低融点アガロースゲルで精製し、5'および3'側をNco I端にした全長のIch-1S cDNAを得た。

一方、bait用のプラスミドであるpAS2-1をNco Iで切断した後、5 μ lの10 \times CIAP buffer (500 mM Tris-HCl (pH 9.0)、100 mM $MgCl_2$)、1 μ lの10~30 U/ μ l CIAPを加え、滅菌精製水で全量を50 μ lにし、37 $^{\circ}C$ で30分間インキュベートした。phenol抽出を行いCIAPを失活させた後、エタノール沈殿を行い、5'末端を脱リン酸化した。このpAS2-1と5'、3'側をNco I末端にしたIch-1S cDNAをモル比で1:10で混合し滅菌精製水で5 μ lにし、5 μ lのsolution I (DNA Ligation Kit Ver. II)を加え全量を10 μ lにし、16 $^{\circ}C$ で1時間インキュベートすることにより、ライゲーション反応を行った。このライゲーション反応液をcompetent *E. coli* (DH5 α)にトランスフォームし、得られたクローンをLarge scale preparation (3-1-7の方法)により、bait用プラスミド、pAS2-1-Ich-1Sを得た。このpAS2-1-Ich-1SはGAL4 DNA結合ドメインがIch-1SのN末端でつながっており、GAL4 DNA結合ドメインとICH-1Sの融合タンパク質を発現することを確認した。

4-1-2 ヒト胎児脳cDNA libraryの増幅

宿主である*E. coli* (DH5 α)株にトランスフォームされた状態のヒト胎児脳MATCHMAKER cDNA library菌液1 μ lを、最終濃度50 μ g/mlのアンピシリンを含む直径15 cmのLB/ampicilin plate 120枚に接種した。30 $^{\circ}C$ で一晩インキュベートした後、プレート上に現れたすべてのコロニーを摂取し、2 LのLB Broth (50 μ g/ml ampicilin

を含む)に移して30℃で6時間振とう培養した。3-1-7の方法に準じてプラスミドを精製し、libraryプラスミドを得た。

4-1-3 pAS2-1-Ich-1Sの酵母細胞株CG-1945への導入

bait発現ベクターpAS2-1-Ich-1Sの酵母細胞株CG-1945への導入は酢酸リチウム法^{76, 77)}により行った。YPD plate (2% difco peptone, 1% bacto yeast extract, 1.8% bacto agar, 2% glucose)上に生えた酵母細胞株CG-1945のコロニーを、50 mlのYPD培養液(2% difco peptone, 1% bacto yeast extract, 2% glucose)に接種して、30℃でOD₆₀₀ = 1.2~1.8になるまで前培養した。この前培養液にYPD培養液を加えて300 mlとし、さらに3時間培養した。遠心して酵母細胞を回収した後、1.5 mlのTE/LiAc溶液(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 100 mM LiAc)に懸濁し、このうち100 µlに、100 ngのpAS2-1-Ich-1S、100 µgのssDNA、600 µlのPEG/LiAc溶液(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, 40% PEG 6000)を加え、30℃で30分間振とう培養した。70 µlのDMSOを加え、42℃で15分間インキュベートした後、氷中に3分間静置した。18,000 × g, 5 sec遠心し、沈殿を1 mlのTEで洗浄した後、500 µlのTEに懸濁し、そのうち100 µlをTrp⁻ SD plate上にまき、30℃で2~3日間インキュベートし、トランスフォーマントを得た。得られたトランスフォーマントCG-1945 (bd/Ich-1S)は単独で、レポーターであるHis 3遺伝子産物(imidazoleglycerophosphate dehydrogenase)と、β-ガラクトシターゼのどちらのレポーター活性も検出不可能であることを確認した。

4-1-4 ヒト胎児脳cDNA libraryのCG-1945 (bd/Ich-1S) への導入

Trp⁻ SD plate上に生育したCG-1945 (bd/Ich-1S)のコロニーを、50 mlのTrp⁻ SD培養液に接種して、30℃でOD₆₀₀ = 1.2~1.8になるまで前培養した。この前培養液にTrp⁻ SD培養液を加えて300 mlとし、さらに3時間培養した。遠心して酵母細胞を回収した後、1.5 mlのTE/LiAc溶液に懸濁し、そのうち1 mlに、50 µgのヒト胎児脳cDNA library、2 mgのssDNA、6 mlのPEG/LiAc溶液を加え、30℃で30分間振とう培養した。700 µlのDMSOを加え、42℃で15分間インキュベートした後、氷中に3分間静置した。遠心し、沈殿を10 mlのTEで洗浄した後、10 mlのTrp⁻ Leu⁻ His⁻ SD培養液に懸濁し、30℃で6~12時間振とう培養した。その培養液を直径15 cmのTrp⁻ Leu⁻ His⁻ SD plate 10枚にまき、30℃で10日間インキュベートし、His 3レポーター遺伝子の発現を指標にして、Ich-1Sと相互作用するヒト胎児脳cDNA libraryをもつクローンをスクリーニングした。

4-1-5 β -ガラクトシターゼアッセイ (CG-1945)

His 3陽性クローンをTrp⁻ Leu⁻ His⁻ SD plate上のナイロンメンブレン上へ線状接種した後、30℃で2日間インキュベートした。そのナイロンメンブレンを液体窒素に浸し凍結させた後、室温で溶解、乾燥させ、0.27%の2-メルカプトエタノールおよび β -ガラクトシターゼの基質であるX-Gal 334 μ g/mlを含むZ buffer (60 mM Na₂HPO₄, 39.9 mM NaH₂PO₄, 10.1 mM KCl, 1.0 mM MgSO₄)を浸透させたろ紙に重ね、30℃でインキュベートした。経時的に観察して、コロニーが青色になったものを陽性とした。

4-1-6 His 3陽性、 β -ガラクトシターゼ陽性酵母細胞からlibrary由来cDNAの増幅

スクリーニングにより得られたHis 3陽性、 β -ガラクトシターゼ陽性のコロニーを爪楊枝でかき取り、10 μ lのzymolyase溶液 (265 mU/ml zymolyase, 1.2 mM solbitol, 100 mM Na₂HPO₄)に懸濁し、37℃で5分間インキュベートした。そのzymolyase溶液を鋳型にして、prey用のベクターであるpACT2のマルチクローニングサイトの両端を認識するプライマーを用いて、PCR法によりlibrary由来cDNAを増幅した。1 μ lのzymolyase溶液に、2 μ lの10 \times PCR buffer (15 mM MgCl₂を含む)、1.2 μ lの25 mM MgCl₂、3.2 μ lのdNTPs (各1.25 mM)、0.2 μ lのsenseおよびantisenseプライマー (20 μ M)、0.2 μ lのampliTaq PCR polymerase (5 U/ μ l)を加え、滅菌精製水で全量を20 μ lにし、ミネラルオイルを重層した。この反応液を94℃で3分間熱変性を行い、それ以降、94℃で1分間、56℃で1分間、72℃で3分間もサイクルを30回を行い、library由来cDNAを増幅した。

4-1-7 塩基配列の決定

4-1-6より得られたPCR産物を1%の低融点アガロースゲルで電気泳動し、精製した後、EcoRI、XhoIで消化し、pACT2のEcoRI、XhoIサイトへサブクローニングした。pACT2のマルチクローニングサイトの両端を認識するプライマーを用いて、3-1-9の方法に準じて塩基配列を決定した。

4-1-8 pACT2-ISBPおよびpACT2-CnBの作製

Jurkat細胞のtotal RNAから2-1-4の方法に準じてRT-PCR法により5'末端にEcoRI、3'末端にXhoIサイトをもつ全長のISBP cDNA、5'末端にBamHI、3'末端にXhoIサイトをもつ全長のCnB cDNAを作製し、pACT2のEcoRI、XhoIあるいはBamHI、XhoIサイトへサブクローニングし、pACT2-ISBPおよびpACT2-CnBを得た。

4-1-9 β -ガラクトシターゼアッセイ (Y187)

200 ngのpAS2-1由来プラスミドと、100 ngのpACT[™]由来プラスミドを4-1-3の方法に準じて酵母細胞株Y187にトランスフォームし、ナイロンメンブレンを上にしたTrp⁻ Leu⁻ SD plateにまき、30 °Cで2~3日間インキュベートし、ナイロンメンブレン上に、pAS2-1由来プラスミドと、pACT[™]由来プラスミドの両方を発現している酵母細胞を成育させた。その後、4-1-5の方法に準じて β -ガラクトシターゼアッセイを行った。

4-1-10 ノーザンブロット法

(1) プローブの標識法

プローブに用いる全長のISBP cDNA 100 ngを100 °Cで3分間処理後急冷し、Random Primer DNA Labeling Kit Ver IIを用いて、random primerとdNTP混合溶液、1.85 MBq [α -³²P] dCTP、klenow酵素を加え、滅菌精製水で全量を20 μ lにし、37 °Cで30分間インキュベートした。65 °Cで15分間加熱後、Sephadex G-50カラムを充填したスピンカラムにて未反応の[α -³²P] dCTPを除去した。得られたプローブの放射活性を測定し、ハイブリダイゼーションに用いる量を算出した。

(2) ノーザンブロット解析

ノーザンブロット解析はHuman Multiple Tissue Northern Blotを用いて行った。membraneをexpressHyb hybridization solution中で68 °C、30分間インキュベートし、プレハイブリダイゼーションを行った。つぎに、 1×10^6 cpm/mlになるようにプローブを加えたexpressHyb hybridization solution中で68 °C、1時間インキュベートすることによりハイブリダイゼーションを行った。その後、0.05 % SDSを含む $2 \times$ SSC (0.3 M sodium citrate、3 M NaCl) 溶液中で、室温で10分間インキュベートすることにより洗浄し、この洗浄操作を4回行った。さらに、0.1 % SDSを含む $0.1 \times$ SSC溶液中で、50 °C、20分間を2回インキュベートすることにより洗浄し、非特異的なRIの吸着をできるだけ除去した。洗浄後、オートラジオグラフィーにより解析した。

4-1-11 COS-7細胞の蛍光標識法

(1) pCR3.1-ISBP-T7の作製

4-1-8により作製したpACT2-ISBP 1 ngを鋳型にし、T7 tagをコードする配列をsense primerの5'に付加したプライマーを用いてPCRを行い、5'末端にT配列をもつ全長のISBP cDNAを得た。PCRは、96 °Cで2分間熱変性させた後、96 °Cで1分、60 °C

