

| | |
|-------------|---|
| 氏名 | 伊賀 正年 |
| 学位の種類 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 博甲第903号 |
| 学位授与の日付 | 平成19年3月22日 |
| 学位授与の要件 | 課程博士(学位規則第4条第1項) |
| 学位授与の題目 | Nongenomic action of 20-hydroxyecdysone in ecdysteroid-induced programmed cell death (エクジステロイド誘導性予定細胞死における20-ヒドロキシエクジソンの nongenomic 作用) |
| 論文審査委員(主査) | 櫻井 勝(自然科学研究科・教授) |
| 論文審査委員(副主査) | 岩見 雅史(自然科学研究科・教授), 山口 正晃(自然科学研究科・助教授), 福森 義宏(自然科学研究科・教授), 東 浩(自然科学研究科・助教授) |

20-hydroxyecdysone (20E) induces the programmed cell death (PCD) in anterior silk glands of *Bombyx mori*. Since 20E acts through binding to nuclear heterodimeric ecdysone receptor, EcR/USP, which serves as a transcription factor, 20E-induced PCD has been considered to begin with *de novo* gene expression. However, I show that the 20E actions in the PCD, it is possible to distinguish the nongenomic action from genomic ones by using protein synthesis inhibitors. The conventional genomic action of 20E, acting *via* EcR/USP, is mainly involved in inducing the changes in cellular morphology, such as cell shrinkage and apoptotic body formation. On the other hand, the nongenomic action of 20E appears to be responsible for the induction of nuclear condensation, DNA fragmentation and nuclear fragmentation. The nongenomic action begins presumably with the binding of 20E to a putative membrane ecdysone receptor, followed by an increase in intracellular Ca^{2+} mainly caused by the release from endoplasmic reticulum. The elevation of Ca^{2+} level activates PKC and activation of caspase-3 like protease, which gives rise to the DNA and nuclear fragmentation, while nuclear condensation is not under the control of PKC and caspase-3 like protease signaling pathway. Thus, the 20E-induced PCD is accomplished through the integration of genomic and nongenomic actions.

ステロイドホルモンは多くの生理的な調節に関わる重要なホルモンであり、その分子レベルでの作用として、遺伝子の新規発現から始まる genomic な機構がよく知られている。脂溶性であるステロイドホルモンの多くは拡散により細胞膜を通過し、細胞質または核に存在する受容体タンパク質と結合する。ホルモンが結合すると受容体の立体構造に変化が起き、受容体は活性型となる。活性型受容体は転写調節因子として働き、特定の塩基配列を持った DNA に結合し、転写を活性化、もしくは抑制する。しかし、genomic な作用だけでは説明できない細胞応答があるこ

とが数十年前から知られており、ステロイドホルモンの nongenomic な作用が想定されてきたものの、近年に至るまで推測の域を出なかった。

昆虫にもステロイドホルモン（エクジステロイド）が存在し、胚発生、幼虫の成長、脱皮、変態、休眠、卵成熟などを調節する。前胸腺で合成されたエクジソンは、生体内で活性型エクジソンである 20-ヒドロキシエクジソン（20E）に変換され作用を示す。完全変態昆虫であるカイコガの成長と発生は脱皮ホルモンである 20E と幼若ホルモン（JH）の体液中の濃度変動により複雑に調節されている。JH と 20E 共在下では幼虫脱皮が誘導されるが、20E 単独存在下では変態が誘導される。幼虫から成虫への変態に際し、幼虫特異的な組織は 20E に応答して予定細胞死（PCD）により崩壊・除去される。その様な組織にはタバコスズメガの節間筋や運動ニューロン、ショウジョウバエの唾液腺、そしてカイコガの絹糸腺などがある。カイコガ絹糸腺は、前部、中部、後部の 3 つの部域に分けられる。前部絹糸腺（ASG）は管状の組織で中部・後部絹糸腺で作られた液状絹タンパク質から絹糸を紡ぐための器官である。繭を紡ぎ終えた後、その役割を終えた絹糸腺は前蛹期に PCD により崩壊・除去される。前部絹糸腺（ASG）の PCD は、膜のプレッキングから始まり、細胞間隙の拡大と細胞収縮、核凝縮、DNA 断片化、核断片化およびアポトーシス小胞形成という順序で進行する。繭を作り始めた幼虫の ASG を 1 μ M の 20E と共に培養すると *in vitro* で PCD が再現できる。この際に誘導される PCD は細胞形態の段階的変化を伴って進行し、形態上の相違により、その進行度合いは 0-6（Score 0-6）の 7 段階に分類されている。20E はヘテロ 2 量体のエクジソン受容体（EcR/USP）に結合することで転写因子として働くため、これまで 20E 誘導性 PCD は *de novo* 遺伝子発現から始まると考えられていたが、その実験的検証はなされていなかった。

