報告番号	※　　第　　号

主　論　文　の　要　旨

論文題目　新規 ALG-2 結合タンパク質 CDIP1 による細胞死制御の分子細胞生物学的研究

氏　　名　犬飼　隆太

論　文　内　容　の　要　旨

ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) はアポトーシスに必要な遺伝子産物として同定された。ALG-2 は Ca^{2+}結合モチーフである EF-hand を 5 つもち、Ca^{2+}依存的に様々なタンパク質と結合する。これまでに ALG-2 結合モチーフをもとに新規 ALG-２結合タンパク質の探索が行われた。その結果、アポトーシス促進タンパク質 CDIP1 (cell death-inducing p53 target protein 1) が見いだされた。そして、先行研究により ALG-2 と CDIP1 が Ca^{2+}依存的に結合することが示された。CDIP1 は、DNA 傷害および小胞体ストレスをうけた細胞で発現、アポトーシスを誘導するが、アポトーシス誘導の詳細な分子メカニズムは不明である。本研究は CDIP1 のアポトーシス誘導機能における ALG-2 の役割の解明を目指した。

【1】CDIP1 誘導性細胞死における ESCRT-Ⅰの影響の解析

ALG-2 をノックアウトしたヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 に、蛍光タンパク質 GFP を融合した CDIP1 (GFP-CDIP1) および ALG-2 を過剰発現させ、LDH (lactate dehydrogenase)の細胞外漏出を指標に細胞死を定量的に測定した。その結果、GFP-CDIP1 誘導性の細胞死が、ALG-2 の共発現時に促進された。これより、CDIP1 誘導性の細胞死に ALG-2 が促進的に関与することが示された。

先行研究において、ALG-2 が CDIP1 と TSG101 の結合を Ca^{2+}依存的に増強することが示された。そこで、TSG101 (tumor susceptibility gene 101) を構成因子とする ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) -Ⅰと CDIP1 の結合、および ESCRT-Ⅰが CDIP1 誘導性細胞死に与える影響を調べた。その結果、CDIP1 は ESCRT-Ⅰ複合体と結合した。さらにこの結合には、ESCRT-Ⅰを構成するタンパク質の組み合わせに特異性があり、また Ca^{2+}依存性もみられた。また、ESCRT-Ⅰ構成タンパク質と GFP-CDIP1 の共発現に

よってGFP-CDIP1誘導性の細胞死が促進された。中でもCDIP1と最も強い結合がみられたESCRT-Ⅰ複合体との共発現細胞においてGFP-CDIP1誘導性の細胞死が最も顕著に誘導された。以上より、ESCRT-Ⅰ複合体とCDIP1の相互作用によって細胞死が促進されると考えられた。

【2】CDIP1のアポトーシス誘導およびオートファジー誘導の解析

ヒト乳がん細胞株MCF7を用いてDox (Doxycycline)依存的にCDIP1を発現誘導できる細胞株を樹立した。Doxの添加24時間後にはオートファジーのマーカータンパク質であるLC3の脂質化が検出され、さらにその24時間後にはアポトーシスの指標であるPARPの切断が検出された。オートファジーフラックスアッセイにより、CDIP1誘導性のLC3脂質化はオートファジーの誘導によることが判明した。オートファゴソーム生合成に重要なクラスⅢ PI3キナーゼであるVPS34の阻害剤SAR405処理によって、CDIP1誘導性のオートファジーが抑制された。この時、CDIP1誘導性のアポトーシスは阻害剤非処理細胞に比べ顕著に誘導された。また、ALG-2の発現抑制細胞ではCDIP1誘導性のオートファジーが促進され、一方でアポトーシスは抑制された。以上より、CDIP1誘導性のオートファジーとアポトーシスにはALG-2が関与する制御機構が存在すると考えられた。

【3】CDIP1のリン酸化および分解システムの解析

CDIP1はWestern Blotにおいて移動度の異なる2本のバンドとして検出された。ホスファターゼを用いた解析の結果、移動度の遅いCDIP1由来のバンドはリン酸化されたCDIP1であることが明らかになった。さらに、CDIP1の種々のアミノ酸の点変異体を用いた解析によって、CDIP1の32番目のセリン（S32）がリン酸化されていることが判明した。CDIP1のS32の前後のアミノ酸配列をもとにCDIP1のリン酸化酵素を探索した結果、CDKが候補と考えられた。CDK阻害剤Roscovitineを培地に添加し培養すると、CDIP1のリン酸化フォームが減少したことから、CDIP1のリン酸化にはCDKの活性が関与すると考えられた。続いて、CDIP1のリン酸化がCDIP1誘導性の生理機能に与える影響を調べた。S32を負電荷アミノ酸に置換したCDIP1変異体の発現は、S32をアラニンに置換したCDIP1の発現に比べてLC3の脂質化とPARPの切断の程度が大きいことが明らかになった。以上より、リン酸化CDIP1はオートファジーとアポトーシスに促進的に機能すると考えられた。

CDIP1の分解速度および分解経路について検討した。DNA傷害剤adriamycinによって発現誘導されたCDIP1は、cycloheximideによるタンパク質合成阻害後、約9時間でほぼ分解された。このCDIP1の分解はリソソーム阻害剤Bafilomycin A1によって阻害されたことから、CDIP1はリソソームで分解されることが明らかになった。また、VPS34阻害剤SAR405によって、一部CDIP1の分解抑制がみられたため、CDIP1はオートファジー経路において一部が分解されると考えられた。