

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 櫻井 渚

題目: アポトーシス過程でゲルゾリンに生ずる翻訳後N-ミリストイル化反応の解析
(Analysis of posttranslational N-myristoylation occurs on gelsolin during apoptosis)

タンパク質 N-ミリストイル化は、炭素数 14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸がタンパク質 N 末端のグリシン残基にアミド結合を介して共有結合するタンパク質修飾の一種である。これまで N-ミリストイル化はタンパク質の翻訳途中に開始メチオニンが除去され、新しく露出した Gly 残基に「翻訳と同時」に生じると考えられてきた。しかし最近この N-ミリストイル化が「翻訳後」にも生じることがアポトーシス促進因子である Bid において証明された。Bid はアポトーシス過程で活性化したカスパーゼによって切断されると、分子内に埋もれていた Gly 残基が C 末端側フラグメントの N 末端に露出し N-ミリストイル化を受け、ミトコンドリアへ移行してアポトーシスを誘導する。しかしこれまでに翻訳後 N-ミリストイル化を生じることが示されたのは Bid のみであった。そこで翻訳後 N-ミリストイル化を生じる他のカスパーゼ基質の同定が試みられ、これまでに、細胞骨格タンパク質であるアクチンがアポトーシス過程において翻訳後 N-ミリストイル化を生じ、ミトコンドリアへ局在することが見出された。このアクチンに生じる翻訳後 N-ミリストイル化の機能解析を行う過程で、アクチン調節タンパク質であるゲルゾリンのカスパーゼ切断後の配列が N-ミリストイル化を指令することが見出され、ゲルゾリンに翻訳後 N-ミリストイル化が生じる可能性が強く示唆された。

そこで本研究では、アポトーシス過程でゲルゾリンに生じる翻訳後 N-ミリストイル化反応について解析を行った。まずゲルゾリンの全長およびそのカスパーゼ切断断片をコードする cDNA を用いて、ゲルゾリンがカスパーゼ切断に伴って翻訳後 N-ミリストイル化を生じるか否かを検討した。その結果 N-ミリストイル化シグナルを有する C 末端側フラグメント(t ゲルゾリン)に顕著な N-ミリストイル化が検出された。またゲルゾリンを遺伝子導入した細胞、あるいは内在的にゲルゾリンを発現している細胞を用いて解析を行った結果、そのいずれにおいても、アポトーシス処理により

N-ミリスチル化されたゲルゾリン切断フラグメントの顕著な増加が認められた。また免疫染色および細胞分画法により、t ゲルゾリンの細胞内局在を検討した結果、t ゲルゾリンは細胞質に局在することが示された。N-ミリスチル化を生じないtゲルゾリン G2A 変異体が野生型と同様細胞質に局在したことから、tゲルゾリンに生じる翻訳後 N-ミリスチル化はその細胞内局在に影響を与えないことが示された。以前からゲルゾリンやその C 末端側フラグメントの過剰発現によりアポトーシスが阻害されることが報告されていたことから、t ゲルゾリンの示すアポトーシス阻害活性に N-ミリスチル化が必要であるか否かを検討した。その結果、t ゲルゾリンを過剰発現させた COS-1 細胞はアポトーシスに高い抵抗性を示したのに対し、N-ミリスチル化を生じないtゲルゾリン G2A 変異体を過剰発現させた細胞はアポトーシスへの抵抗性を示さないことが明らかになった。以上、細胞骨格タンパク質ゲルゾリンに生じる翻訳後ミリスチル化反応について解析を行った結果、ゲルゾリンは、アポトーシス過程でカスパーゼ切断に伴い、その C 末端フラグメントである tゲルゾリンが翻訳後 N-ミリスチル化を生ずること、またこの tゲルゾリンの翻訳後 N-ミリスチル化は、細胞内局在ではなく、抗アポトーシス活性の発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

このゲルゾリンの翻訳後 N-ミリスチル化に関する研究から、これまで Bid に生ずる例外的な反応と考えられてきた翻訳後 N-ミリスチル化は、アポトーシス過程で生じる普遍的な反応である可能性が示唆された。しかし、これまでに、翻訳後 N-ミリスチル化を短時間で簡便に検出する手法は確立されていない。そこで翻訳後 N-ミリスチル化を簡便に効率良く検出する実験系の確立を行った。

最近開発された昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系は発現量が高く、N-ミリスチル化の検出法として利用できる可能性が示唆された。そこでこの昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系が N-ミリスチル化の検出に適しているか否かについて検討した。その結果、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系において、モデル N-ミリスチル化タンパク質の高い発現が確認され、免疫沈降といったタンパク質精製操作を行うことなく、わずか 10 時間という短時間で N-ミリスチル化を検出することが可能であることが示された。またこれまで自身の持つ細胞毒性のため、遺伝子導入細胞における代謝標識では翻訳後 N-ミリスチル化が検出できなかった tBid について検討した結果、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系では tBid は効率良く発現し、顕著な N-ミリスチル化が検出されることが明らかになった。以上の結果から、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系における代謝標識法は、翻訳と同時、あるいは翻訳後に生ずる N-ミリスチル化反応を、簡便に短時間で効率良く検出する手法として有用であることが示された。