コンカナマイシン A による B 細胞アポトーシスの解析

秋 房 住 郎

九州歯科大学大学院歯学研究科口腔衛生学講座専攻 (指導: 竹原直道教授)

平成 8 年 10 月 25 日受理

Concanamycin A Specific Inhibitor of Vacuolar Type H^+ -ATPases Induce B Cell Apoptosis.

Sumio Akifusa

Department of Preventive Dentistry (Director: Prof. Tadamichi Takehara)
Kyushu Dental College Kitakyushu Japan

Apoptosis is a crucial element in the behaviour of mammalian cells in many different situations. Firstly we show that the cell death of WEHI-231 cells induced by specific inhibitors of vacuolar type H^+ -ATPases (V-ATPases), concanamycin A, occurs through apoptosis. CD40 is involved in regulating B cell activation and differentiation, including blocking apoptosis of germinal center of B cell. It is well known that ligation of CD40 by antibody or soluble CD40 ligand (CD40L) rescues anti-IgM-induced apoptotic cell death of murine WEHI-231 B lymphoma cells. In this study, we examined the role of CD40-CD40L interaction in controlling B cell apoptosis mediated by concanamycin A. Here we show that CD40 is linked to induction of Bcl-2 and Bcl-XL proteins of WEHI-231 cells. CD40 ligation was found to rescue apoptotic cell death of WEHI-231 cells induced by concanamycin A as shown by a decrease in the proportion of fragmented DNA. In addition, gel electrophoresis of cellular DNA showed that CD40 ligation strongly suppressed concanamycin A-induced apoptosis in WEHI-231 cells. WEHI-231 cells overexpressing Bcl-2 were resistant to apoptosis induced by concanamycin A. However, overexpression of Bcl-XL was unable to block concanamycin A-induced apoptosis in WEHI-231 cells. These results suggest that constitutive expression of Bcl-2, but not Bcl-XL, induced by CD40 signaling in WEHI-231 cell is a key modulator in apoptotic cell death induced by V-ATPases inhibitor, concanamycin A.

Key words: Apoptosis / Concanamycin A / CD40 / Bcl-2 / Bcl-XL

緒 言

液胞型プロトン ATPases (vacuolar type H^+ -ATPases; 以下, V-ATPases と略す.) はゴルジ装置, ライソソーム, エンドソーム, シナプス小胞, 分泌顆粒など, 真核細胞の種々の細胞内膜系に広く存在する^{1,2)}.

V-ATPases はこれら細胞内小器官の酸性化の保持や, 生合成, 分泌, また細胞内 pH の調節など, 細胞が生命活動を営む上で重要な役割を担っている^{1,2)}. V-ATPases 以外の真核細胞におけるプロトン ATPases については, これまでにミトコンドリア内膜上に存在する F_0F_1 -ATPases, 形質膜上に存在する E_1E_2 -ATPases の

存在が知られている^{3,4,5)}。分子生物学的研究が進展し、これらのプロトン ATPases の機能および構造が明らかにされていく過程で、V-ATPases の構造は F₀F₁-ATPases に類似しているものの種々の阻害剤に対する感受性が異なるという事実が示された¹⁾。

近年、いくつかの V-ATPases に対する特異的阻害剤が分離・同定されたことにより、V-ATPases の機能に関して多くの知見が集積されてきた。そのなかで、バフィロマイシン A₁ とコンカナマイシン A はそれぞれ *Streptomyces* 属、*Actinomyces* 属から分離された抗生物質であり、in vitro, in vivo の実験系で強力に V-ATPases の活性を特異的に阻害することが示された^{6,7)}。たとえば、バフィロマイシン A₁ は 500nM で細胞内酸性顆粒の酸性化を著しく阻害する。一方、コンカナマイシン A はバフィロマイシン A₁ に比べ、V-ATPases に対してより強い阻害活性を示すことが報告されている⁷⁾。

多細胞生物において、その生命維持に無用もしくは有害な細胞はその発生過程で死滅する。制御された細胞除去機構であるアポトーシスはこの細胞の発生、分化過程において重要な役割を果たしていることが、近年多くの研究により明らかにされてきた⁸⁾。アポトーシスに陥った細胞は、細胞の萎縮、微絨毛の消失、細胞質の泡状化、細胞膜の萌芽、クロマチンの濃縮や断片化など、いくつかの形態学的特徴を示す。また、活性化された細胞内エンドヌクレアーゼ活性によりクロマチンがリンカー部分で切断されるが、この現象がアポトーシスの生化学的特徴とされている⁹⁾。最近では遺伝子レベルの解析も進み、アポトーシスに関与する遺伝子が次々に明らかにされてきた。このような一連の研究の進展にともない、アポトーシスの概念も変化し、アポトーシスを起こす細胞は自らを殺す機構を有しており、それを抑制するシグナルにより生存しうる状態に維持されているという考え方が提唱されている⁸⁾。

Bcl-2 遺伝子は、t(14; 18) 染色体転座によって活性化されるがん遺伝子として、ヒト濾胞性リンパ種から発見された¹⁰⁾。この遺伝子は、26kDa の膜親和性のタンパクをコードすることが知られている。Vaux ら (1988)¹¹⁾ は、IL-3 などの成長因子依存性細胞株は成長因子を除去するとアポトーシスに陥るが、*Bcl-2* を導入した細胞は成長因子を枯渇させても、細胞分裂は停止するものの細胞死に陥らないという事実を示した。この報告以来、アポトーシスに対する遺伝子産物 *Bcl-2* の抑制機序の研究は急速に進み、多くの *Bcl-2* ホモログが同定された。そのうちの一つである *Bcl-X* はスプライシ

ングの違いにより長鎖の *Bcl-X_L* と短鎖の *Bcl-X_S* をコードする¹²⁾。*Bcl-X_L* は *Bcl-2* の持つ BH1 および BH2 (*Bcl-2*-homology 1, 2) 領域を持ち、*Bcl-2* と機能的相同性を持つ。一方、*Bcl-X_S* は BH1, 2 を欠き、*Bcl-2* とは逆にアポトーシスを促進する。*Bax* は *Bcl-2* ホモログであるが、その遺伝子産物 *Bax* は、*Bcl-2* とヘテロダイマーを形成することで *Bcl-2* に機能的拮抗作用を示す。*Bax* の組織分布が広範囲ということもあり、細胞の寿命は *Bcl-2*、*Bcl-X_L* などの抗アポトーシス分子の発現の強弱で規定されると考えられている¹³⁾。

