論文内容の要旨

博士論文題目

Study on the control of apoptosis induced by radical or cytokines
(ラジカルまたはサイトカインで誘導されるアポトーシスの制御に関する研究)

氏名 梶原 一美

(論文内容の要旨)

アポトーシスは、個体の恒常性の維持や免疫系等に重要な役割を果たしている。これまでに、細胞内ストレスによるミトコンドリアを介した経路と、サイトカインによる細胞膜上のデスレセプターを介したアポトーシス誘導機構が知られている。またこれらの機構が異常をきたすと、様々な疾患が誘起されることが報告されており、アポトーシスの制御がこれら疾患の治療法につながる。本研究では、作用機序の異なる 2 つのアポトーシス誘導機構について、アポトーシスを制御することを目的とした。

薬剤によるミトコンドリアを介した経路において、Reactive Oxygen Species に着目した。本研究で用いた 3 種類の薬剤は、いずれもミトコンドリアからのチトクロム c の放出とカスパーゼ 3 の活性化を引き起こした。さらに、チトクロム c の放出に伴うミトコンドリアの酸素消費量の減少は、カタラーゼにより回復した。また、カタラーゼや PBN を添加すると、カスパーゼ 3 の活性やアポトーシス誘導が抑制された。つまり、薬剤によるアポトーシス誘導機構において、 H_2O_2 や $OH^\cdot$ が、シグナル因子として機能し、抗酸化剤によりその効果が抑制されることが示唆された。

また、細胞膜上のデスレセプターを介した経路において、デスレセプターファミリー間のアミノ酸配列の相同性と、TRAIL-DR5 複合体の立体構造をもとに結合部位を推定し、DR5 由来ペプチドを設計した。TRAIL による L929 細胞へのアポトーシス誘導は、いずれの DR5 由来ペプチド共存下でも有意に抑制された。このうち、抑制効果が高く、リガンド特異的に抑制した DR5P6 について、レセプターファミリー間の構造の相同性をもとに、TNFR1 由来ペプチドと Fas 由来ペプチドを設計した。これらのペプチドは、それぞれリガンド特異的にアポトーシスを抑制した。

さらに、ペプチドライブラリーを用いて、アポトーシスを誘導するペプチドのスクリーニングを行い、その効果を検討した。L929 細胞に再現性よくアポトーシスを誘導したピーズのアミノ酸配列を解析した結果、得られたアミノ酸配列間で相同性が認められた。得られたペプチドをピーズ上に再構築し、アポトーシス誘導能についての再現性が認められた。蛍光標識した 4 量体化ペプチドをも用いた結合解析から、細胞膜上に存在するレセプターと結合して、アポトーシスシグナルを活性化している可能性が示唆された。

本研究により、2 つの異なる経路において、アポトーシス誘導または抑制が可能になった。薬剤によるミトコンドリアを介した経路では、ROS がメディエーターとして機能することから、抗酸化剤等によりその作用を抑制できることが示された。また、サイトカインによるアポトーシスは、それぞれの受容体由来ペプチドにより、特異的に抑制された。さらに、担体に結合したペプチドにより、細胞膜上の受容体を介してアポトーシスを誘導できる可能性が示唆された。

(論文審査結果の要旨)

近年、細胞の増殖や分化だけでなく、細胞の自然死－アポトーシス－が多細胞生物の発生と恒常性の維持に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。したがって、アポトーシスの破綻は癌や自己免疫疾患、神経変性疾患などの重篤な病気を引き起こす原因となる。本論文では抗癌剤等の薬剤によるアポトーシス誘導経路の解明と、アポトーシスを誘導するリガンドとその受容体の構造情報に基づく方法、並びに網羅的な方法によりアポトーシスを制御する分子の設計をテーマとして、以下に示す成果を挙げた。

- (1) 抗癌剤 (アクチノマイシン D、H7、ダウノルビシン) によって誘導されるアポトーシスに活性酸素種が関与することを、カタラーゼや抗酸化剤を用いて初めて明らかにした。また、アクチノマイシン D によって誘導される活性酸素種が、ミトコンドリアからのチトクローム c の放出に関わることも明らかにした。
- (2) アポトーシスを誘導するリガンド (TRAIL) とその受容体 (DR5) の複合体の X 線結晶構造解析結果に基づいて受容体のリガンド結合部位を予測した。予測部位に相当する合成ペプチドは、リガンドによるアポトーシスを阻害したことから、結合部位の一つであることが示された。
- (3) さらに、リガンドとの複合体の構造が未知のアポトーシス受容体ファミリーに同様の予測を適用して得られた合成ペプチドが、各リガンド特異的にアポトーシスを阻害したことから、リガンド結合部位が受容体ファミリー間で保存されており、その特異性はアミノ酸の 1 次配列が決定しているという仮説を提案した。本仮説は他のリガンド－受容体系にも適用できると期待される。
- (4) 未知のアポトーシスリガンドの探索を網羅的に行う試みとして、ビーズ上に構築したランダムペプチドライブラリーを用いて、新規なアポトーシス誘導ペプチドを複数種見いだした。これらのペプチド分子は、担体との組合せにより、組織工学・再生医療への適用が期待されるものである。

以上のように本論文は、アポトーシスの誘導機構を分子レベルで詳細に解明することから、アポトーシスを制御する新規な分子の設計指針を与えるものであり、その独自性と有用性から、学術上および実用上の貢献が大である。よって、審査委員一同は本論文が博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認めた。