In vitro において、転写阻害剤の α -アマニチンを 20E 刺激後差時的に加えていくと、6 時間では PCD は完全に抑制されるが、8 時間では抑制されないことがこれまでに報告されている。すなわち、PCD に必要な遺伝子発現は 20E 刺激後 8 時間で完了することが示唆される。しかし、PCD の完了には 20E 刺激が 42 時間必要であることより、20E 刺激後 8 時間から 42 時間の間における 20E の nongenomic な作用が予測される。そこで、タンパク質合成阻害剤を用いて 20E による genomic 作用と nongenomic 作用の分離を試みた。シクロヘキシミド（CHX）はタンパク質合成阻害剤であると共に、細胞死の誘導剤としても作用することが知られており、ASG においても 2 mM で DNA と核の断片化が誘導された。0.2 mM CHX では PCD 誘導効果は全くないが、タンパク質合成は 2 mM と同程度に阻害した。そこで、20E 刺激と同時に 0.2 mM CHX を加え、タンパク質合成を阻害した条件下での PCD の進行を見たところ、20E 誘導性 PCD において見られる細胞形態変化は見られなかったが、DAPI による核染色像は核が凝縮を経て断片化されていることを示し、DNA の断片化も認められた。これらの結果より、20E の genomic 作用が細胞形態変化に、nongenomic 作用が核凝縮および DNA・核の断片化に関与していることが示唆された。

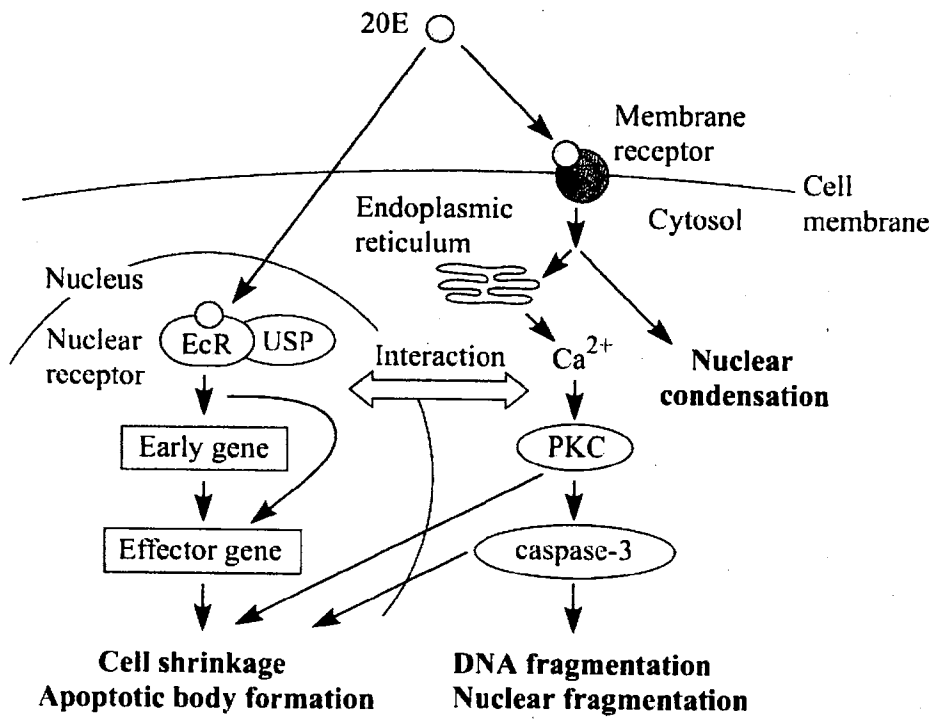
昆虫の PCD におけるシグナル伝達経路は、哺乳類ほど解明されていない。しかし、キイロシ