で1分、72℃で1分のサイクルを25回行った。得られたPCR産物をEukaryotic TA Cloning Kitを用いて、pCR3.1にサブクローニングし、pCR3.1-ISBP-T7を得た。

(2) COS-7細胞の培養

COS-7細胞は10% FCS (56℃、30分間非働化処理) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) において95% air-5% CO₂、37℃の条件下で培養した。

(3) COS-7細胞へのトランスフェクション

COS-7細胞へのトランスフェクションはDEAE-dextran法により行った。カバーグラスを入れた6 cm dishに培養24時間後に約50%コンフルエントになるようにCOS-7細胞を培養した。24時間後、メディウムを除去し、5 mlのPBSを加え、室温で15分間静置後、PBSを除き、2 mlのPBSで希釈した1 mg/ml DEAE-dextran溶液を加え、室温で9分間静置した。その後、5 mlのPBSで2回洗浄し、5 µgのpCR3.1-ISBP-T7を含む325 µlのPBSを加え、37℃で30分間インキュベートした。80 µM chloroquineを含むメディウムに置換し、37℃で4時間インキュベート後、通常メディウムに換え、37℃で48時間インキュベートした。

(4) COS-7細胞の蛍光標識法

プラスミドをトランスフェクトしてから48時間後のカバーグラス上のCOS-7細胞を3.5 cm dishに移し、5 mlのPBSで洗浄した後、1 mlの5%ホルムアルデヒドで10分間固定した。つぎに、0.1%のTritonを含むPBSに置換し、5分間静置し、抗体の膜透過性を高めた。PBSで2回洗浄した後、blocking buffer (5% goat serumを含むPBS) で10分間インキュベートすることでブロッキングを行った後、抗T7抗体 (blocking bufferで250倍希釈) を500 µl加え、室温で1時間反応させた。PBSで10分間放置を3回繰り返して洗浄後、FITCラベルされた2次抗体 (抗マウスIgG-FITC標識抗体、PBSで500倍希釈) を500 µl加え、室温で1時間反応させた。再びPBSで10分間放置を3回繰り返して洗浄後、0.5 µg/mlのHoechst33258 500 µlで1分間処理することにより、細胞の核を染色した。PBSで1回洗浄後、90%グリセロールでスライドグラスに封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。

4-1-12 GST融合タンパク質の精製

全長のISBP cDNAあるいはIch-1S cDNAのEcoR I断片を、GST融合タンパク質発現ベクターであるpGEX6P-2のEcoR Iサイトに挿入し、E. coli. BL21へトランスフォームし、LB/ampicilin plateにまいた。同様に、pGEX6P-2のみもE. coli. BL21へ

トランスフォームした。LB/ampicilin plate上に生えたコロニーを、10 mlのLB Brothに、10 μ lのampicilinを加えた培養液に接種して37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養した。その培養菌液5 mlに500 mlのLB/ampicilin mediumを加え、30 $^{\circ}$ Cで培養し、菌液の600 nmの吸光度が約0.8になったとき、IPTGを最終濃度0.1 mMになるように加え、さらに4時間培養を続けた。培養液を4 $^{\circ}$ C、4,000 \times g、10分間遠心し、沈殿を20 mlの氷冷PBSで懸濁し、超音波粉碎後、1 mlの20 % Triton X-100を加え、氷水中に時々攪拌しながら30分間放置した。4 $^{\circ}$ C、12,000 \times g、10分間遠心し、上清をglutathione-Sepharose 4B 2 mlを充填したカラムに添加した。20 mlのPBSで2回カラムを洗浄後、2mlの elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM glutathione) を添加し、10分間静置した。その後、約200 μ lずつ分注しながら抽出し、その各抽出画分のタンパク質を定量し、タンパク質量の多い画分を精製タンパク質画分とした。その後、3 LのPBSで透析し、GST-ISBP、GST-ICH-1S、GSTタンパク質を得た。

GST-ISBPについてはPreScission proteaseを用いて、GSTとISBPを切り離し、ISBPタンパク質を得た。1.8 mgのGST-ISBPを100 μ lの50 % glutathione-Sepharose 4Bと混合し、PBSで全量を1 mlとし、4 $^{\circ}$ Cで1時間回転させながらインキュベートした。遠心し、沈殿を1 mlのPBSで3回洗浄した後、200 μ lのcleavage buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT) に懸濁し、10 μ lの2 U/l PreScission proteaseを加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩回転させながらインキュベートした後、遠心し、その上清をISBPタンパク質とした。

4-1-13 in vitro translationによる 35 S-methionineラベルcaspase-2およびISBPの精製

35 S-methionineラベルcaspase-2およびISBPの精製は、TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systemを用いて、3-1-10の方法に従って行った。

4-1-14 35 S-ISBPとGST-ICH-1Sのin vitro結合実験

4 μ gのGSTあるいはGST-ICH-1Sを5 μ lの 35 S-methionineラベルISBPと混合し、NETN buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.01 % NP-40、0.1 % BSA) で全量を200 μ lとした。4 $^{\circ}$ Cで2時間回転させながら、インキュベートした後、20 μ lの50 %の glutathione-Sepharose 4Bを加え、4 $^{\circ}$ Cで2時間回転させながら、インキュベートした。遠心し、沈殿を500 μ lのNETN bufferで5回洗浄した後、25 μ lのLaemmi bufferを加え、5分間煮沸し、遠心後、上清をSDS-PAGEに用いた。泳動終了後、ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色後、脱染し、乾燥させた後、BAS 2000を用いて解析した。

4-1-15 QIAfilter Plasmid Midi Kitを用いたプラスミドの精製

1 mlのLB/Amp mediumに大腸菌を接種し、37℃で一晩振とう培養した。その培養菌液25 µlに25 mlのLB/Amp mediumを加え、37℃で12~16時間振とう培養した。培養液を4℃、6,000 × g、10分間遠心し、沈殿を4 mlのbuffer P1 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、100 µg/ml RNase A) に懸濁し、4 mlのbuffer P2 (200 mM NaOH、1% SDS) を加え穏やかに混和した後、室温で5分間静置した。4 mlの氷冷したbuffer 3 (3 M potassium acetate (pH 5.5)) を加え、混和した後、QIAfilter cartridgeに移し、室温で10分間静置した。plungerでlysateをQIAgen-tipに移した後、10 mlのbuffer QC (50 mM MOPS (pH 7.0)、1 M NaCl、15% isopropanol) で2回洗浄した。その後、5 mlのbuffer QF (50 mM Tris-HCl (pH 8.5)、1.25 M NaCl、15% isopropanol) でDNAを抽出し、イソプロパノール沈殿を行いプラスミドを精製した。

4-1-16 欠失変異体の作製

ISBPの各種欠失変異体の作製は、PCR法により欠失変異体cDNAを増幅後、pACT2のEcoR I、Xho IあるいはBamH I、Xho Iサイトに挿入して行い、一方、Ich-1S各種欠失変異体の作製は、PCR法により欠失変異体cDNAを増幅後、pAS2-1のNco Iサイトに挿入して行い、QIAfilter Plasmid Midi Kitを用いて、プラスミドDNAを精製した。

4-1-17 Jurkat 100,000 g cell lysateの調製

(1) Jurkat細胞の培養

Jurkat細胞は10% FCS (56℃、30分間非働化処理) を含むRPMI1640において95% air-5% CO₂、37℃の条件下で培養した。

(2) Jurkat 100,000 g cell lysateの調製

1 × 10⁷/mlの細胞密度のJurkat細胞に、最終濃度250 ng/mlになるように抗Fas抗体を加え、各時間培養した。培養後、4℃、2,000 × g、3分間遠心し、細胞を回収し、1 mlの氷冷したRPMI (FCS-) で2回洗浄した。400 µlのextraction buffer (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、50 mM NaCl、2 mM MgCl₂、5 mM EDTA、1 mM DTT、40 mM β-glycerophosphate) に懸濁し、液体窒素で凍結させた後、37℃で温め、溶解させた。この凍結溶解をさらに3回行った後、4℃、12,000 × g、15分間遠心し、その上清を4℃、100,000 × g、1時間遠心し、上清をJurkat 100,000 g cell lysateとした。

4-1-18 In vitro cleavage

1 μ lの³⁵S-methionineラベルcaspase-2あるいはISBPに、50 μ gの抗Fas抗体で各時間処理したJurkat 100,000 g cell lysateを加え、reaction buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM DTT、0.1 mM EDTA) で全量を20 μ lにした。また、必要があれば、5 μ gのISBPをこの反応液の中に加えた。30 $^{\circ}$ Cで各時間インキュベート後、5 μ lの5 \times laemmli buffer (2-1-6参照) を加え、反応を停止させた後、5分間煮沸し、20 μ lをSDS-PAGEに用いた。泳動終了後、ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色後、脱染し、乾燥させた後、BAS 2000を用いて解析した。

4-1-19 プライマーの設定

プライマーの合成は、ホクドー (株) に合成を委託し、以下の通りに設定した。

4-1-1で用いたプライマー

Ich-1S-Nco I (sense) 5'-TATCCATGGCAATGCATCCTCATCATCAG-3'

Ich-1S-Nco I (antisense) 5'-TATCCATGGTAGAGCAAGAGAGGGCGGTG-3'

4-1-6で用いたプライマー

pACT2 (sense) 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCC-3'

pACT2 (antisense) 5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-3'

4-1-8で用いたプライマー

ISBP-EcoR I (sense) 5'-AAGAATTCTAATGGGGGGGCTCGGGCAGT-3'

ISBP-Xho I (antisense) 5'-ATCTCGAGCAGGACAATCTTAAAGGAG-3'

4-1-11で用いたプライマー

ISBP-T7 (sense) 5'-ATGGCTTCTATGACTGGTGGTCAACAAATGGGT
ATGGGGGGGCTCGGGCAGTCG-3'

ISBP-T7 (antisense) 5'-TCACAGGACAATCTTAAAGGAGCT-3'

4-1-16で用いたプライマー

ISBP Δ C113 (sense) 5'-TAAGAATTCCTATGGGGGGGCTCGGGCAGT-3'

