主　論　文　の　要　約

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

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。ダイマー化した ALG-2 は、２つの分子を Ca^{2+}依存的に架橋するアダプターとして機能し得る。アポトーシスに関するこれまでの報告によると、ALG-2 は慢性的にストレスに曝された細胞がアポトーシスを発動する際に促進的に働く事が明らかになりつつある。しかしながら、アポトーシス促進における ALG-2 の詳細な作用メカニズムは不明である。また医療分野では、ALG-２の mRNA レベルの高い胃がん患者は抗がん剤に高い効果を示すなど、ALG-2 は予後マーカーとしての期待がされている。したがって、がん細胞において ALG-2 の細胞死促進機構を解明する事で臨床応用が期待される。ALG-２の機能を解明する上で、その相互作用タンパク質を明らかにする事は重要である。当研究室の先行研究では、既知の ALG-2 結合タンパク質に共通して存在する Proline に富んだ特徴的な配列から帰納的に ALG-2-binding motif (ABM) が定義された。この ABM 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。CDIP1 は p53 の標的遺伝子産物であり、DNA 傷害時に発現が上昇し、活性酸素種やリン酸化 JNK を介したアポトーシスを誘導する。一方で小胞体ストレス時には p53 非依存的に発現が上昇し、caspase-8 の活性化を介したミトコンドリア経由のアポトーシスが誘導される。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、CDIP1 の C 末端領域が CDIP1 誘導性の細胞死活性に重要である事が示された。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 と既知の ALG-2 結合タンパク質 TSG101 (tumor susceptibility gene 101) 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 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。そして、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 (cyclin-dependent kinase) 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。

以上より、本博士論文研究では、CDIP1 誘導性のアポトーシスに ALG-2 が促進的に関与する事が示された。一方で、CDIP1 の新規生理機能であるオートファジー誘導に ALG-2 が抑制的に関与する事が示唆された。さらに、CDIP1 誘導性のアポトーシスとオートファジーには CDIP1 のリン酸化が促進的に関与する事、またクラスⅢ PI3 キナーゼ (VPS34) の活性がこれらの生理機能のスイッチングに関与すると考えられた。