

論文内容の要旨

申請者氏名 森脇 康博

Mycolic acid、arabinogalactan、peptidoglycan (PGN) を構成成分とする BCG-cell wall skeleton (BCG-CWS) には基本免疫活性化作用があり、癌切除患者に投与することで癌再発を防ぐことが知られている。最近、BCG-CWS は抗原提示細胞である単球や樹状細胞 (Dendritic cell : DC) 上に存在する Toll-like receptor-2 (TLR-2) および-4 により認識されることが、当研究室において確認された。TLR は細菌やウイルスに含まれる成分、Lipopolysaccharide (LPS) や PGN 等を認識し、転写因子である NF- κ B を活性化することで、免疫力を高めると考えられる。特に、immature DC から抗原提示能の高い mature DC への成熟化において重要な役割を担う液性因子、TNF- α は NF- κ B によってその発現が制御されている。BCG-CWS による抗癌作用は、DC の成熟化と、それに伴った獲得免疫細胞への抗原提示能の増加、および液性因子の放出による細胞性免疫を活性化することで発揮されていると考えられるが、それら現象に関与する遺伝子の情報は乏しい。そこで、本研究では、まず BCG-CWS により発現変動する遺伝子について情報を得るため、Differential display 法による解析を行った。その結果、新規遺伝子 SIMPLE (Small Integral Membrane Protein of the Lysosome/late Endosome) を同定した。

SIMPLE は LITAF/PIG7 の 1 塩基欠損遺伝子であり、この 1 塩基欠損により生じるフレームシフトの為、SIMPLE は LITAF/PIG7 とは異なったタンパクをコードする。これまでに筆者は LITAF/PIG7 が実在しない artificial な遺伝子であること、SIMPLE が II 型リソソーム膜タンパクであること、SIMPLE が単球および樹状細胞において BCG-CWS や結核菌の生菌および死菌、LPS、TNF- α 刺激により発現誘導されることを明らかにしてきたが、機能については解明できていない。LITAF は単球を LPS 刺激した際に誘導される TNF- α の転写因子として報告されており、PIG7 は p53 によって発現誘導されることが明らかとなっている。また、PIG7 についてはアポトーシスへの関与が推測されている。LITAF および PIG7 が実存しないタンパクであることから、両タンパクで報告されている機能が SIMPLE によって行われている可能性は高い。また、SIMPLE が TNF- α の転写因子として機能しているのであれば、免疫系における SIMPLE の重要性は高く、更に、結核菌感染により単球のアポトーシスが抑制されることから、SIMPLE のアポトーシス関与の可能性も高いと考えられる。以上のことから、SIMPLE の転写因子およびアポトーシス関与の可能性について検討することにした。

まず、SIMPLE の転写因子としての可能性について検討を行った。SIMPLE は膜タンパクであり、転写因子として機能するには、膜から遊離する必要がある。これまでに、mammalian ではその証明が為されていないものの、酵母において、膜タンパクがユビキチン化を経て転写因子として機能するという報告が為されている。その膜タンパク、SPT23 は小胞体膜タンパクであり、Ubiquitin ligase (E3) である RSP5 により認識、ユビキチン化され、膜貫通領域の手前でプロテアソームによる分解を経て転写因子として機能する。最近、SIMPLE が E3 である Nedd4 と相互作用することが報告された。Nedd4 は RSP5 の mammalian ホモログであることから、SIMPLE が酵母と同様

の機構により転写因子として機能しているという仮説を立て、実験を行った。まず、SIMPLE が Nedd4 と相互作用しているか、免疫沈降法により検討したところ、SIMPLE の一過的な過剰発現状態でその結合を確認することができた。一方、同サンプルに対してユビキチン化の有無について調べた結果、その現象は確認出来なかった。また、細胞分画法および免疫染色法による核移行、EMSA 法による DNA 結合能についても解析を行ったが、全ての結果は SIMPLE が転写因子として機能していないことを裏付けるものであった。