ISBP△C113 (antisense)	5'-ATACTCGAGGCGGAAGGCATAATGGGACT-3'
ISBP△C174 (sense)	5'-TAAGAATTCCTATGGGGGGGCTCGGGCAGT-3'
ISBP△C174 (antisense)	5'-ATACTCGAGCTGGAACCTCAGAGAGGTTGA-3'
ISBP△C178 (sense)	5'-TAAGAATTCCTATGGGGGGGCTCGGGCAGT-3'
ISBP△C178 (antisense)	5'-ATACTCGAGCTAGGAGATGACGTGCTGGA-3'
ISBP△C182 (sense)	5'-TAAGAATTCCTATGGGGGGGCTCGGGCAGT-3'
ISBP△C182 (antisense)	5'-ATACTCGAGCTAGTCTGGAGAACGGGAGA-3'
ISBP△C185 (sense)	5'-TAAGAATTCCTATGGGGGGGCTCGGGCAGT-3'
ISBP△C185 (antisense)	5'-TATCTCGAGTTAGCTGGCAAAGTCTGGA-3'
ISBP△C188 (sense)	5'-TAAGAATTCCTATGGGGGGGCTCGGGCAGT-3'
ISBP△C188 (antisense)	5'-TATCTCGAGTTACTTAAAGGAGCTGGCAA-3'
ISBP△N115 (sense)	5'-TATGGATCCTAGACTTTGATGATGACGGA-3'
ISBP△N115 (antisense)	5'-TATCTCGAGTCACAGGACAATCTTAAA-3'
ISBP△N47 (sense)	5'-TATGGATCCTATCACTTCGGGCACAAG-3'
ISBP△N47 (antisense)	5'-TATCTCGAGTCACAGGACAATCTTAAA-3'
ISBP△N18 (sense)	5'-TTAGAATTCACTTGACGTTCTGAC-3'
ISBP△N18 (antisense)	5'-TATCTCGAGTCACAGGACAATCTTAAA-3'
ISBP△N9 (sense)	5'-TATGAATTCTGTCCAAGGAGCTGCTG-3'
ISBP△N9 (antisense)	5'-TATCTCGAGTCACAGGACAATCTTAAA-3'
Ich-1S△C138 (sense)	5'-TATCCATGGCAATGCATCCTCATCATCAG-3'
Ich-1S△C138 (antisense)	5'-TTACCATGGATCTTTATTGTCTAGGGAGT-3'
Ich-1S△C291 (sense)	5'-TATCCATGGCAATGCATCCTCATCATCAG-3'
Ich-1S△C291 (antisense)	5'-TATCCATGGTTATCCACCGCAGGCCTGG-3'
Ich-1S△C301 (sense)	5'-TATCCATGGCAATGCATCCTCATCATCAG-3'
Ich-1S△C301 (antisense)	5'-AGCCCATGGTTACAGAAGGAGGTGCCCAAG-3'
Ich-1S△C138 (sense)	5'-TATCCATGGTTGGTCCTGTCTGCCTTCAG-3'
Ich-1S△C138 (antisense)	5'-TATCCATGGTTATCCACGGCAGGCCTGG-3'

4-1-20 使用薬物

本章で用いた主な試薬の入手先はつぎの通りである。

MATCHMAKER Two-hybrid system 2 (Clontech)、pBactH30Z1 (大阪大学医学部、三

浦正幸博士より恵与)、低融点アガロース (Bio-rad、FMC)、CIAP (NIPPON GENE)、DH5 α (GIBCO BRL)、Human Fetal Brain MATCHMAKER cDNA Library (Clontech)、difco peptone (Difco)、Yeast nitrogen base without amino acid (Difco)、YEASTMAKER Yeast Transformation System (Clontech)、ナイロンメンブレン (Amersham)、X-Gal (和光純薬 (株))、zymolyase (生化学工業 (株))、Random Primer DNA Labeling Kit Ver II (Takara)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (NEN)、Sephadex G-50 (Pharmacia)、Human Multiple Tissue Northern Blot (Clontech)、DMEM (Sigma)、DEAE-dextran (Pharmacia)、chloroquine (Sigma)、goat serum、anti-T7 antibody (Novagen)、anti-mouse IgG (FITC標識) (Organon Teknika)、pGEX6P-2 (Pharmacia)、BL21 (Stratagene)、IPTG (Pharmacia)、glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia)、glutathione (Pharmacia)、PreScission protease (Pharmacia)、QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen)、RPMI1640 (GIBCO BRL)、anti-Fas antibody (MBL)

4-2 実験結果

4-2-1 Two-hybrid systemによるスクリーニング

全長のIch-1S cDNAをGAL4のDNA結合ドメインと融合するように、pAS2-1プラスミドに構築し、一方、GAL4の転写活性化ドメインと融合するように、ヒト胎児脳cDNAライブラリーをpACT2プラスミドに構築した。この二つのプラスミドを、酵母細胞株CG-1945に導入し、Trp⁻ Leu⁻ His⁻ SD plateで培養し、His3レポーター遺伝子を発現するトランスフォーマントの選択を行った。約100万個のトランスフォーマントをスクリーニングした結果、6個のヒスチジン陽性クローンが得られた(表3)。さらに、これら6個のヒスチジン陽性クローンをβ-ガラクトシダーゼ(β-Gal)活性を指標にし、二次スクリーニングした結果、6個ともβ-Gal陽性であり、最終的に6個のHis、β-Gal陽性クローンを得た(表3)。

表3 ライブラリースクリーニングの概略

The number of screening for yeast transformants	1 x 10 ⁶
The number of His positive clones	6
The number of β-gal positive clones	6

ICH-1Sをbaitとしてヒト胎児脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。

4-2-2 His、β-Gal陽性クローンの解析

スクリーニングより得られた6クローンについて、ライブラリー由来のcDNAをPCR法により増幅後、サブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、この6個のクローンは全て同一であった。そこで、このクローンをICH-1S binding protein (ISBP) と命名した。データベース検索を行い、既知の遺伝子との相同性を検討した結果、ISBPはインテグリン細胞内ドメイン結合タンパク質 (CIB : calcium- and integrin-binding protein) として、最近、単離された遺伝子⁷⁸⁾ と同一であることが明らかとなった。ISBPはカルシニューリンBサブユニットと58%、カルモジュリンと56%の相同性をもち、C末端側に二つのEFハンドモチーフをもつ、191個のアミノ酸から成る、約25 kDaの低分子量Ca²⁺ binding proteinであることが分かった⁷⁸⁾ (図25)。

ISBP	MGGSGSRLSK	ELLAEYQDLT	FLTKQEILLA	HRRFCELLPQ	EQRSVSSLR	AQVPFEQILS
CnB		MGNEA	SYPLEMCSHF	DADEIKRLGK	RFKKLDLNS	GSLSVEEFMS
CAM			MADQL	TEEQIAEFKE	AFSLFDKGD	GTITTKELTV
						<u>EF-1</u>
ISBP	LPELKANPFK	ERICRVFSTS	PAKDSLSFED	FLDLLSVFSD	TATPDIKSHY	AFRIFDFDDD
CnB	LPELQQNPLV	QRVIDIFDTD	-GNGEVDFKE	FIEGVSQFSV	KGDKEQKLR	AFRIYDMDKD
CAM	MRS LGQNP EL	QDMINEVDAD	-GNGTIDFPE	FLTMMARKMK	DTDSEEEIRE	AFRVFDKDG N
						<u>EF-2</u>
ISBP	GTL-NREDLSR	LVNCLTGEGE	DTRLSASEMK	QLIDNILEES	DIDRDGTINL	SEFQHVISRS
CnB	GYISNGE-LFQ	-VLKMMV-GN	N--LKDTQLQ	QIVDKTIINA	DKDGDGRISF	EEFCVVGGGL
CAM	GYISAAE-L-R	HVMTNL--GE	K--LTDEEVD	EMI-R---EA	DIDGDGQVNY	EEFVQMMTAK
ISBP	PDFASSFKIV	L				
CnB	-DIHKKM-VV	DV				

図25 ISBPのアミノ酸配列とカルシニューリンBサブユニット、カルモジュリンとの相同性
全長ISBPのアミノ酸配列を示した。カルシニューリンBサブユニットあるいはカルモジュリン
と同一のアミノ酸を網掛け(■)で示した。

CnB : calcineurin B

CAM : calmodulin

つぎに、ICH-1S とISBPの結合特異性を検討するため、yeast two-hybrid systemを用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標にして検討した。ISBPは指示酵母細胞であるY187に、ICH-1Sとともに導入した時のみ、 β -ガラクトシダーゼ活性が認められ、GAL4のDNA結合ドメインのみ、あるいは、核タンパク質であるラミンCとともに導入した時は、 β -ガラクトシダーゼ活性が認められなかった(表4)。また、ISBPと58%の相同性をもつカルシニューリンBとICH-1Sをともに導入した時も、 β -ガラクトシダーゼ活性は認められなかった(表4)。以上の結果よりICH-1S とISBPの結合特異性が示された。

表4 ICH-1SとISBPの結合特異性

DNA-binding hybrid	activation hybrid	interaction
GAL4bd-ICH-1S	GAL4ad-ISBP	+
GAL4bd-ICH-1S	GAL4ad	-
GAL4bd	GAL4ad-ISBP	-
GAL4bd-lamin C	GAL4ad-ISBP	-
GAL4bd-ICH-1S	GAL4ad-CnB	-

ICH-1SとISBPの結合特異性をtwo-hybrid systemを用いて、 β -galactosidaseの活性を指標にして調べた。

GAL4bd : GAL4 DNA-binding domain

GAL4ad : GAL4 transcription activation domain

CnB : calcineurin B

4-2-3 ISBP mRNAの組織分布

ISBP mRNAの組織分布を調べるため、ISBP cDNAをプローブとして用いて、ヒト成人各組織におけるISBP mRNAの発現をノーザンブロット解析により検討した。その結果、調べた全ての組織(心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓)に発現していることが明らかとなった(図26)。同様に、ヒト胎児各組織におけるISBP mRNAの発現を調べた結果、脳、肺、肝臓、腎臓の各組織に発現していることが明らかとなった(図26)。