CD40 は、腫瘍壊死因子受容体 / 神経成長因子受容体ファミリーに属し、未成熟および成熟 B 細胞に発現されている分子量 40-50 kDa のタンパクである¹⁴⁾。CD40 リガンド (CD40L) は II 型膜貫通型の糖タンパクで、腫瘍壊死因子 / 神経成長因子ファミリーに属し、活性化 T 細胞上に発現されている¹⁵⁾。近年、CD40 および CD40L 欠損マウスが作製され、免疫機構における CD40 と CD40L を介したシグナルの重要性が指摘された¹⁵⁾。これらのマウスは、免疫グロブリンのクラススイッチングの機能に障害が生じ、さらに T 細胞依存性抗原による免疫後の胚中心の形成不全を引き起こしていた。これらの事実から、生体における CD40-CD40L を介したシグナルの重要性が、B 細胞と T 細胞間の情報伝達系において再確認された¹⁷⁻²²⁾。一方、in vitro の実験系で、可溶性 CD40L もしくは抗 CD40 モノクローナル抗体との架橋反応により、B 細胞のアポトーシス発現が抑制されることが示され、B 細胞の成熟分化過程における負の選択において CD40-CD40L を介したシグナルが重要な役割を担っている可能性が示された²³⁻²⁸⁾。しかし、CD40-CD40L による細胞内シグナル伝達機構の詳細に関しては、アポトーシス阻害機序を含めて不明な点が多い。

今回、コンカナマイシン A により B 細胞株 WEHI-231 細胞に発現されたアポトーシスを分子細胞学的手法を用いて解析し、さらに CD40-CD40L シグナルにより引き起こされたアポトーシス抑制機構を *Bcl-2*、*Bcl-X_L* との関連について検討したところ、興味ある知見が得られたのでここに報告する。

材料および方法

I. 試薬

コンカナマイシン A は和光純薬 (大阪) より購入し、ジメチルスルホキシドに溶解して 1 mM に調製したものをを用いた。抗マウス IgM ポリクローナル家兎抗体

表1 Bcl-2 及び Bcl-X_L を過剰発現した WEHI-231 細胞のトランスフェクタント

WEHI-231 細胞のトランスフェクタント ¹⁾		導入遺伝子 ²⁾
WEHI-231-Bcl-2	クローン 1 クローン24	pSFFV-Neo-FLAG-Bcl-2
WEHI-231-Bcl-X _L	クローン 3 クローン69	pSFFV-Neo-FLAG-Bcl-X _L
WEHI-231-Neo	クローン20	pSFFV-Neo

- 1) 電気穿孔法で遺伝子を導入して作製された WEHI-231 細胞のトランスフェクタントは、ミシガン大学の Merino 博士から分与された。
- 2) pSFFV-Neo-FLAG-Bcl-2; ヒト Bcl-2 過剰発現プラスミド
pSFFV-Neo-FLAG-Bcl-X_L; ヒト Bcl-X_L 過剰発現プラスミド
pSFFV-Neo; ベクターコントロールプラスミド

(抗 IgM 抗体) は Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, Ala., U. S. A.) より購入したものを用いた。抗マウス CD40 モノクローナル抗体 (抗 CD40 抗体) は Pharmingen (San Diego, Cal., U. S. A.) より購入したものを用いた。

II. 供試細胞ならびに培地

マウス B 細胞株である WEHI-231 細胞は、京都大学の鰐田博士から分与された。WEHI-231 細胞の培養は RPMI 1640 培地 (GIBCO Laboratories, Grand Island, N. Y., U. S. A.) に 10% 牛胎児血清 (fetal calf serum; FCS), 100U/ml ペニシリン G, 100μg/ml ストレプトマイシン, および 50μM 2-メルカプトエタノールを添加したもの (以下, これを 10% FCS-RPMI 1640 培地とする) を用いて, 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。表1に示した WEHI-231 細胞トランスフェクタントはミシガン大学の Merino 博士から分与を受けた。これらの細胞は, 10% FCS-RPMI 1640 培地に 1.5mg/ml G418 (GIBCO Laboratories) を添加した選択培地で培養した^{29, 30)}。

III. 細胞生存率測定法 (MTT 法)

10% FCS-RPMI 1640 培地で 6×10^5 /ml に調製した細胞懸濁液を 96 穴タイタープレート各穴に 50μl ずつ播種した。RPMI 1640 培地にてさまざまな濃度に調製したコンカナマイシン A を 50μl 加え, 44 時間 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。次に, リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS, pH 7.2) で 3-[4,5-dimethylthazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mont., U. S. A.) を 2.5mg/ml に調製した溶液 (MTT 溶液) を各穴に 20μl 添加し, 4 時間 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。培養終了時に, 0.04N HCl 添加イソプロパノ

ールを加え十分混和して室温で 5 分間静置した後, 分光光度計 (Multiskan Biochromatic microplate reader; Labsystems, Helsinki, Finland) を用い, 計測側 570 nm, 対照側 620nm の 2 波長で測定した³¹⁾。

IV. アポトーシス細胞の検出方法

A. フローサイトメトリーによる検出

5% FCS-RPMI 1640 培地で 3×10^5 /ml に調製した細胞に 5 nM のコンカナマイシン A を加え 37°C, 5% CO₂ 存在下でそれぞれ 0, 8, 16 および 24 時間培養した。細胞を回収後, 1 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に 3.4 mM クエン酸, 0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 50μg/ml ヨウ化プロピディウム (propidium iodide; PI; GIBCO Laboratories) を添加した溶液 (PI 溶液) で細胞を懸濁した後, 氷上で 1 時間静置した。試料をメッシュに通した後, FACScan® (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Cal., U. S. A.) で核内 DNA 量を測定した³²⁾。

