

氏名(本籍)	白岩伸子(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,413号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	細胞死を制御する遺伝子に関する研究 — <i>bcl-2</i> 関連遺伝子 <i>bcl-x</i> および変異ミトコンドリア DNA についての解析—
主査	筑波大学教授 医学博士 岡野 栄之
副査	筑波大学教授 医学博士 白石 博康
副査	筑波大学教授 医学博士 藤井 敬二
副査	筑波大学教授 医学博士 三輪 正直
副査	筑波大学助教授 医学博士 金子 道夫

論 文 の 要 旨

〈目的〉

アポトーシスは当初、発生分化の過程におけるプログラム細胞死に見られる細胞死として注目されてきたがその後、発生分化だけでなく、アルツハイマー病などの神経変性疾患における神経細胞死も、アポトーシスとの関連が示唆されるようになってきている。ヒト濾胞性B細胞リンパ腫における癌遺伝子として発見された *bcl-2* は、アポトーシスを抑制する遺伝子としては初めて見出されたものである。*bcl-2* の研究が進む中で細胞系や致死条件によっては *bcl-2* で抑制されないアポトーシスも存在することが明らかとなり、アポトーシスに複数のシグナル伝達系が存在することが示唆された。本研究は、この *bcl-2* 以外のアポトーシスのシグナル系を同定する目的で、*bcl-2* 類似遺伝子のクローニングを試み、機能解析を行ったものである。さらに、細胞死とミトコンドリア異常の関連を明らかにするために、ミトコンドリア脳筋症の分子生物学的検討を行った。

〈実験・結果・考察〉

(1) *bcl-2* 類似遺伝子をクローニングするために、*bcl-2* の cDNA をプローブとして、緩和な条件でラット胸腺 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、3種類の cDNA, *bcl-x α* , *bcl-x β* , *bcl-x γ* を単離した。ラット *bcl-x* の遺伝子構造を分析した結果、これらは一個の機能的遺伝子の選択的スプライシングにより形成されることを明らかにした。ラットでは、ヒトでは存在しない *bcl-x γ* 型の偽遺伝子が存在した。*bcl-x α* は、188アミノ酸残基の5'コード領域と45アミノ酸残基の3'コード領域から成り、*bcl-x γ* は、*bcl-x α* の5'コード領域から63アミノ酸残基がスプライス除去されて欠損した型で、この63アミノ

酸残基には *bcl-2* ファミリー間で高度に保存されている領域である domain I 及び domain II の前半部分が含まれていた。一方, *bcl-x β* は, *bcl-x α* と共通の188アミノ酸から成る5'コード領域の3'側に44アミノ酸の β 特異的領域を持った非スプライス型であり, domain I は持つが domain II の後半部分が欠損した構造を有することが明らかになった。

本研究において同定されたラット *bcl-x β* は, これまでに他種 (ヒト) で相同分子の構造と機能についての報告がある *bcl-x α* , *bcl-x γ* (Boise et al., 1993) とは異なる新しい型であり, その機能が全く未知であるため, アポトーシスにおける機能を, IL-3依存性の血球系細胞 FDC-P1 に導入することにより検討した。*bcl-x α* の過剰発現は, *bcl-2* と同様に, IL-3 除去によって FDC-P1 細胞におこるアポトーシスを抑制した。それに対して, *bcl-x β* の過剰発現はアポトーシスの指標である DNA 断片化を促進したが, IL-3 を除去してから一定時間後の生細胞数には影響を与えなかった。この結果は, *bcl-x β* が, アポトーシス促進と同時に細胞増殖が維持されていることで説明できるため, 次に, *bcl-x β* 遺伝子産物の細胞周期制御における作用を解析した。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析により, *bcl-x β* 発現細胞では, IL-3 の除去後 S 期に属する細胞の割合が増加していることが明らかとなった。また, *bcl-x α* , *bcl-x β* , *bcl-x γ* それぞれの mRNA 発現を定量化し, 組織分布および成長に伴う変化を検討した。*bcl-x β* は生体の小脳および心筋に比較的高い発現が認められた。神経細胞や心筋は寿命の長い細胞であり, 細胞分裂しないために *bcl-x β* による細胞死の促進の効果が現れていない可能性が考えられた。

Bcl-2 および Bcl- x_{α} 蛋白質の細胞内局在性を知ることは細胞における作用部位を特定する上で重要であると考えられるため, 細胞分画法とウエスタンブロット法により検討を加えた。その結果, Bcl-2 はミトコンドリア外膜に存在する蛋白質であり, Bcl- x_{α} も少なくともミトコンドリア分画に検出されることが明らかとなった。

(2) 細胞死を制御する Bcl-2 および Bcl- x_{α} 蛋白質がミトコンドリアに存在し, ミトコンドリアの機能が細胞死のステップに関与している可能性が多いため, ミトコンドリア異常症であるミトコンドリア脳筋症についての検討を行った。ミトコンドリア脳筋症の一型である MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) では, ミトコンドリア DNA の tRNA^{Leu} (UUR) の塩基番号3243の塩基置換が原因遺伝子として知られている。PCR 法を応用することにより, 3243変異 mtDNA の定量法 (相対比) を確立し, MELAS 患者剖検例で変異 mtDNA の定量を行った。本例において, 変異 mtDNA は, 全身の臓器に広く分布し, その比率は22%から95%まで多様性を示した。脳においては大脳皮質, 下垂体に症状と比例して高い比率であることが認められたため, 変異 mtDNA の比率と臨床的な表現型との関連が示唆された。

審 査 の 要 旨

本研究は, アポトーシス関連遺伝子 *bcl-x* の選択的スプライシングによって形成される新しい型で

ある *bcl-x β* を世界で初めて同定し、遺伝子構造および発現について十分な検討を加えている。また、その遺伝子産物の IL-3 依存性細胞における作用を検討し、*Bcl-x β* は、アポトーシスを促進すると同時に、IL-3 非存在下でも細胞増殖を維持する作用があることを明らかにした。これらの点があポトーシスを制御する機構を解明する上で新しい知見を加えたとして評価された。アポトーシス全般、*bcl-2* その他のアポトーシス関連遺伝子についても十分な知識を備えていた。また、ミトコンドリア脳筋症の一型、MELAS における 3243 変異 mtDNA の定量化（相対比）を PCR で簡便に行う方法を確立し、MELAS 患者の全身の組織での分布を検討した。比率の多様性、脳における変異 mtDNA の比率が臨床的な表現型と相関する可能性を示唆したことが、評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。