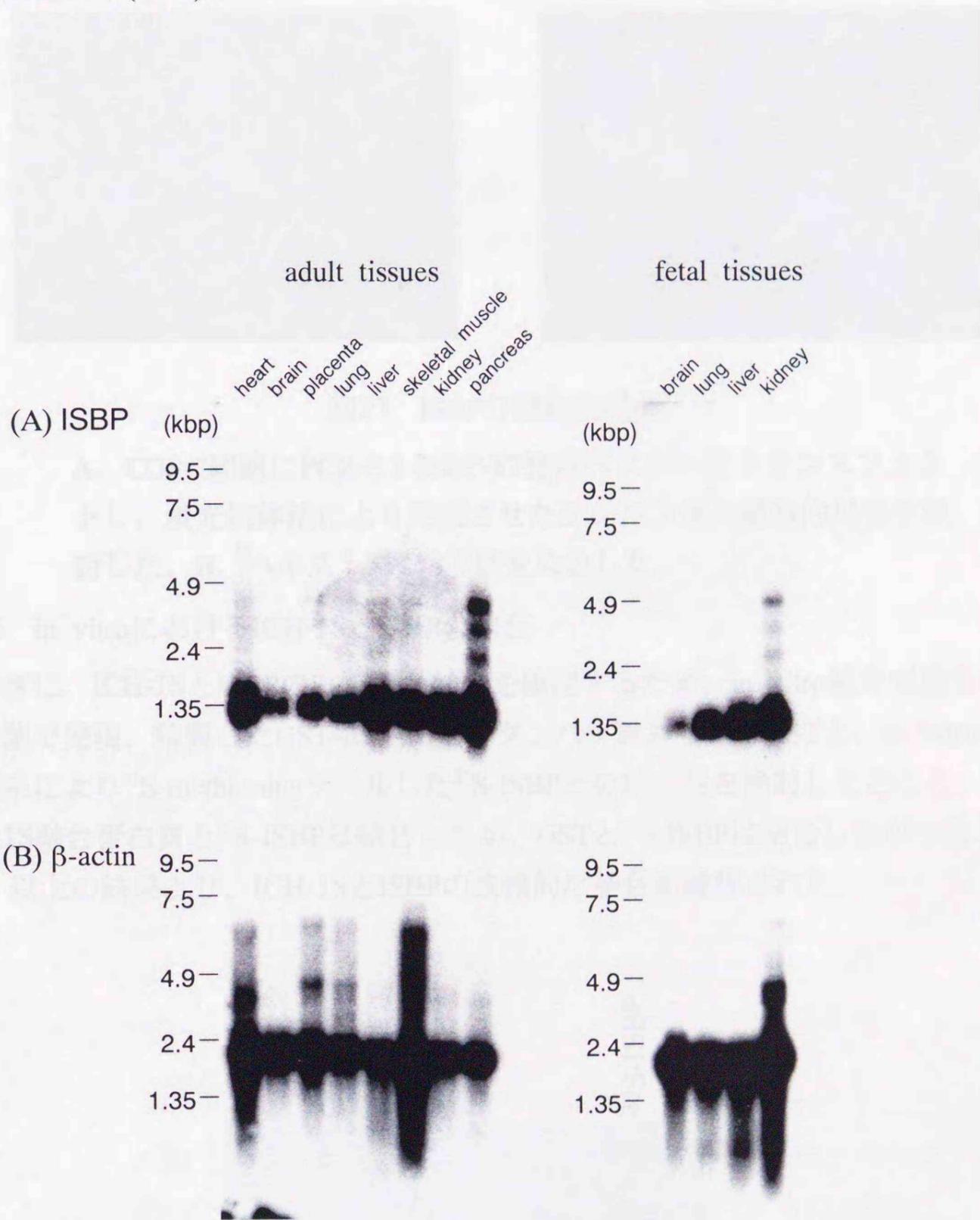


図26 ヒト各組織におけるISBP mRNAの発現

ヒト各組織のmRNA (2 μg mRNA/lane) を用い、放射標識した全長のISBP cDNA (A)、あるいはβ-actin (B) をプローブとして、ノーザンブロット解析を行った。

4-2-4 ISBPの細胞内局在

ISBPの細胞内での局在について検討した。N末端にT7エピトープを付加したISBPをCOS-7細胞に発現させ、抗T7抗体を用いた蛍光抗体法により発現させたタンパク質の細胞内での局在を解析した。また、同時に、ヘキスト33258を用いて核を染色し、核と細胞質の位置を確認した。その結果、ISBPは核、細胞質の両方に存在していることが示された(図27)。

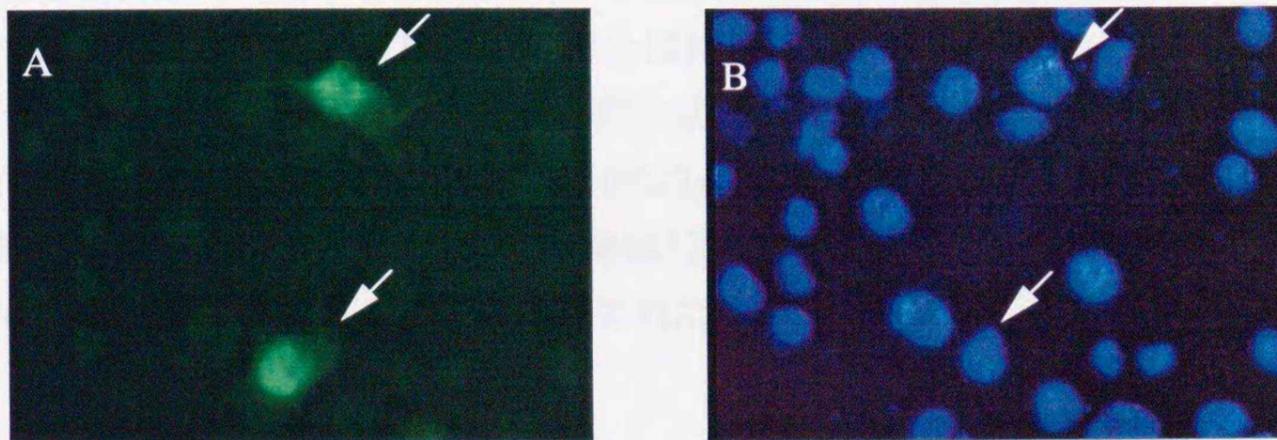


図27 ISBPの細胞内局在

A、COS-7細胞にPCR-3.1-ISBP-T7発現ベクターをトランスフェクトし、蛍光抗体法により発現させたタンパク質の細胞内局在を検討した。B、ヘキスト33258で核を染色した。

4-2-5 in vitroにおけるICH-1SとISBPの結合

つぎに、ICH-1SとISBPの直接的な結合を確認するため、in vitro結合実験を行った。大腸菌で発現、精製したGST-ICH-1S融合タンパク質あるいはGSTと、in vitro転写、翻訳系により³⁵S-methionineラベルした³⁵S-ISBPとの結合性を検討したところ、GST-ICH-1S融合蛋白質と³⁵S-ISBPは結合したが、GSTと³⁵S-ISBPは結合しなかった(図28)。以上の結果より、ICH-1SとISBPの直接的な結合が確認された。



図28 in vitroにおけるGST-ICH-1Sと³⁵S-ISBPの結合

大腸菌で発現、精製したGST、あるいはGST-ICH-1Sと、³⁵Sラベルした³⁵S-ISBPとの結合を検討した。

4-2-6 ISBPとICH-1Sの結合部位

ICH-1SとISBPの結合部位を調べるため、ISBPおよび、Ich-1Sの各種欠失変異体を用いて、yeast two-hybrid systemにより、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標にして解析した。

最初に、ICH-1Sの結合に必要なISBPの領域を調べるため、10種類のISBP欠失変異体を用いて解析した。その結果、ISBPのC末端側を欠損させた変異体とICH-1Sの結合は認められなかった。さらに、ISBPのC末端側3アミノ酸残基を欠損させた欠失変異体 Δ C188においても、ICH-1Sとの結合は見られなかった。一方、N末端18アミノ酸まで欠損させた変異体はICH-1Sとの結合活性が認められたが、N末側47アミノ酸まで欠損させると結合活性は消失した(図29)。以上の結果から、ICH-1SはISBPのC末端側に結合すること、とくに、C末端側3アミノ酸および、N末端18から47アミノ酸の間が結合に必要であることが示唆された。

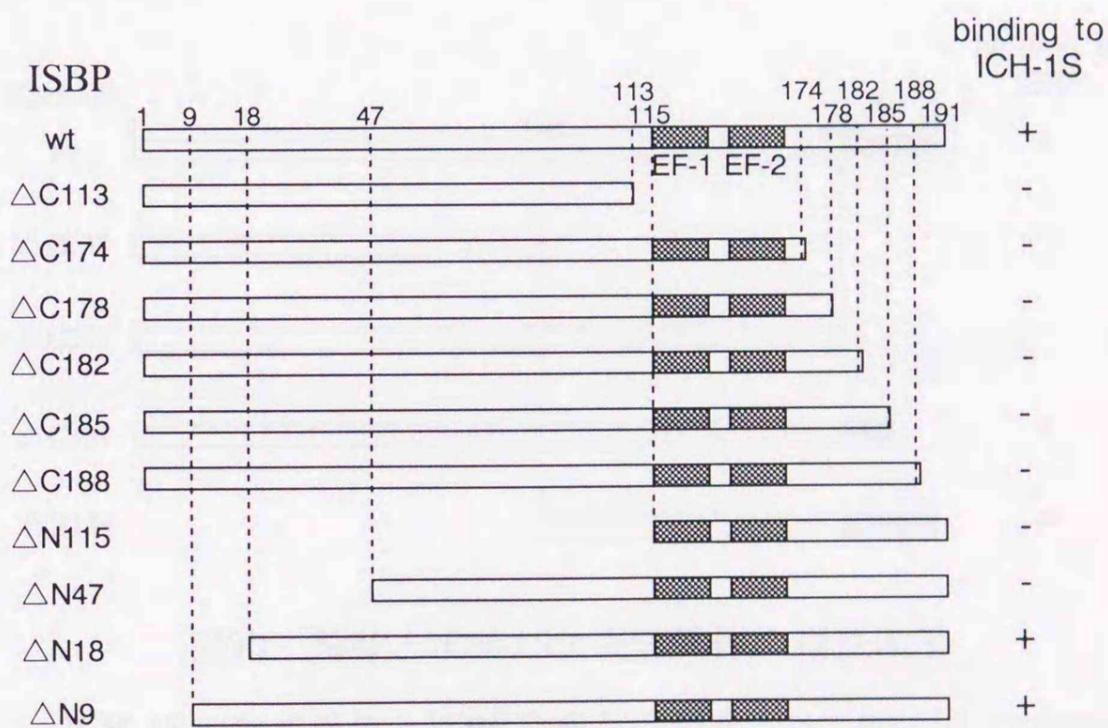


図29 ICH-1SとISBP欠失変異体の相互作用

ISBP欠失変異体とICH-1Sの相互作用を、two-hybrid systemを用いて、 β -galactosidase活性を指標にして検討することにより、ISBPの結合部位を検討した。