次に、SIMPLE のアポトーシスへの関与を明らかにすべく、SIMPLE 欠損細胞を樹立しその表現系の解析を試みた。SIMPLE 欠損細胞の作製には高効率で相同組み換え体が得られるニワトリ B 細胞株 DT40 細胞を用いた。ニワトリ SIMPLE (cSIMPLE) をクローニングし、アミノ酸配列をヒト SIMPLE と比較したところ、N 末端領域での 13 アミノ酸の欠如を除き、ヒト SIMPLE 同様、膜貫通領域および Nedd4 との相互作用 motif を有する事が明らかとなった。次に cSIMPLE 配列を基に targeting vector を構築し、欠損細胞を作製したところ、cSIMPLE 欠損細胞は野生型細胞と同様の増殖能を示した。また、細胞周期解析においても差異は確認出来なかった。DT40 細胞は p53 の null 細胞であると報告されている、一方で、抗ガン剤である Adriamycin (ADR) 刺激によって p53 の発現が誘導されることが報告された。また、ADR 刺激によって DT40 細胞にアポトーシスを引き起こすことも報告されている。PIG7 が p53 によって発現誘導されることから、ADR 刺激による cSIMPLE および p53 の発現誘導の確認と、cSIMPLE 欠損による ADR 刺激によるアポトーシスの感受性の変化について検討を行った。まず、cSIMPLE および p53 の ADR 刺激による発現誘導について Western blot により検討した結果、両タンパクの発現誘導を確認することは出来なかった。次に、アポトーシスの感受性の差異について DNA の断片化を指標に FACS により測定したところ、若干ではあるものの cSIMPLE 欠損細胞において、アポトーシスへの感受性が増大している結果を得た。

以上、本研究の結果を纏めると 1) 結核菌およびその構成成分により発現誘導される新規遺伝子、SIMPLE を単離、同定した 2) SIMPLE はリソソームに局在する II 型の膜タンパクであること明らかにした。3) SIMPLE がアポトーシスを抑制する可能性を示した。現在、更に詳細な SIMPLE のアポトーシスへの関与についての検討を行っている。また、最近、SIMPLE の NF- κ B 分解への関与が報告されたことから、その可能性についても確認を行っている。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 森脇康博

BCG-cell wall skeleton (BCG-CWS) には基本免疫活性化作用があり、癌切除患者に投与することで癌再発を防ぐことが知られている。BCG-CWSによる抗癌作用には、樹状細胞 (DC) の成熟化とそれに伴う一連の反応が関与すると考えられるが、それらの現象に関与する遺伝子の情報は乏しい。そこで、申請者は、BCG-CWSにより発現変動する遺伝子についての情報を得るため、まずDifferential display法による解析を行うことにより、BCG刺激により誘導される新規遺伝子SIMPLE (Small Integral Membrane Protein of the Lysosome/late Endosome) を同定した。SIMPLEはII型リソソーム膜タンパクであり、単球および樹状細胞においてBCG-CWSや結核菌の生菌および死菌、LPS、TNF- α 刺激により発現誘導される。

次に、その機能を明らかにするために、SIMPLEの転写因子およびアポトーシス関与の可能性について検討を行った。SIMPLEは膜タンパクであり、転写因子として機能するには、膜から遊離する必要がある。これまでに、mammalianではその証明が為されていないものの、酵母において、膜タンパクがユビキチン化を経て転写因子として機能するという報告が為されている。しかし、ユビキチン化の有無について調べた結果、その現象は確認出来なかった。また、細胞分画法および免疫染色法による核移行、EMSA法によるDNA結合能についても解析を行ったが、全ての結果はSIMPLEが転写因子として機能していないことを裏付けるものであった。

SIMPLEのアポトーシスへの関与を明らかにするために、高効率で相同組み換え体 が得られるニワトリB細胞株DT40細胞を用いたSIMPLE欠損細胞を樹立しその表現系の解析を試みた。cSIMPLE欠損細胞は野生型細胞と同様の増殖能を示した。抗ガン剤であるAdriamycin (ADR) 刺激によるアポトーシスの感受性の変化について検討を行ったところ、DNAの断片化を指標にFACSにより測定したところ、若干ではあるもののcSIMPLE欠損細胞において、アポトーシスへの感受性が増大している結果を得た。

以上、本研究の結果より、1) 結核菌およびその構成成分により発現誘導される新規遺伝子SIMPLEの単離・同定、2) SIMPLEはリソソームに局在するII型の膜タンパクであること、3) SIMPLEがアポトーシスを抑制する可能性、などを明らかにした。

以上のように、本論文はBCG-CWSの基本免疫活性化作用を遺伝子レベルで解析したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。