ヨウジョウパエを中心に研究は進んでおり、PCDに関係する因子のホモログが次々と明らかになりつつある。そこで、薬理学的手法を用いて20E誘導性PCDに関与する因子について検討を行った。種々のタンパク質リン酸化酵素阻害剤を20Eと共に加えた結果、MEK阻害剤、PKA阻害剤、JNK阻害剤は全く影響が見られなかった。しかし、PKC阻害剤は核凝縮を抑制しなかったものの、細胞形態変化および核・DNA断片化の両方を阻害したことから、20Eのシグナル伝達経路にPKCが関与していることが示唆された。この結果は、PKC下流でのnongenomicな経路とgenomicな経路間のクロストークの存在を示唆する。また、PKC阻害剤を20E刺激後24時間で加えると細胞死は抑制されるが、48時間で加えても、細胞死の進行には影響がないことより、PKCは20E刺激後24時間から48時間の間に活性化されると考えられる。これらの結果は、PKCが前部絹糸腺PCDにおける20Eのnongenomic作用に関与していることを示唆する。アポトーシスシグナル伝達経路で中心的な役割を果たすcaspase-3の活性を経時的に測定したところ、その活性は20E刺激後72時間から上昇しはじめ、96時間でピークに達した。このピークはDNA・核の断片化が起きる約24時間前にあたり、caspase-3がnongenomicな経路を介した、DNA・核断片化に深く関与していることが示唆される。さらに、caspase-3阻害剤の影響を調べたところ、細胞収縮は誘導されたがアポトーシス小胞形成は阻害され、核凝縮過程は20Eのみの場合と同様に進行したが、DNA・核の断片化は生じなかった。したがって、DNA・核の断片化過程はcaspaseにより仲介されていることが分かり、caspase-3下流でのnongenomicな経路とgenomicな経路間のクロストークの存在が示唆される。一方、核凝縮はいずれの阻害剤によっても抑制されないことより、PKCとcaspase-3による調節を受けないと考えられる。この様に20E作用の下流にnongenomicなPKCとcaspaseを介したDNA・核の断片化を誘導するシグナル伝達経路の存在が示唆された。

上記の結果より、膜受容体を介したnongenomicな20Eシグナル伝達経路が想定される。そこで、各種セカンドメッセンジャー誘導體 (dbcAMP、dbcGMP、カルシウムイオノフォア、ホルボールエステル)を用いて20Eのnongenomic作用に関与するセカンドメッセンジャーの同定を試みた。いずれのセカンドメッセンジャー誘導體を培養開始時より作用させても20E作用はmimicされなかった。しかし、18時間の20E刺激を与えたASGにカルシウムイオノフォアを作用させ、細胞内Ca²⁺上昇を誘導した場合においてのみ20E作用が部分的にmimicされ、DNA・核の断片化が誘導された。その際、caspase-3活性の上昇を伴い、DNA・核の断片化がPKC阻害剤により抑制されたことより、20E誘導性PCDにおいてCa²⁺がセカンドメッセンジャーとして働くことが示唆された。一方、18時間の20E刺激時に0.2 mM CHXを加えタンパク質合成を阻害すると、その後の細胞内Ca²⁺上昇による20E作用のmimicが見られなくなることより、細胞内Ca²⁺上昇による20E作用のmimicには20E刺激によるタンパク質合成が必要であることが示唆された。この様に、genomic作用とnongenomic作用との相互作用が示唆され、Ca²⁺をセカンドメッセンジャーとするPKC-caspase-3を介したシグナル伝達経路の存在が示唆された。

これまで20EによるPCDは、核受容体系を介した単一の経路によるものと考えられてきた。

しかし、上記の結果よりカイコガ ASG における 20E 誘導性 PCD は、核受容体経由の genomic な細胞形態変化、および膜受容体経由の nongenomic な核凝縮、Ca²⁺、PKC、caspase-3 を介した DNA・核の断片化という異なる細胞現象が統合され、完了することが示唆された。



カイコガ前部絹糸腺 PCD における 20E シグナルモデル

学位論文審査結果の要旨

昆虫の成長と変態はステロイドホルモンである 20-ヒドロキシエクジソン (20E) により調節されている。20E は核受容体複合体 (EcR/USP) と結合して転写因子として作用し、初期遺伝子の発現とそれに続く後期遺伝子の発現を調節し、その効果を示す。しかるに近年、20E の分子作用として、核受容体を介さない作用 (nongenomic 作用) 機構があることが示唆されてきた。論文提出者は前部絹糸腺の予定細胞死における 20E 作用をモデルとし、この nongenomic 作用に関わる細胞内シグナル伝達について研究を行った。その結果、20E は想定膜受容体に結合した後、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに続く protein kinase C の活性化、ついで caspase-3 like protease の活性化を介して、核の断片化と DNA の断片化を誘導することを明らかにした。加えて、想定膜受容体から始まるシグナル伝達系の賦活化には、20E 核受容体を介した genomic 作用が不可欠であることも示した。このような細胞内 Ca^{2+} の上昇から始まる nongenomic 作用が、ステロイドホルモン誘導性予定細胞死の重大な一局面を担うとの発見は、ユニークである。以上の結果は、昆虫における最も重要なホルモンである 20E の分子作用に新たな視点を加えるのみならず、ステロイドホルモンの分子作用の研究に新たな切り口を提案するものであり、審査員一同は、本論文は学位 (理学) を授与するに足るものと判断した。