つぎに、ISBPの結合に必要なICH-1Sの領域を調べるため、4種類のICH-1S欠失変異体を用いて解析した。ICH-1Sの1から291アミノ酸残基まではICH-1Lと全く同一で、292番目から312番目の20アミノ酸がICH-1Lと異なる領域である(図23)。ICH-1Lと全く同一のアミノ酸組成である欠失変異体 Δ C291はISBPとの結合活性は認められなかった。また、C末端側10アミノ酸を欠損させた変異体 Δ C301においても、ISBPの結合は見られなかった。しかしながら、N末端側138アミノ酸残基を欠損させた変異体とISBPとの結合活性が認められた(図30)。以上の結果より、ISBPはICH-1SのC末端側に結合すること、また、ICH-1Sに特異的なC末端のアミノ酸が必要であることが示唆された。

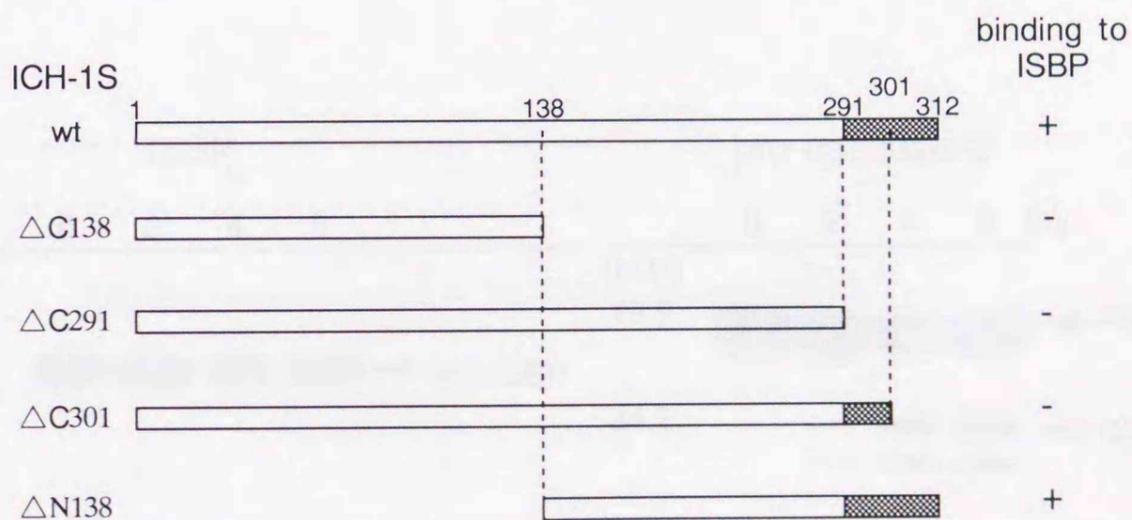


図30 ISBPとICH-1S欠失変異体の相互作用

ICH-1S欠失変異体とISBPの相互作用を、two-hybrid systemを用いて、 β -galactosidase活性を指標にして検討することにより、ICH-1Sの結合部位を検討した。

(■) ICH-1Sに特異的なアミノ酸配列

4-2-7 caspaseによるISBPの切断

ISBPのアポトーシスに対する作用を検討するため、ISBPがcaspaseの基質に成りうるか否か、抗Fas抗体を処理したJurkat cell lysateを用いて、in vitroの系で検討した。in vitro転写、翻訳系により³⁵S-methionineラベルした³⁵S-ISBP、あるいは、³⁵S-caspase-2と、抗Fas抗体を各時間処理したJurkat cell lysateを30℃で2時間インキュベート後、SDS-PAGEを行い、Bas2000を用いて、オートラジオグラフィーを行った。その結果、抗Fas抗体処理したJurkat cell lysateによりcaspase-2の前駆体がプロセッシングされて生じたと推定される33kDaのバンドと、14 kDaのバンドが検出された(図31)。一方、抗Fas抗体処理したJurkat cell lysateによりISBPは切断されなかった(図31)。以上より、in vitroにおいて、抗Fas抗体処理によりJurkat細胞で活性化されるcaspaseの基質にISBPはならないことが示唆された。

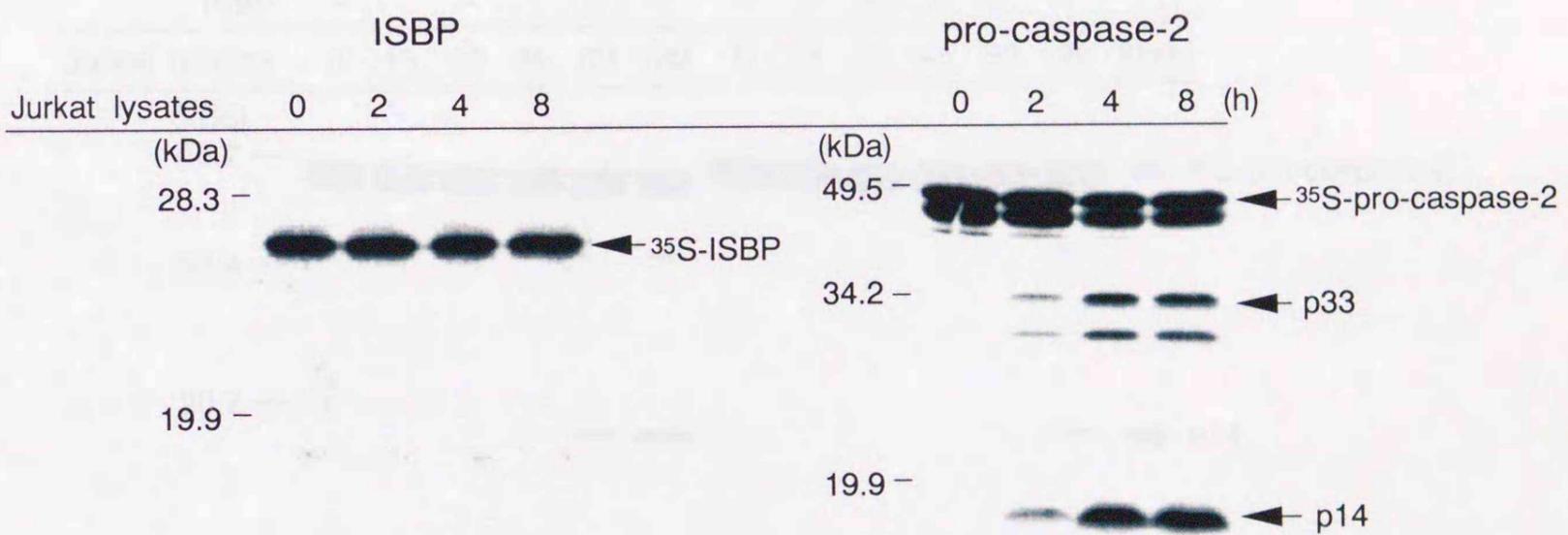


図31 in vitroにおけるcaspaseによる³⁵S-ISBP、³⁵S-pro-caspase-2の切断
抗Fas抗体処理したJurkat cell lysateと、³⁵S-ISBP、あるいは³⁵S-pro-caspase-2をインキュベートした後、SDS-PAGEを行い、³⁵S-ISBP、あるいは³⁵S-pro-caspase-2の切断された断片が検出されるか否か検討した。

4-2-8 ISBPによるcaspaseの活性化の抑制

つぎに、ISBPがcaspaseの活性に影響を与えるかどうかを、抗Fas抗体を4時間処理したJurkat cell lysateを用いて検討した。抗Fas抗体を処理したJurkat cell lysateと、³⁵S-caspase-2の混合溶液中に、大腸菌で発現、精製したISBPタンパク質あるいはbufferのみを添加し、30℃で各時間インキュベート後、SDS-PAGEを行い、Bas2000を用いて、オートラジオグラフィーを行った。その結果、ISBPを添加することにより、caspase-2の前駆体の切断が一部抑制された(図32)。以上より、抗Fas抗体処理によりJurkat細胞で活性化されるcaspaseの活性化をISBPは、直接あるいは間接的に抑制することが示唆された。

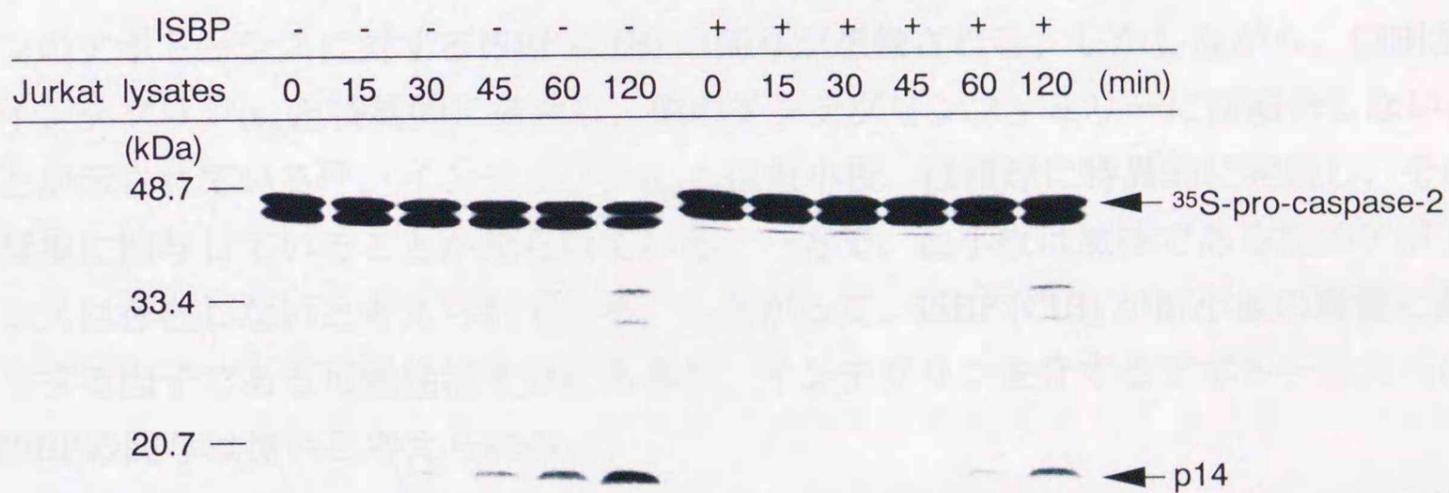


図32 抗Fas抗体処理したJurkat cell lysateによる³⁵S-pro-caspase-2の切断に対するISBPの効果

抗Fas抗体処理したJurkat cell lysateと³⁵S-pro-caspase-2の混合溶液に、大腸菌で発現、精製した5 μgのISBP、あるいはbufferのみを加え、各時間インキュベートした後、SDS-PAGEを行い、³⁵S-pro-caspase-2の切断された断片を検出した。