B. DNA 断片化検出法

WEHI-231 細胞 (5×10^5 /ml) を 5% FCS-RPMI 1640 培地中に各試薬を添加し, 37°C, 5% CO₂ 存在下で 18 時間培養した。遠心処理により細胞を回収した後, あらかじめ 4°C に冷やしておいた核抽出液 (10mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) 1 ml で懸濁した。氷上に 20 分間静置した後, リボヌクレアーゼ 10μg を添加して, 37°C で 1 時間反応させた。さらにプロティナーゼ K 1μg を添加し 37°C で 1 時間反応させた後, 細胞内 DNA をフェノール/クロロフォルムで抽出した。抽出した DNA はエタノール沈澱後, 50μl TE 緩衝液 (10mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.0, 1 mM EDTA) で溶解し, 2% アガロースゲルで

電気泳動を行った。泳動は、TBE (90mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.0, 5.5 g/l ほう酸, 2 mM EDTA) 緩衝液を用い、Mupid-2 (コスモ・バイオ株式会社, 東京) を用いて 100V の定電圧で泳動した。臭化エチジウムで染色した後、紫外線イルミネーター上で断片化 DNA 像を観察し、ポラロイド写真を撮影した³⁰⁾。

C. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nicked end labeling (TUNEL) 法

TUNEL 法での検出は In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Boehringer GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行った。5% FCS-RPMI 1640 培地で 3×10^5 /ml に調製した WEHI-231 細胞を 2.5nM のコンカナマイシン A とともに 37°C, 5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。これを 1% 牛血清アルブミンを添加した PBS で 2 回洗浄し、100μl の PBS で懸濁した。最終的に 4% となるようにパラフォルムアルデヒドを細胞懸濁液に加えてよく混和した後、室温で 30 分間静置した。300xg で 10 分間遠心し、上清を除去した後、200μl の PBS で一度洗浄した。細胞を 100μl の 0.1% Triton X-100 添加 0.1% クエン酸ナトリウム溶液で懸濁し 2 分間氷上に静置した。これを 200μl の PBS で 2 回洗浄後、50μl の TUNEL 反応液で懸濁した。湿潤状態の暗所で 37°C, 60 分間反応させた後、細胞を 200μl の PBS で 2 回洗浄し、さらに、細胞試料を 500μl になるように PBS で懸濁した後、メッシュを通し FACSscan[®] で解析した。

V. 透過型電子顕微鏡による観察

3×10^5 /ml に調製した WEHI-231 細胞を 24 時間培養した後、通法に従い作製した各細胞試料を透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

I. コンカナマイシン A により WEHI-231 細胞に発現されたアポトーシスについて

A. MTT 法による検討

MTT 法は、淡黄色色素 MTT の tetrazolium 環を生細胞のミトコンドリアにあるコハク酸脱水素酵素が開裂し、不溶性の暗青色色素 MTT formazan をつくる反応を利用して生細胞を検出する方法である³¹⁾。そこで MTT 法を用いてコンカナマイシン A の WEHI-231 細胞の生存に及ぼす影響を調べた。図 1 に示すように、10 nM のコンカナマイシン A とともに WEHI-231 細胞を 48 時間培養すると、著しい生存率の低下が認められた。

B. フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

図1 コンカナマイシン A が WEHI-231 細胞の生存率に及ぼす影響

WEHI-231 細胞 (3×10^5 /ml) にさまざまな濃度のコンカナマイシン A を加えて 48 時間培養した。培養終了 4 時間前に MTT 溶液を加え、さらに培養を行った。0.04N 塩酸添加イソプロパノールで発色させた後、570nm および 620nm の 2 波長で測定した。

フローサイトメトリーを用いた細胞周期の解析は、細胞数が少なくすむことや、細胞周期の各時期の割合が算出されることから、近年汎用されている。さらにアポトーシス細胞がハイポディプロイド DNA を有していることからアポトーシスの研究にも有効な手段となっている。5 nM のコンカナマイシン A で処理した WEHI-231 細胞をそれぞれ 0, 8, 16, 24 時間培養した後、核内 DNA 量を測定し、アポトーシスを引き起こした細胞の比率および各細胞周期の細胞の比率を算出した。コンカナマイシン A で処理した群では、ハイポディプロイド DNA を有する核の割合が 24 時間で 9.7% から 56.2% まで増加した。一方、DNA 合成準備期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期)、分裂準備期 / 分裂期 (G2/M 期) の比率はそれぞれ 23.4% から 11.4%, 54.9% から 30.4%, 12.0% から 2.0% と、コンカナマイシン A を添加して 24 時間培養することによりその割合が減少した (表 2)。

C. TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出

TUNEL 法は DNA 断片の 3' 末端を TdT の触媒により蛍光 dUTP で標識し、クロマチン DNA の断片化を起こした細胞を生化学的に検出する方法である。WEHI-231 細胞を 2.5nM のコンカナマイシン A とともに 24 時間培養し、FITC 結合 dUTP で標識した後、FACSscan[®] で解析した。未処理の細胞の蛍光度は、細

表2 コンカナマイシン A によるアポトーシスの誘導と細胞周期に対する影響

時間	<2n	G1	S	G2/M
0	9.7	23.4	54.9	12.0
8	12.6	31.0	51.0	5.4
16	31.2	21.7	46.7	0.4
24	56.2	11.4	30.4	2.0

3×10^5 /ml に調製した WEHI-231 細胞をコンカナマイシン A 5 nM と共にそれぞれ 0, 8, 16, 24 時間培養した. これらの細胞試料を裸核にした後に PI で染色し, FACScan で核 DNA 量を測定し, ハイポディプロイド DNA (アポトーシス細胞) の比率と, 細胞周期を解析した. 表中の数字は, アポトーシス細胞および各細胞周期における細胞の割合を百分率で示した.

図2 コンカナマイシン A で誘導される WEHI-231 細胞アポトーシスの解析

3×10^5 /ml に調製した WEHI-231 細胞を 2.5 nM のコンカナマイシン A とともに 24 時間培養し, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein で標識後, FACScan[®] でアポトーシス細胞を検出した.

----- TUNEL 反応液を添加していない自己蛍光を発する WEHI-231 細胞

—— TUNEL 反応液を添加して検出されたアポトーシス細胞

胞の持つ自己蛍光度と著しい相違は認められなかったが, コンカナマイシン A で処理した WEHI-231 細胞では, 出現ピークが強い蛍光を示す位置に移動した (図 2).

