

氏名(国籍)	趙 孝 先 (中 国)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 2280 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Apoptosis and Differentiation of Mouse Melanoma B16 cells Induced by Mannosylerythritol Lipid. (マンノシルエリスリトールリピドによるマウスメラノーマ B16 細胞のアポトーシスおよび分化誘導に関する研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 査	筑波大学教授 工学博士 松 村 正 利
副 査	筑波大学助教授 農学博士 宮 崎 均
副 査	筑波大学教授 理学博士 斎 藤 建 彦

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、微生物産生糖脂質の生物活性に着目した研究、特に動物細胞に対する生理活性の検討に行われ新しい知見が蓄積されつつある。例えば、Succinoyl trehalose lipid, Mannosyl erythritol lipid (MEL), Polyol lipid などの糖脂質がヒト白血病細胞株やラット神経系細胞株の分化を誘導することが見いだされ、糖脂質の構造と分化誘導活性との相関が物理化学的及び生物化学的視点から検討された。これらの研究の一環として、著者はMELがマウスメラノーマ B16 細胞にアポトーシスや分化を誘導することを発見し、さらに作用機構の解明を目指した研究を進めた。以下にその概要を述べる。

B16細胞をMEL処理することによって、クロマチン凝縮、DNAラダーが見られ、さらにフローサイトメトリ解析によりSubG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>ピークが観察されたことから、アポトーシス現象を確認した。微生物由来の糖脂質が癌細胞のアポトーシスを誘導することを認めたのは本研究が初めてである。そこで、アポトーシス誘導のメカニズムを解明するために以下の実験を行った。まず、フローサイトメトリを用いて細胞周期を解析した。10 μM MELで処理した細胞では、無処理の細胞に比べてG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期の細胞の割合が52%から84%に増加した。また、MELで処理したB16細胞は細胞周期のG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期でarrestされ、アポトーシスの誘導で示唆された。次に、アポトーシスの抑制遺伝子bcl-2をB16細胞に導入し、MELによるアポトーシス誘導が起こるか否かを調べた。ウェスタンブロッティングにより、導入したbcl-2遺伝子が発現しているB16細胞を選別し、そのbcl-2遺伝子を導入した細胞と、ベクターのみを導入した細胞をMELで処理すると、前者の細胞においては癌抑制効果が低く、アポトーシスを起こす細胞は著しく減少した。このことより、Bcl-2がB16細胞のMEL依存性のアポトーシス誘導を抑制していると推定した。MELによるB16細胞のアポトーシスにBcl-2が関与するシグナル伝達カスケードが関係していると考えられた。そこで、シグナル伝達系についてさらに検討を加えることにした。プロテインキナーゼC (PKC) は細胞増殖、分化およびアポトーシスに重要な役割を持つといわれているので、MEL処理した場合のPKC活性の変動を調べた。アポトーシスを誘導できる濃度のMELでB16細胞を処理すると、その細胞のPKC活性が減少した。さらにPKCの活性物質であるフォルボールエステルPMAはMELによるアポトーシス誘導に対し拮抗作用を示した。このことから、MEL依存性のシグナルはPKCの活性調節と密接に関係していると思われる。続いて、B16細胞のアポトーシスを

誘導できない濃度のMELで処理すると、メラニン産生量とメラニン産生の鍵酵素であるチロシナーゼの活性が無処理の細胞に比べて増加した。同時にPKC  $\alpha$  の発現量も増加した。一方、MELのこの効果はPKC  $\alpha$  に特異的なアンチセンスオリゴマーの添加により減少した。また、B16細胞においてPKC  $\alpha$  遺伝子を強制的に発現させると、MEL無処理でもメラニン産生量が上昇した。これらによりPKC  $\alpha$  がMELによるB16細胞の分化誘導において重要な役割を果たしていることが推察された。

以上の研究は、微生物産生糖脂質であるマンノシルエリスリトールリポドがメラノーマ細胞にアポトーシスおよび分化を誘導することを明らかにし、そのメカニズムについて考察した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、微生物が産生する菌体外糖脂質マンノシルエリスリトールリポド (MEL) のマウスメラノーマB16細胞に対する生理活性に関し知見を得ることを目的としている。動物由来の糖脂質の生物活性に関しては、スフィンゴ糖脂質に属するある種のガングリオシドや中性糖脂質が、外来性で白血病細胞や神経芽腫細胞を分化誘導することが見出され、医薬品としての応用も期待されている。これらのことを背景に、微生物由来の糖脂質の癌細胞に対する生物活性を明らかにすることは、極めて興味深い。

まず、薬剤治療に対して抵抗性を示すメラノーマに対するMELの分化誘導性を調べた。B16細胞をMELで処理することにより、クロマチン凝縮、DNAラダーを認め、さらにフローサイトメトリ分析の結果、SubG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>ピークが観察されたことから、MELがB16細胞にアポトーシスを誘導することを世界に先駆けて発見した。また、そのアポトーシスは、MELで処理したB16細胞が細胞周期のG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期でarrestして誘導されることを明らかにしている。さらに、アポトーシスの抑制遺伝子bcl-2をB16細胞に導入することで、MELによるB16細胞のアポトーシス誘導が抑えられ、その結果、MELのアポトーシス誘導がBcl-2の関与するシグナル伝達カスケードと関係していることを見出している。MELによるB16細胞の分化誘導に関しては、B16細胞のMEL処理により、メラニン産生量とメラニン産生の鍵酵素チロシナーゼが増加すること、同時にPKC  $\alpha$  (プロテインキナーゼ) の発現量も増加することなどの観察結果から、PKC  $\alpha$  が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

本研究は、微生物産生糖脂質のMELがマウスメラノーマB16細胞にアポトーシスおよび分化を誘導することを発見し、さらに、MELが引き起こすシグナルカスケードを分子レベルで解析し、新たな知見を加えており、基礎と応用の両面から高く評価できる。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。