4-3 考察

yeast two-hybrid systemを用いて、ヒト胎児脳cDNAライブラリーからICH-1Sと結合するタンパク質 (ISBP) を単離した。ホモロジー検索の結果、ISBPはインテグリン細胞内ドメイン α_{IIB} と結合するタンパク質として最近クローニングされたCIB⁷⁸⁾と同一であることが明らかとなった。インテグリンは細胞表面に発現される細胞接着受容体で、 α と β 鎖から構成されている。現在、少なくとも15種類の α 鎖、8種類の β 鎖が知られており、その組み合わせにより約20種類のインテグリンが存在する。インテグリンは、赤血球以外の生体内の全ての細胞膜表面に発現し、細胞間、または細胞マトリックスと細胞間の接着を担い、細胞の形態維持、運動、発生、増殖、分化、造血、癌細胞の転移、血小板凝集など多岐にわたる細胞現象に重要な役割を果たしていることが知られている。また、内皮細胞、上皮細胞などの接着性の細胞では、細胞外マトリックス分子との相互作用が、細胞の生存に必要であることが報告されている^{79, 80)}。一方、血球系細胞株において、フィブロネクチンがインテグリンVLA-5を介してアポトーシスを誘導すること⁸¹⁾、 $\beta 2$ インテグリンがTNF- α による好中球のアポトーシスを増強すること⁸²⁾が報告されており、インテグリンはこれらのアポトーシスに密接に関与していると考えられている。このことから、インテグリンのアポトーシスに対するISBP (CIB) の関与が想像される。しかしながら、CIBはインテグリン α_{IIB} と特異的に結合し、他のインテグリンファミリーには結合しないことが示されている⁷⁷⁾。インテグリン $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ は血小板、巨核球に特異的に発現し、その凝集に関与していることが知られている。一方で、血小板は無核であるためアポトーシスは存在しないと考えられている。したがって、ISBP (CIB) が血小板の凝集に関与する因子である可能性は十分にあるが、インテグリンを介するアポトーシスへのISBPの関与は無いと考えられる。

ISBPはカルシニューリンBサブユニットと58%、カルモジュリンと56%の相同性をもち、C末端側に二つのEFハンドモチーフをもつ、低分子量Ca²⁺ binding proteinであることが明らかとなった。カルシニューリンはCa²⁺とカルモジュリンによって制御されている唯一のホスファターゼであり、Ca²⁺/カルモジュリン依存性シグナル伝達系路で活性化され、細胞の増殖、分化や細胞周期、転写制御因子の調節機構などに関わっていることが知られている。また、カルシニューリンAの活性型遺伝子を導入した細胞において血清除去下でアポトーシスが誘導されること⁸³⁾、そのアポトーシスはBcl-2との直接結合により抑制されることが報告されている⁸⁴⁾。カルシニューリンは触媒サブユニットであるカルシニューリンAと調節サブユニットであるカルシニューリンBから成る。カルシニューリンBは分子量19 kDaで四つのEFハン

ドモチーフをもつ、低分子量Ca²⁺ binding proteinである。ISBPはカルシニューリンBサブユニットと最も高い相同性をもつことから、カルシニューリンBと同様に、未知の酵素の調節サブユニットに成りうる可能性が考えられる。一方、EFハンドモチーフを二つもつ低分子量Ca²⁺ binding proteinとしてp22⁸⁵⁾、CHP (calcineurin B homologous protein)⁸⁶⁾が知られている。p22、CHPともにカルシニューリンBと高い相同性を持ち、p22は膜輸送に⁸⁵⁾、CHPはナトリウム/プロトンポンプに⁸⁶⁾関与することが報告されている。ISBPとの相同性は高くないが、ISBPとp22、CHPは、C末端にEFハンドモチーフを二つもつ低分子量Ca²⁺ binding proteinのファミリーを形成している可能性が示唆される。

ICH-1SはC末端側から20アミノ酸がICH-1Lと異なるアミノ酸組成をもつ領域で、それ以外のアミノ酸組成はICH-1Lと全く同一である¹²⁾。ISBPとICH-1Sの結合部位を検討したところ、ISBPとICH-1Sは各々のC末端側で結合すること、ISBPのICH-1Sへの結合には、ICH-1Sに特異的なC末端側のアミノ酸組成が必要であることが示唆された。このことから、ISBPはICH-1Lと結合出来ないことが示唆された。また、ISBPはインテグリン α_{11b} の細胞内ドメインと結合するCIBと同一であることから、ICH-1SのC末端側とインテグリン α_{11b} の細胞内ドメイン間にホモロジーが存在するか否か検討したが、両者の間にホモロジーは存在しなかった。しかしながら、本論文において、ISBPとICH-1Sは各々のC末端側で結合することを示したが、CIB (ISBP) とインテグリン α_{11b} がどの領域で結合するのか明らかではない。したがって、ICH-1Sとの結合部位 (C末端側) と異なる領域で、CIB (ISBP) はインテグリン α_{11b} と結合するのかもしれない。

つぎに、ISBPのアポトーシスに対する作用を検討するため、ISBPがcaspaseの基質に成りうるか否かを、抗Fas抗体処理したJurkat cell lysateを用いて検討したところ、ISBPはcaspaseの基質にならないことが示唆された。つぎに、caspaseの活性化に対する効果について検討したところ、in vitroにおいてISBPはICH-1Lを基質とするcaspaseの活性化を一部抑制した。ICH-1Lを基質とするcaspaseはcaspase-2、-3、-8、-10であり、抗Fas抗体処理したJurkat細胞において、caspase-2、-3、-8、-10が活性化されることが報告されている。ISBPはICH-1Sに結合するタンパク質として単離されたことから、ISBPはcaspase-2の活性化を調節することが示唆される。ISBPはICH-1L (caspase-2) と直接結合できないことが明らかになったことから、ISBPがcaspase-2に直接作用して、その活性を抑制するとは考えにくい。一方、Ich-1SはJurkat細胞において発現していることが報告されている¹²⁾。したがって、ISBPはJurkat細胞のICH-1Sに作用することにより、caspase-2の活性化に何らかの影響を与える可能性が考えられる。しかしながら、ICH-1Sがcaspase-2以外の他のcaspaseの活性化に影響を与える可能性や、ISBPがICH-1Sを介さずにcaspaseの活性化に影響を与える可能性も考え

られる。今後さらに詳しく、ISBPのcaspase抑制作用について検討していく必要がある。

一方、ISBP mRNAのヒトでの組織分布を検討したところ、ISBPは成人、胎児で検討した全ての組織において発現していた。このことから、ISBPは一種のハウスキーピング遺伝子である可能性が考えられる。ハウスキーピング遺伝子であるcytochrome cがアポトーシスの情報伝達の中ではcaspase活性化因子として機能するように、ISBPも細胞の生存、維持などの重要な機能をもちながら、アポトーシスなど他の機能に関与している可能性も考えられる。実際、ISBPはインテグリン細胞内ドメイン結合タンパク質であるCIBと同一分子であることから、血小板の凝集においてISBP (CIB) はインテグリンからのシグナルを媒介するメディエーターとして機能すると推測されている。今後、ISBPのアポトーシスに対する作用のみならず、ISBPが有する他の細胞内機能についても検討していきたい。

終章

本研究成果を以下に示した。また、今回の結果から予想されるSK-N-MC細胞におけるセラミドのアポトーシス惹起機構を図33に示す。

- 1) C2セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴミエリナーゼ処理は、ヒト神経芽細胞腫SK-N-MC細胞のアポトーシスを引き起こした。
- 2) C2セラミドによるアポトーシス誘導時に、caspase-2および-3が活性化することが示唆された。
- 3) C2セラミドはミトコンドリアタンパク質cytochrome cの細胞質への漏出を引き起こした。
- 4) *in vitro*においてcytochrome cはcaspase-2および-3の前駆体の切断を引き起こした。
- 5) yeast two-hybrid systemを用いて、caspase-2から選択的スプライシングより生じ、アポトーシス抑制活性を有するICH-1Sと結合する約25 kDaのタンパク質を単離した。ISBPはインテグリン細胞内ドメイン α_{1b} と結合するタンパク質として最近クローニングされたCIBと同一分子であり、カルシニューリンBサブユニットと58%、カルモジュリンと56%の相同性をもち、C末端側に二つのEFハンドモチーフをもつ、191個のアミノ酸から成る約25 kDaの低分子量Ca²⁺ binding proteinであった。
- 6) ISBP mRNAはヒト各組織で発現していること、その細胞内局在は核、細胞質の両方に存在していることが明らかにされた。
- 7) ICH-1SとISBPは各々のC末端側で結合していることが示唆された。とくに、ISBPのC末端側3アミノ酸および、ICH-1Sに特異的なC末端のアミノ酸が必要であることが示唆された。
- 8) *in vitro*において、ISBPはcaspaseの活性化を一部抑制することが示唆された。

以上の結果から、SK-N-MC細胞において、セラミドはcytochrome cを漏出し、caspase-2、-3を活性化させ、アポトーシスを引き起こすことが示唆された。最近、PC12細胞において、低酸素ストレスにより細胞内セラミドが上昇し、caspaseが活性化され、アポトーシスを誘導することが報告された⁸⁷⁾。一方、一過性の脳虚血において、遅延性細胞死が起こる海馬錐体細胞でNedd2の発現が上昇することが報告されている⁸⁸⁾。低酸素ストレスは脳虚血におけるin vitroのモデルであると考えられていることから、一過性の脳虚血における遅延性神経細胞死にセラミド、caspaseが関与している可能性が考えられる。それゆえに、セラミドによるcaspaseの活性化は、神経疾患における細胞死に密接に関わっていると考えられ、セラミドの神経細胞死に対する役割および、その分子機構はますます重要になってきていると思われる。