II. 抗 CD40 抗体がコンカナマイシン A 誘導アポトーシスに及ぼす影響

A. アガロース電気泳動像の比較

アポトーシスの生化学的判定法として DNA のヌクレオソーム単位での断片化を観察することが一般的手法として用いられている. アポトーシスを引き起こした細胞の DNA 断片化像は 180 塩基対を最小単位とする梯子状のバンドとして検出される. 2.5 nM (図 3. レーン 2) および 5 nM (図 3. レーン 3) のコンカナマイシン A

で刺激した WEHI-231 細胞では, アガロースゲル上で著しい DNA 断片化像が観察された. しかしながら 0.5 μ g/ml の抗 CD40 抗体をコンカナマイシン A と共存させると, いずれの濃度でも DNA 断片化像は観察されなかった. (図 3. レーン 5, 6)

B. フローサイトメトリーによる解析

次に, アポトーシス細胞の検出をフローサイトメーターを用いて行った. 2.5 nM および 5 nM のコンカナマイシン A とともに 24 時間培養すると, ハイポディプロイド DNA を有する核の割合はそれぞれ 43.4% および 46.5% (図 4. C E) であった. これに対して, 0.5 μ g/ml 抗 CD40 抗体共存下では 19.1% および 22.8% (図 4. D F) に減少した. 一方, 未刺激あるいは抗

図3 抗 CD40 抗体がコンカナマイシン A 誘導アポトーシスに及ぼす影響について-DNA 断片化像による解析
 $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調製した WEHI-231 細胞を下記に示す条件下で 18 時間培養した。培養終了後、DNA を抽出し 2 %アガロースを用いて電気泳動を行ない、DNA の断片化を検出した。

M: 分子量マーカー

- 1: コンカナマイシン A: 未添加.
抗 CD40 抗体: 未添加.
- 2: コンカナマイシン A: 未添加.
抗 CD40 抗体 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 添加.
- 3: コンカナマイシン A (2.5 nM): 添加.
抗 CD40 抗体: 未添加.
- 4: コンカナマイシン A (2.5 nM): 添加.
抗 CD40 抗体 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 添加.
- 5: コンカナマイシン A (5 nM): 添加.
抗 CD40 抗体: 未添加.
- 6: コンカナマイシン A (5 nM): 添加.
抗 CD40 抗体 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 添加.

CD40 抗体のみの刺激でのハイポディプロイド DNA を有する核の割合はそれぞれ 7.5%と 8.5%であった。

Ⅲ. Bcl-2 もしくは Bcl-XL 過剰発現クローンにおけるコンカナマイシン A 誘導アポトーシスについて

これまで、いくつかのアポトーシスを制御する遺伝子の存在が明らかにされてきたが、そのなかで、がん抑制遺伝子である Bcl-2 は全ての細胞ではないものの多くの細胞に誘導されるアポトーシスを抑制することが示されてきた¹¹⁻¹³⁾。今回、著者は Bcl-2 および Bcl-XL 過剰発現クローンの供与を受け、Bcl-2 および Bcl-XL がコン

カナマイシン A の誘導するアポトーシスに及ぼす影響を検討した。供与されたヒト Bcl-2 過剰発現クローン (WEHI-231-Bcl-2 クローン 1, クローン 24,) およびヒト Bcl-XL 過剰発現クローン (WEHI-231-Bcl-XL クローン 3, クローン 69) が、それぞれのタンパクを過剰に発現していることは、ウェスタンブロッティングおよびフローサイトメトリーによる解析で確認されている^{28, 29)}。

A. MTT 法による検討

WEHI-231-Bcl-2 クローン 1, WEHI-231-Bcl-XL クローン 3 および WEHI-231-Neo クローン 20 をコンカナマイシン A とともに 48 時間培養し、細胞生存率を MTT 法で測定した。10nM のコンカナマイシン A で刺激すると、WEHI-231-Neo クローン 20 および WEHI-231-Bcl-XL クローン 3 の生存率は 30%以下に低下した。一方、WEHI-231-Bcl-2 クローン 1 は 10nM の濃度では 80%の生存率が維持された (図 5)。

B. フローサイトメトリーによる検討

WEHI-231-Bcl-2 クローン 1, クローン 24, WEHI-231-Bcl-XL クローン 3, クローン 69, WEHI-231-Neo クローン 20 をさまざまな濃度のコンカナマイシン A とともに 24 時間培養した後、アポトーシス細胞を FACSscan[®] で検出した。2.5nM および 5 nM のコンカナマイシン A とともに過剰発現クローンを培養して、ハイポディプロイド DNA を有する核の割合を算定したところ、WEHI-231-Neo クローン 20 および WEHI-231-Bcl-XL クローン 3, クローン 69 ではおよそ 40%という高い割合を示したのに対し、WEHI-231-Bcl-2 クローン 1, クローン 24 ではわずか 10%にとどまり、コンカナマイシン A 未添加群とほとんど差は認められなかった (図 6)。

C. アガロース電気泳動による DNA 断片化像の検出

次に、WEHI-231-Bcl-2 クローン 1, WEHI-231-Bcl-XL クローン 3, WEHI-231-Neo クローン 20 をコンカナマイシン A とともに 18 時間培養した後、DNA を抽出し、アガロース電気泳動を行った。WEHI-231-Neo クローン 20, WEHI-231-Bcl-XL クローン 3 では、典型的な DNA 断片化像がアガロースゲル上で観察された。しかしながら、WEHI-231-Bcl-2 クローン 1 では、2.5nM および 5 nM のコンカナマイシン A でも DNA 断片化像は認められなかった (図 7)。

D. 抗 IgM 抗体によるクロマチン DNA 断片化の検討

WEHI-231-Bcl-2 クローン 1, WEHI-231-Bcl-XL ク

図4 抗CD40抗体がコンカナマイシンA誘導アポトーシスに及ぼす影響について-FACSscan[®]による解析
 3×10^5 /mlに調製したWEHI-231細胞を下記の条件で24時間培養した後、裸核にした試料をPI溶液で染色しFACSscan[®]で解析した。

A 及び B: コンカナマイシン A 未添加
 C 及び D: コンカナマイシン A (2.5 nM) 添加
 E 及び F: コンカナマイシン A (5 nM) 添加
 抗CD40抗体 (-): 抗CD40抗体未添加
 抗CD40抗体 (+): 抗CD40抗体 (0.5 μ g/ml) 添加

ローン3, WEHI-231-Neo クローン20をさまざまな濃度の抗IgM抗体とともに18時間培養した後、DNA断片化像の観察を行った。WEHI-231-Neo クローン20, WEHI-231-Bcl-2 クローン1は、典型的なDNA断片化

像がアガロースゲル上で観察されたが、WEHI-231-Bcl-XL クローン3は他の2クローンに比べてその程度が弱く、明白なDNA断片化像としては検出されなかった(図8)。

図5 Bcl-2 及び Bcl-XL 過剰発現が WEHI-231 細胞の生存率に及ぼす影響
 3×10^5 /ml に調製した WEHI-231-Neo クローン 20 (●), WEHI-231-Bcl-2 クローン 1 (■), 及び WEHI-231-Bcl-XL クローン 3 (▲) をさまざまな濃度に調製したコンカナマイシン A と共に 48 時間培養し, 生存率を MTT 法で測定した。

図7 コンカナマイシン A で処理したヒト Bcl-2 および Bcl-XL 過剰発現クローンに見られた DNA 断片化像
 M; 分子量マーカー
 1, 4, 7: WEHI-231-Neo
 2, 5, 8: WEHI-231-Bcl-2 クローン 1
 3, 6, 9: WEHI-231-Bcl-XL クローン 3
 1-3: コンカナマイシン A 未添加
 4-6: コンカナマイシン A (2.5 nM) 添加
 7-9: コンカナマイシン A (5 nM) 添加

図6 FACSscan® によるヒト Bcl-2 および Bcl-XL 過剰発現クローンに発現されたアポトーシスの解析
 3×10^5 /ml に調製した WEHI-231-Neo (■), WEHI-231-Bcl-2 クローン 1 (□), WEHI-231-Bcl-2 クローン 24 (□), WEHI-231-Bcl-XL クローン 3 (▨), WEHI-231-Bcl-XL クローン 69 (▩) を 5 nM のコンカナマイシン A と共に 24 時間培養した。PI 溶液で染色した後, FACSscan® で解析した。全体の核に対してハイポディプロイド DNA を有する核の占める割合を百分率で算定し, アポトーシス細胞出現率とした。

図8 抗 IgM 抗体で処理したヒト Bcl-2 および Bcl-XL 過剰発現クローンに見られた DNA 断片化像

M; 分子量マーカー

1, 4, 7: WEHI-231-Neo

2, 5, 8: WEHI-231-Bcl-2 クローン 1

3, 6, 9: WEHI-231-Bcl-XL クローン 3

1-3: 抗 IgM 抗体未添加

4-6: 抗 IgM 抗体 (2 μ g/ml) 添加

7-9: 抗 IgM 抗体 (4 μ g/ml) 添加

考 察

Kerr ら (1972)³³⁾ により、ネクロシスとは異なる細胞の死に方にアポトーシスという用語が適用されて以来、アポトーシス研究の初期の頃は細胞構造や核構造の変化という形態学的な研究や染色体 DNA の断片化という生化学的研究が主流であった。アポトーシスの形態学的特徴としては、形質膜やミトコンドリア膜が比較的残存するに対し、核クロマチンの濃縮、分解が先行し、その後細胞の波打ち現象、形質膜の透過性の亢進が起きる。この際、核 DNA の断片化、細胞質の泡状化が見られ、断片化された核 DNA は膜被包性球状小体 (アポトーシス小体) に包み込まれる³⁴⁾。断片化されたクロマチン DNA は、アガロース電気泳動上で 180 塩基対を基本とする典型的な梯子状像として観察される³³⁾。また、各種蛍光色素で断片化した DNA を染色することでフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で検出することが可能となった。アポトーシスは、熱ショック、放射線、紫外線等の物理的刺激、フリーラジカル、過酸化水素、カルシウム等の化学的刺激、また薬物刺激等多種多様の刺激で誘導される¹³⁾。アポトーシスの生理学的意義は、多細胞生物の恒常性維持であり、発生分化過程で不要もしくは

は有害となる細胞は遺伝子に組み込まれたプログラムにしたがって死滅、除去されることであると考えられている³⁴⁾。生理活性物質や抗原レセプターがアポトーシスを誘導したり、あるいは、成長因子が除去されることにより神経細胞がアポトーシスを引き起こすといった実験結果は、この考え方を支持している。しかしながら、近年ではある種のウィルス・細菌感染細胞がアポトーシスを引き起こすという事実が示され、アポトーシスの生理学的意義がかなり広い概念で解釈されるようになってきている³⁵⁻³⁹⁾。

免疫系においても、発生および分化の過程で未成熟 B 細胞は胚中心で負の選択を受け、正常な機能を持った細胞のみが末梢リンパ組織に分布される³⁴⁾。マウス未成熟 B 細胞株 WEHI-231 細胞を抗 IgM 抗体で処理するとアポトーシスが誘導されることが示され、このような IgM などの表層免疫グロブリン (surface immunoglobulin; sIg) の架橋反応により引き起こされる WEHI-231 細胞アポトーシスの実験系が、in vitro でのモデル実験として広く用いられている^{40,41)}。そこで著者は、WEHI-231 細胞を用いた in vitro の実験系を用いて、V-ATPases の特異的阻害剤コンカナマイシン A による B 細胞の細胞死を形態学的および生化学的に解析したところ、アポトーシスであることを確認した (図 2, 4, 9)。

sIg の架橋反応により誘導されるアポトーシスでは、G1 期における細胞周期の停止が先行する⁴¹⁻⁴⁶⁾。しかしながらコンカナマイシン A 誘導アポトーシスでは、G1 期における細胞周期の停止は認められなかった (表 2)。このことは、WEHI-231 細胞における sIg の架橋反応が誘導するアポトーシスとコンカナマイシン A が誘導するアポトーシスの発現過程で、ある時期異なる経路をたどる可能性が示唆された。