一方、1993年にcaspaseが哺乳類における細胞死実行因子であることが示唆されて以来、caspaseを中心にアポトーシスの分子機構が急速に解明されてきた。最近、caspaseによって活性化されるアポトーシス特異的なDNA分解酵素 (CAD : caspase-activated DNase) とその阻害因子 (ICAD : inhibitor of CAD) が同定され、caspaseの活性化から、DNAの分解までの伝達機構が明らかとなった⁸⁹⁾。このように、Apaf-1 / cytochrome c、あるいは、death domain / TRADD / FADDによるcaspase活性化機構および、caspase活性化からアポトーシスの最終ステップまでの機構が明らかにされつつある。今回筆者が単離したISBPの細胞内の作用については不明である。しかしながら、in vitroにおいてISBPはcaspaseの活性を抑制することが示唆されたので、細胞内においてcaspaseの活性化を制御する因子である可能性が考えられる。したがって、セラミドによるアポトーシス誘導における細胞内ISBPの発現量など、その役割を検討することが、セラミドを含むアポトーシスの分子機構の解明の前進に寄与すると思われる。ISBPの細胞内機能について早急に検討することが今後の重要な課題である。

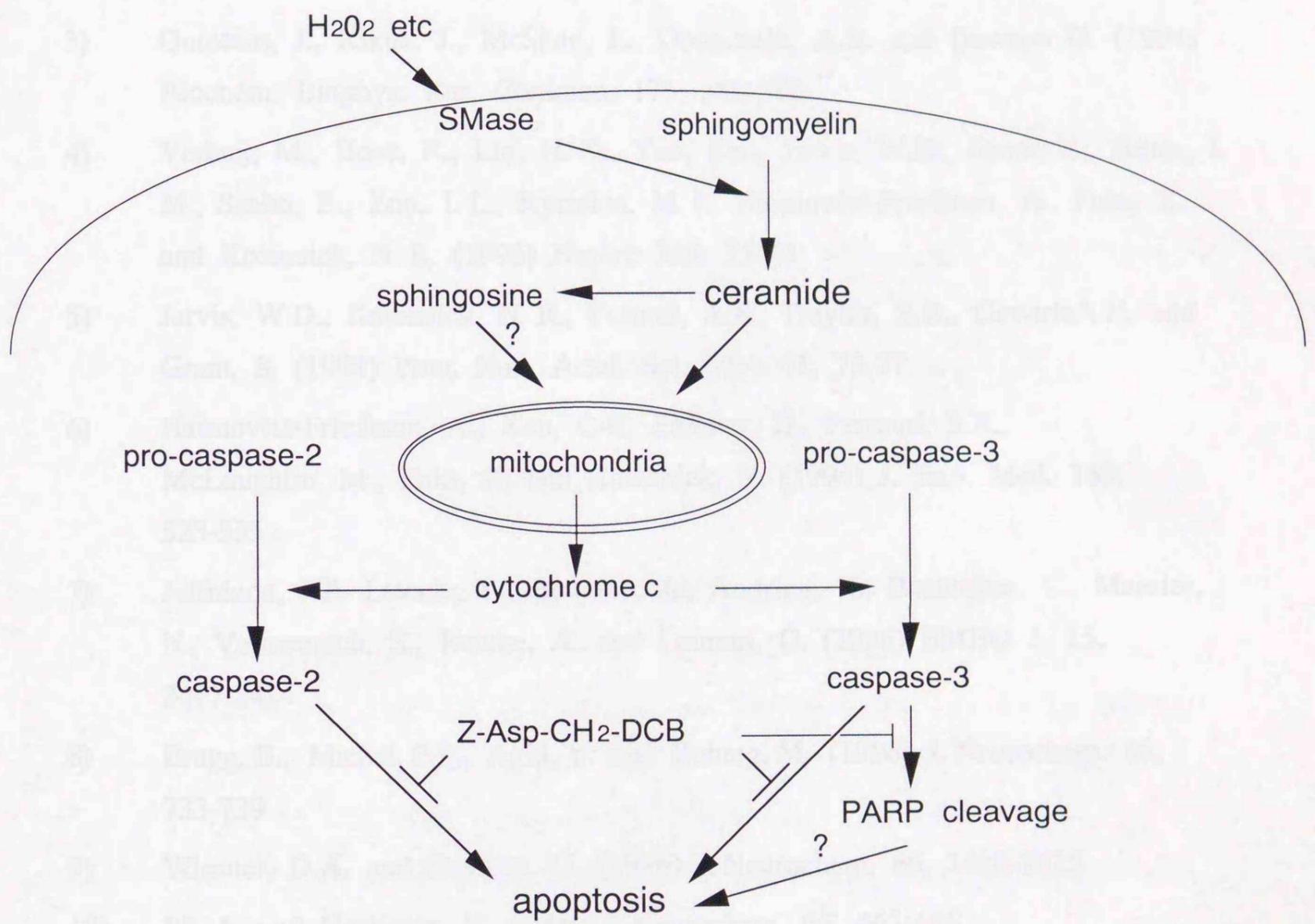


図33 セラミドによって引き起こされる細胞死の機構

参考文献

- 1) Obeid, L.M., Linatdic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A. (1993) *Science* 259, 1769-1771
- 2) Tepper, C.G., Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A., Wolff, R., Yonehara, S., Hannun, Y.A. and Seldin M.F. (1995) *Proc. Natl. Acsd. Sci. USA* 92, 8443-8447
- 3) Quintans, J., Kikus, J., McShan, L., Gottschalk, A.R. and Dawson G. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 380-386
- 4) Verheij, M., Bose, R., Lin, H. X., Yao, Bei., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, J. M., Szabo, E., Zon, I. L., Kyriakis, M.J., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Koiesnick, N. R. (1996) *Nature* 380, 75-79
- 5) Jarvis, W.D., Koiesnick, N. R., Fornari, A.F., Traylor, S.R., Gewirtz A.D. and Grant, S. (1994) *Proc. Natl. Acsd. Sci. USA* 91, 73-77
- 6) Haimovitz-Friedman, A., Kan, C-C, Ehleiter, D., Persaud, S.R., McLoughlin, M., Fuks, Z. and Kolesnick, N. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 525-535
- 7) Jaffrézou, J-P, Levade, T., Bettaïeb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Maestre, N., Vermeersch, S., Rousse, A. and Laurent, G. (1996) *EMBO J.* 15, 2417-2424
- 8) Brugg, B., Michel, P.P., Agid, Y. and Ruberg, M. (1996) *J. Neurochem.* 66, 733-739
- 9) Wiesner, D.A. and Dawson, G. (1996) *J. Neurochem.* 66, 1418-1425
- 10) Ito, A. and Horigone, K. (1995) *J. Neurochem.* 65, 463-466
- 11) Goodman, Y. and Mattson, P.M. (1996) *J. Neurochem.* 66, 869-872
- 12) Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. and Yuan, J. (1994) *Cell* 78, 739-750
- 13) Spence, M.W. (1979) *Brain Res.* 168, 543-551
- 14) Otterbach, B. and Stoffel, W. (1995) *Cell* 81, 1053-1061
- 15) Dobrowsky, R.T., Werner, M.H., Castelino, A.M., Chao, M.V. and Hannun, Y.A. (1994) *Science* 265, 1596-1599
- 16) Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R.M. and Hannun Y.A. (1994) *J. Biol. Chem.* 265, 15823-15831

- 17) Ohta, H., A., Yatomi, Y., Sweeney, E.A., Hakomori, S. and Igarashi, Y. (1994) *FEBS Lett.* 355, 267-270
- 18) Ohta, H., Sweeney, E.A., Masamune, Y., Yatomi, Y., Hakomori, S. and Igarashi, Y. (1995) *Cancer Res.* 55, 691-697
- 19) Sakakura, C., Sweeney, E.A., Shirahama, T., Hakomori, S. and Igarashi, Y. (1996) *FEBS Lett.* 379, 177-180
- 20) Cuviller, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.M., Gutkind, J.S. and Spiegel S. (1996) *Nature* 381, 800-803
- 21) Ellis, H.M. and Horvitz, R. (1986) *Cell* 44, 817-829
- 22) Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, R. (1993) *Cell* 75, 641-652
- 23) Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A. and Yuan, J. (1993) *Cell* 75, 653-660
- 24) Alnemeri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) *Cell* 87, 171
- 25) Miura, M., Friedlander, R.M. and Yuan, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8318-8322
- 26) Enari, M., Hug, H. and Nagata, S. (1995) *Nature* 375, 78-81
- 27) Los, M., Craen, M.V., Penning, L.C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P.A., Dröge, W., Krammer, P.H., Fiers, W. and Schulze-Osthoff, K. (1995) *Nature* 375, 81-83
- 28) Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 3255-3260
- 29) Enari, M., Talaniant, R.V., Wong, W.W. and Nagata, S. (1996) *Nature* 380, 723-726
- 30) Gagliardini, V., Fernandez, P-A., Lee, R.K.K., Drexler, H.C.A., Rotello, R.J., Fishman, M.C. and Yuan, J. (1994) *Science* 263, 826-828
- 31) Milligan, C.E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L.C., Tomaselli, K.J., Oppenheim, R.W, and Schwartz, L.M. (1995) *Neuron* 15, 385-393
- 32) Eldadah, B.A., Yakovlev, A.G. and Faden, A.I. (1997) *J. Neurosci.* 17, 6015-6113
- 33) Mashima, T., Naito, M., Kataoka, S., Kawai, H. and Tsuru, T. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 907-915