アポトーシスの際観察されるクロマチン DNA の低分子 (180 塩基対) への断片化は、細胞内エンドヌクレアーゼがクロマチン DNA をリンカー部分で消化することに起因すると考えられている^{47,48)}。これまでに、染色体 DNA に作用する数種のエンドヌクレアーゼが分離、精製されているが、近年、Gottlieb ら (1995)⁴⁹⁾ は、ある種のアポトーシスでは酸性エンドヌクレアーゼが深く関与しており、この酵素の活性化には pH の低下が必須であると報告している。V-ATPases の特異的阻害剤であるバフィロマイシン A₁ は酸性顆粒であるライソソーム内の pH を 30 分で中性化することが⁶⁾、さらに V-ATPases 機能が損なわれると、酸性顆粒中のプロトン

図9 コンカナマイシン A および抗 IgM 抗体によりアポトーシスが誘導された WEHI-231 細胞の透過型電子顕微鏡像写真

A: コンカナマイシン A (2.5 nM) 添加

B: コンカナマイシン A (5 nM) 添加

C: 抗 IgM 抗体 (4 μ g/ml) 添加

D: 未添加

■: 5 μ m.

は細胞質中に流出し、一過性に細胞質の pH が低下することが知られている⁴⁹⁾。また、筆者らは WEHI-231 細胞にコンカナマイシン A を 10 nM 加え培養した後、アクリジンオレンジ染色したところ、培養 10 分後から染色された細胞内顆粒の数が減少し始める事を確認している。以上のことから、今回のコンカナマイシン A による WEHI-231 細胞アポトーシスでは、細胞質の pH の低下により、酸性エンドヌクレアーゼが活性化されアポトーシスを引き起こす可能性が考えられ、このことに関し、詳細な検討を加える必要があると考えられた。また、V-ATPases による細胞内 pH 調節機能の維持が、

細胞の生存にとって重要であることが、今回のコンカナマイシン A により誘導されるアポトーシスに関する研究結果から強く示唆された。

WEHI-231 細胞の sIg の架橋反応により誘導される G1 期における細胞周期の停止およびアポトーシスは CD40-CD40L シグナルにより抑制されることが知られている⁵⁰⁾。しかし CD40-CD40L シグナルが他の誘因によるアポトーシスにどのような作用を発現するのかについてはいまだ報告がない。そこでまず、CD40-CD40L シグナルとコンカナマイシン A が誘導するアポトーシスとの関連について検討を加えた。その結果、WEHI-231

細胞におけるクロマチン DNA の断片化は抗 CD40 抗体添加により抑制された (図 3, 6). このことは, 抗 CD40 抗体添加により誘導される CD40-CD40L シグナルが, WEHI-231 細胞では sIg の架橋反応のみならず, コンカナマイシン A により誘導されるアポトーシスも抑制することを示唆するものと考えられた. 一方, CD40-CD40L シグナルは, WEHI-231 細胞内で Bcl-2 とそのホモログ Bcl-X_L の発現レベルを上昇させることが報告されている³⁰⁾. そこで著者は, CD40-CD40L シグナルによるコンカナマイシン A 誘導アポトーシスの抑制機構を解析するため, アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 と Bcl-X_L に注目し, それぞれの遺伝子産物を過剰発現した WEHI-231 細胞のトランスフェクタントを用い, アポトーシス発現に及ぼす影響を詳細に検討した. これまで, sIg の架橋反応により誘導されるアポトーシスにおける Bcl-2 ファミリーの果たす役割については, 数多くの知見が集積されている. CD40-CD40L シグナルが, sIg の架橋反応により発現される WEHI-231 細胞の細胞周期の停止とアポトーシスを抑制することは知られていたが, Ishida ら (1995)⁵¹⁾ は, WEHI-231 細胞を用いた培養系で, CD40-CD40L シグナルにより Bcl-X_L と Cdk4 の発現レベルが亢進し, それぞれがアポトーシスと細胞周期の停止の抑制に深く関与していることを明らかにした. この点に関しては, 著者も Bcl-2 および Bcl-X_L 過剰発現クローンを用いて解析したところ, Bcl-X_L 過剰発現クローンでは sIg の架橋反応によるアポトーシス誘導は完全に抑制されることを確認した (図 8). しかしながら, Bcl-2 過剰発現クローンでは sIg の架橋反応によるアポトーシスの抑制は認められなかった (図 8). 逆に, コンカナマイシン A によるアポトーシス発現は, Bcl-2 過剰発現により著しく抑制されたものの, Bcl-X_L 過剰発現では全く抑制されなかった (図 7). すなわち, コンカナマイシン A と sIg の架橋反応で誘導されるアポトーシスにおける Bcl-2 ファミリー遺伝子産物による抑制機構が全く異なっていることが明らかとなった. これまで, WEHI-231 細胞は, 放射線をはじめとするさまざまな刺激でアポトーシスが誘発されることが報告されているが, そのほとんどは Bcl-X_L の過剰発現で抑制されると考えられていた⁵²⁻⁵⁶⁾. 今回の報告で, Bcl-2 過剰発現によりコンカナマイシン A 誘導アポトーシスが抑制されたことで, アポトーシスを誘導する外的要因が異なると, 対応する Bcl-2 ファミリーのメンバーも異なることが解り, 興味深い所見と考えられた.

アポトーシスの制御機構は線虫からヒトまでの進化過程でよく保存されており, Bcl-2 もアポトーシス抑制因子として Ced-9/Bcl-2 ファミリーを形成し, アポトーシスの機能発現を制御していると考えられている^{12, 13)}. 哺乳細胞における Ced-9/Bcl-2 関連遺伝子として Bcl-2 と同様の機能をもつ Bcl-X_L, Bcl-2 と機能的に拮抗する Bax や Bcl-X_s が知られているが, 現在ではファミリーに属する遺伝子の数は増えつつある. 今回の研究で, CD40-CD40L シグナルによってコンカナマイシン A が誘導するアポトーシスの抑制効果は Bcl-2 の発現亢進によることが明らかとなった. しかしながらこれまで存在が示されてきた Bcl-2 および Bcl-X 以外の Ced-9 ホモログ *Bad*, *Bak-2*, *Bak-3*, *Mcl-2*, *A1*⁵⁹⁻⁶¹⁾ 等が, コンカナマイシン A で誘導されるアポトーシス制御に関与している可能性も考えられることから, これらの遺伝子による制御機構を解析することは重要であり, 今後に残された課題と思われた.

結 論

V-ATPases 特異的阻害剤コンカナマイシン A のマウス B 細胞株 WEHI-231 細胞アポトーシスの発現機構を分子生物学的に調べたところ, 以下のことが明らかとなった.

1. コンカナマイシン A による WEHI-231 細胞の細胞死発現をさまざまな角度から検討したところ, 細胞死はネクローシスではなくアポトーシスによって引き起こされていることが明らかとなった.

2. コンカナマイシン A が誘導する WEHI-231 細胞アポトーシスではそれに先立つ G1 期における細胞周期の停止は観察されなかった. これは, sIg の架橋反応により誘導される WEHI-231 細胞アポトーシスとは異なる所見であった.

3. コンカナマイシン A による WEHI-231 細胞アポトーシス発現は CD40-CD40L シグナルにより著しく抑制された.

4. Bcl-2 の過剰発現によりコンカナマイシン A 誘導アポトーシスは抑制されたが, Bcl-X_L の過剰発現に影響されなかった.

以上の結果により, コンカナマイシン A による WEHI-231 細胞アポトーシス誘導には, CD40-CD40L シグナルにより誘導される Bcl-2 蛋白が深く関与していることが強く示唆された.

稿を終るに当たり, 終始御懇篤なる御指導と御校閲

を賜りました恩師竹原直道教授に深甚なる謝意を表します。なお本研究に種々のご教授と御助言を戴きました国立予防衛生研究所口腔科学部花田信弘部長、西原達次室長、ほか職員各位に深甚なる謝意を表します。本研究に用いた WEHI-231 細胞の透過型電子顕微鏡写真の撮影は、鹿児島大学口腔病理学講座仙波伊知郎博士の甚大なる協力によるものであり、衷心より謝意を表します。また、九州歯科大学口腔衛生学教室の皆様に衷心より謝意を表します。

文 献

- 1) Forgac, M.: Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol. Rev.* 69: 765-796, 1989.
- 2) Warren, M., Smith, J. A. C. and Apps, D. K.: Rapid purification and reconstitution of a plant vacuolar ATPase using Triton X-114 fractionation: subunit composition and substrate kinetics of the H^+ -ATPase from the tonoplast of *Kalanchoe daigremontiana*. *Biochim. Biophys. Acta* 1106: 117-125, 1992.
- 3) Xie, X. -S. and Stone, D. K.: Isolation and reconstitution of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex. *J. Biol. Chem.* 261: 2492-2495, 1986.
- 4) Moriyama, Y. and Nelson, N.: H^+ -translocating ATPase in golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 264: 18445-18450, 1989.
- 5) Moriyama, Y. and Futai, M.: Presence of 5-hydroxytryptamine (serotonin) transport coupled with vacuolar-type H^+ -ATPase in neurosecretory granules from bovine posterior pituitary. *J. Biol. Chem.* 265: 9165-9169, 1990.
- 6) Umata, T., Moriyama, Y., Futai, M. and Mekada, E.: The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 265: 21940-21945, 1990.
- 7) Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. and Takatsuki, A.: Folimycin (concanamycin A) and bafilomycin A1, inhibitors specific for V-ATPase, exert similar but distinct effects on intracellular translocation and processing of glycoproteins. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 425-427, 1994.
- 8) Raff, M. C.: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400, 1992.
- 9) Williams, G. T. and Smith, C. A.: Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74: 777-779, 1993.
- 10) Tsujimoto, Y. and Croce, C. M.: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5214-5218, 1986.
- 11) Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M.: *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442, 1988.
- 12) Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E. A., Longthorne, V. L., Culhane, A. C. and Williams, G. T.: Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 236: 1-26, 1996.
- 13) 宮脇利男, 太田邦雄: *Bcl-2* 関連遺伝子産物によるアポトーシスの制御. 蛋白質 核酸 酵素 41: 127-135, 1996.
- 14) Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C. R., et al.: Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357: 80-82, 1992.
- 15) Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. and Aruffo, A.: A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6550-6554, 1992.
- 16) 森尾友宏: CD40 の機能とシグナル伝達機構. 臨床免疫 28: 214-220, 1996.
- 17) Foy, T. M., Laman, J. D., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E. and Noelle, R. J.: gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J. Exp. Med.* 180: 157-163, 1994.
- 18) Hollenbaugh, D., Grosmaire, L. S., Kulas, C. D., Chalupny, N. J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R. J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. and Aruffo, A.: The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J.* 11: 4313-4321, 1992.
- 19) Graf, D., Korthäer, U., Mages, H. W., Senger, G. and Kroczeck, R. A.: Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 3191-3194, 1992.
- 20) Noelle, R. J., Ledbetter, J. A. and Aruffo, A.: CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol. Today* 13: 431-433, 1992.
- 21) Fanslow, W. C., Anderson, D. M., Grabstein, K. H., Clark, E. A., Cosman, D. and Armitage R. J.: Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells. *J. Immunol.* 149: 655-660, 1992.
- 22) Lederman, S., Yellin, M. J., Cleary, A. M., Pernis, A., Inghirami, G., Cohn, L. E., Covey, L. R., Lee, J. J., Rothman, P. and Chess, L.: T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and