- 34) Walker, N.P.C., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., Herzog, L., Hugunin, M., Houy, W., Mankovich, J.A., McGuinness, L., Orlewicz, E., Paskind, M., Pratt, C.A., Reis, P., Summani, A., Terranova, M., Welch, J.P., Xiong, L., Möller, A., Tracey, D.E., Kamen, R. and Wong, W.W. (1994) *Cell* 78, 343-352
- 35) Wilson, K.P., Black, J-A.F., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A. and Livingston, D.J. (1994) *Nature* 370, 270-275
- 36) Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S.-S. and Flavell, R.A. (1995) *Science* 267, 2000-2003
- 37) Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell, R.A. (1996) *Nature* 384, 368-372
- 38) Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1996) *Oncogene* 12, 2251-2257
- 39) Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M. (1996) *Cell* 85, 815-827
- 40) Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1996) *Cell* 85, 803-815
- 41) Li, H., Bergeron, L., Cryns, V., Pasternack, M.S., Zhu, H., Shi, L., greenberg, A. and Yuan, J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 21010-21017
- 42) Mizushima, N., Koike, R., Kohsaka, H., Kushi, Y., Handa, S., Yagita, H. and Miyasaka, N. (1996) *FEBS Lett.* 395, 267-271
- 43) Westwick, J.K., Bielawska, A.E., Dbaiibo, G., Hannun, Y.A. and Brenner, A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 22689-22692
- 44) Goldkorn, T., Dressler, K.A., Muindi, J., Radin, N.S., Mendelson, J., Menaldino, D., Liotta, D. and Kolesnick, R.N. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 16092-16097
- 45) Dobrowsky, R.T. and Hannun, Y.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 4048-5051
- 46) Dobrowsky, R.T. and Hannun, Y.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 15523-15530
- 47) Zhang, Y., Yao, B., Delicat, S., Bayoumy, S., Lin, X-H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P-Y., Lichenstein, H. and Kolesnick, R. (1997) *Cell* 89, 63-72

- 48) Wolff, R.A., Dobrowsky, R.T. Bielawska, A., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19605-19609
- 49) Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Swada, H., Okuma, M., Ishikura, H., Umehara, H. and Domae, N. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 27326-27331
- 50) Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995) *Science* 270, 1326-1331
- 51) Cahill, M.A., Peter, M.E., Kischkel, F.C., Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M., Krammer, P.H. and Nordheim, A. (1996) *Oncogene* 13, 2087-2096
- 52) Juo, P., Kuo, C.J., Reynolds, S.E., Konz, R.F., Raingeaud, J., Davis, R., Biemann, H.-P. and Belenis, J. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 24-35
- 53) Natoli, G., costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C. and Levrero, M. (1997) *Science* 275, 200-203
- 54) Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. and Karin, M. (1996) *Cell* 87, 565-576
- 55) Tartaglia, L.T., Ayres, T.M., Wong, G.H.W. and Goeddel, D.V. (1994) *Cell* 74, 845-853
- 56) Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. (1995) *Cell* 81, 495-504
- 57) Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995) *Cell* 81, 505-512
- 58) Hsu, H., Shu, H.-B., Pan, M.-G. and Goeddel, D.V. (1996) *Cell* 84, 299-308
- 59) Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996) *Cell* 86, 141-157
- 60) Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, Jiyang, C., Peng, T., Jones, D.P. and Wang, X. (1997) *Science* 275, 1129-1132
- 61) Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997) *Science* 275, 1132-1136
- 62) Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C. (1998) *Science* 280, 496-499
- 63) Green, D. and Kroemer, G. (1998) *Trends Cell Biol.* 8, 267-271
- 64) Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. and Kroemer, G. (1996) *J. Exp. Med.* 183, 1533-1544

- 65) Marchetti, P., Susin, S.A., Decaudin, D., Gamen, S., Castedo, M., Hirsch, T., Zamzami, N., Naval, J., Senik, A. and Kroemer, G. (1996) *Cancer Res.* 56, 2033-2038
- 66) Susin, S.A. Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. and Kroemer, G. (1996) *J. Exp. Med.* 184, 1331-1341
- 67) Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M. Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. and Kroemer, G. (1996) *J. Exp. Med.* 184, 1-11
- 68) Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadoes, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.C. and Fesik, S.W. (1996) *Nature* 381, 335-341
- 69) Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. and Thompson, C.B. (1997) *Nature* 385, 353-357
- 70) Schendel, S.L., Xie, Z., Montel, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. and Reed, J.C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5113-5118
- 71) Antonsson, B., Conti, F., Civatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. and Martinou, J.C. (1997) *Science* 277, 370-372
- 72) Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997) *Cell* 91, 479-489
- 73) Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) *Cell* 90, 405-413
- 74) Kumar, S., Tomooka, Y. and Noda, M. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 1155-1161
- 75) Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G. and Jenkis, N.A. (1994) *Genes & Dev.* 8, 1613-1626
- 76) Ito, H., Fukada, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 163-168
- 77) Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. (1992) *Nucleic Acid Res.* 20, 1425.
- 78) Naik, U.P., Patel, P.M. and Parise, L.V. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 4651-4654
- 79) Ruoslahti, E. and Reed, J.C. (1994) *Cell* 77, 477-478
- 80) Frisch, S.M. and Francis, H. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 619-626

- 81) Sugahara, H. Kanakura, Y., Furitsu, T., Ishihara, K., Oritani, K., Ikeda, H., Kitayama, H., Ishikawa, J., Haskimoto, K., Kanayama, Y. and Matsuzawa, Y. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 1757-1766
- 82) Walzog, B., Jeblonski, F., Zakrzewicz, A. and Gaehtgens, P. (1997) *FASEB J.* 11, 1177-1186
- 83) Shibazaki, F. and Mckeeon, F. (1995) *J. Cell Biol.* 131, 735-743
- 84) Shibazaki, F., Kondo, E., Akagi, T. and Mckeeon, F. (1995) *Nature* 386, 728-731
- 85) Barroso, M.R., Bernd, K.K., DeWitt, N.D., Chang, A., Mills, K. and Sztul, E.S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10183-10187
- 86) Lin, Xia and Barber, D.L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12631-12636
- 87) Yoshimura, S., Banno, Y., Nakashima, S., Takenaka, K., Sakai, H., Nishimura, Y., Sakai, N., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Nozawa, Y. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 6921-6927
- 88) Kinoshita, M., Tomimoto, H., Kinoshita, A, Kumar, S. and Noda, M. (1997) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 507-514
- 89) Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S., (1998) *Nature* 391, 43-50

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学部薬理学分野教授、野村靖幸博士に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導して頂きました本学部薬理学分野助手、上原孝博士に心より感謝申し上げます。

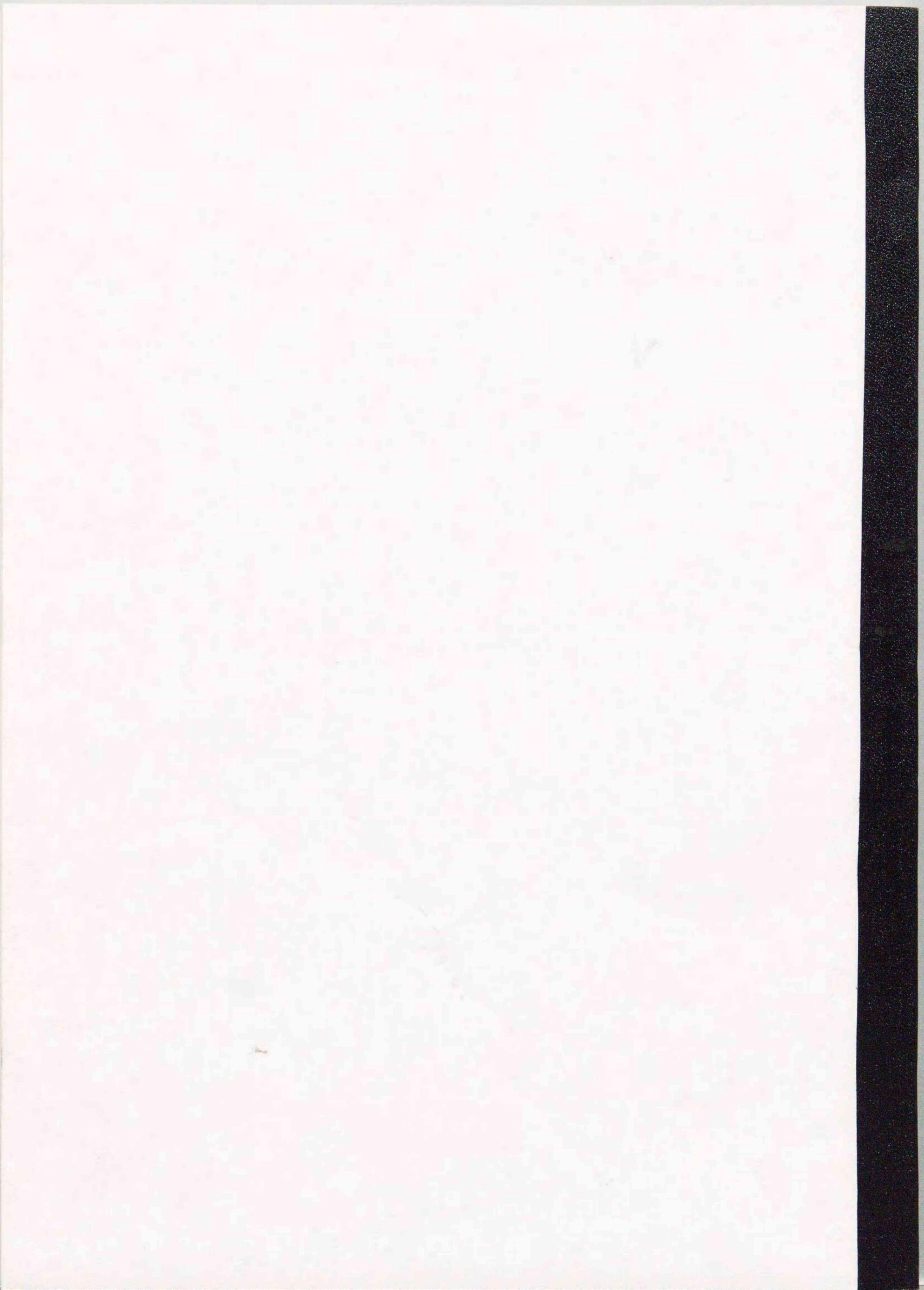
本論文を審査して頂きました本学部生化学分野教授、横沢英良博士、本学部生体機能化学分野教授、五十嵐靖之博士、本学部薬理学分野助教授、大熊康修博士に深く感謝申し上げます。

卒業研究から終始御指導、御激励を賜りました本学部生理化学分野教授、徳光幸子博士並びに、富山大学工学部助教授、磯部正治博士に心からお礼申し上げます。

折りに触れ、有益なご助言、御討論いただきました本学部薬理学分野助教授、村山俊彦博士をはじめ講座の皆様に深く感謝いたします。

1998年9月

伊藤昭博



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