- rescues B cells from programmed cell death. *J. Immunol.* 152: 2163-2171, 1994.
- 23) Gray, D., Dullforce, P. and Jainandunsing, S.: Memory B cell development but not germinal center formation is impaired by in vivo blockade of CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.* 180: 141-155, 1994.
 - 24) Valentine, M. A. and Licciardi, K. A.: Rescue from anti-IgM-induced programmed cell death by the B cell surface proteins CD20 and CD40. *Eur. J. Immunol.* 22: 3141-3148, 1992.
 - 25) Holder, M. J., Wang, H., Milner, A. E., Casamayor, M., Armitage, R., Spriggs, M. K., Fanslow, W. C., MacLennan, I. C. M., Gregory, C. D. and Gordon, J.: Suppression of apoptosis in normal and neoplastic human B lymphocytes by CD40 ligand is independent of Bcl-2 induction. *Eur. J. Immunol.* 23: 2368-2371, 1993.
 - 26) Tsubata, T., Wu, J. and Honjo, T.: B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 364: 645-648, 1993.
 - 27) Sumimoto, S., Heike, T., Kanazashi, S., Shintaku, N., Jung, E.-Y., Hata, D., Katamura, K. and Mayumi, M.: Involvement of LFA-1/intracellular adhesion molecule-1-dependent cell adhesion in CD40-mediated inhibition of human B lymphoma cell death induced by surface IgM crosslinking. *J. Immunol.* 153: 2488-2496, 1994.
 - 28) Clark, E. A. and Ledbetter, J. A.: How B and T cells talk to each other. *Nature* 367: 425-428, 1994.
 - 29) Cuende, E., Alés-Martínez, J. E., Ding, L., González-García, M., Martínez-A, C. and Núñez, G.: Programmed cell death by *bcl-2*-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO. J.* 12: 1555-1560, 1993.
 - 30) Mérimón R., Grillo, D. A. M., Simonian, P. L., Muthukumar, S., Fanslow, W. C., Bondada, S. and Núñez, G.: Modulation of anti-IgM-induced B cell apoptosis by Bcl-X_L and CD40 in WEHI-231 cells—Dissociation from cell cycle arrest and dependence on the avidity of the antibody-IgM receptor interaction. *J. Immunol.* 155: 3830-3838, 1995.
 - 31) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63, 1983.
 - 32) Moore, K. J. and Matlashewski, G.: Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.* 152: 2930-2937, 1994.
 - 33) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972.
 - 34) Cohen, J. J.: Apoptosis. *Immunol. Today* 14: 126-130, 1993.
 - 35) Gregory, C. D., Dive, C., Henderson, S., Smith, C. A., Williams, G. T., Gordon, J. and Rickinson, A. B.: Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature* 349: 612-614, 1991.
 - 36) Reed, J. C.: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 124: 1-6, 1994.
 - 37) Terai, C., Kornbluth, R. S., Pauza, C. D., Richman, D. D. and Carson, D. A.: Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* 87: 1710-1715, 1991.
 - 38) Zychlinsky, A., Prevost, M. C. and Sansonetti, P. J.: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167-169, 1992.
 - 39) Kato, S., Muro, M., Akifusa, S., Hanada, N., Semba, I., Fujii, T., Kowashi, Y. and Nishihara, T.: Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect. Immun.* 63: 3914-3919, 1995.
 - 40) 野村尚史, 鐔田武志: B細胞. 炎症と免疫 2: 301-306, 1994.
 - 41) DeFranco, A. L., Gold, M. R. and Jakway, J. P.: B-lymphocyte signal transduction in response to anti-immunoglobulin and bacterial lipopolysaccharide. *Immunol. Rev.* 95: 161-176, 1987.
 - 42) Benhamou, L. E., Cazenave, P.-A. and Sarthou, P.: Anti-immunoglobulins induce death by apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur. J. Immunol.* 20: 1405-1407, 1990.
 - 43) Hasbold, J. and Klaus, G. G. B.: Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas. *Eur. J. Immunol.* 20: 1685-1690, 1990.
 - 44) Clark, E. A. and Ledbetter, J. A.: Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4494-4498, 1986.
 - 45) Stamenkovic, I., Clark, E. A. and Seed, B.: A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* 8: 1403-1410, 1989.
 - 46) Page, D. M. and DeFranco, A. L.: Antigen receptor-induced cell cycle arrest in WEHI-231 B lymphoma cells depends on the duration of signaling before the G1 phase restriction point. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3003-3012, 1990.
 - 47) Arends, M. J., Morris, R. G. and Wyllie, A. H.: Apoptosis—the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136: 593-608, 1990.

- 48) Barry, M. A. and Eastman, A.: Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca^{2+} and pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 782–789, 1992.
- 49) Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E. and Babior, B. M.: Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 654–658, 1996.
- 50) Choi, M. S. K., Boise, L. H., Gottschalk, A. R., Quintáns, J., Thompson, C. B. and Klaus, G. G. B.: The role of *bcl-x(L)* in CD40-mediated rescue from anti- μ -induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur. J. Immunol.* 25: 1352–1357, 1995.
- 51) Ishida, T., Kobayashi, N., Tojo, T., Ishida, S., Yamamoto, T. and Inoue, J.: CD40 signaling-mediated induction of Bcl-X_L, Cdk 4, and Cdk 6. *J. Immunol.* 155: 5527–5535, 1995.
- 52) Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y.: Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-x_L. *Nature* 374: 811–813, 1995.
- 53) Gottschalk, A. R., McShan, C. L., Merino, R., Núñez, G. and Quintáns, J.: Physiological cell death in B lymphocytes: I. differential susceptibility of WEHI-231 sublines to anti-Ig induced physiological cell death and lack of correlation with *bcl-2* expression. *Int. Immunol.* 6: 121–130, 1994.
- 54) Gottschalk, A. R., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Quintáns, J.: Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by *bcl-x* but not *bcl-2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7350–7354, 1994.
- 55) Gottschalk, A. R., Boise, L. H., Oltvai, Z. N., Accavitti, M. A., Korsmeyer, S. J., Quintáns, J. and Thompson, C. B.: The ability of Bcl-X_L and Bcl-2 to prevent apoptosis can be differentially regulated. *Cell Death Differ.* 3: 113–118, 1996.
- 56) Núñez, G., Merino, R., Grillot, D. and González-García, M.: Bcl-2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today* 15: 582–588, 1994.
- 57) Oltvai, Z. N., Millman, C. L. and Korsmeyer, S. J.: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609–619, 1993.
- 58) Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P. and Craig, R. W.: *MCL1*, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to *BCL2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3516–3520, 1993.
- 59) Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J.: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285–291, 1995.
- 60) Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D. and Barr, P. J.: Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374: 736–739, 1995.
- 61) Farrow, S. N., White, J. H. M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. -T., Grinham, C. J., Martinou, J. -C. and Brown, R.: Cloning of a *bcl-2* homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374: 731–733, 1995.