

氏名	九十九伸一
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2132号
学位授与の日付	平成11年11月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	アポトーシスを制御するタンパク質間結合ドメインの構造と機能に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 米原 伸 教授 西田栄介 教授 平野丈夫

### 論文内容の要旨

本論文において申請者は、アポトーシス誘導に必須の働きをするカスパーゼと呼ばれる一群のタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)の活性化に関与するタンパク質間結合ドメインの構造と機能を解析し、アポトーシス誘導と抑制の分子機構を説明している。アポトーシスという細胞死は多細胞生物の発生や恒常性の維持に必要な不可欠な現象である。具体的には、個体の正常な発生や生体の恒常性の維持のために、害をなす細胞や不必要な細胞はアポトーシスという細胞死の機構によって除去されている。アポトーシス誘導の分子機構ではカスパーゼと呼ばれる一群の蛋白質分解酵素が重要な役割を演じていることが明らかになっている。哺乳類動物ではカスパーゼは上流に位置するカスパーゼ8やカスパーゼ9が、下流に位置するカスパーゼ3や7を切断することによって活性化し、下流のカスパーゼが様々な細胞内基質を切断することによりアポトーシスが誘導されることが明らかとなっている。カスパーゼ8はプロテアーゼドメインと共に、DED (death effector domain) と呼ばれるタンパク質間相互作用をなすドメインを有している。また、カスパーゼ9はCARD (caspase-recruiting domain) というタンパク質間相互作用をなすドメインを有している。カスパーゼのDEDとCARDは、それぞれFADDというアダプター分子のDEDやApaf-1という分子のCARDと相互作用することによって、カスパーゼの活性化を誘導するといわれているが、その詳細は不明であった。本研究では、カスパーゼ8や9が活性化する分子機構を様々なDEDやCARDを用いて解析し、特にDEDの作用機作を分子レベルで明らかにした。

本研究では、まずマウスカスパーゼ8のcDNAクローニングを行った。そして、カスパーゼ8のDEDs (Casp 8 DEDs: DEDが2回繰り返して並んでいる)だけを細胞内で発現させるとカスパーゼ8の活性化をともなってアポトーシスが誘導されることを見いだした。また、2回繰り返したDEDから成るMC159というウイルスタンパク質はカスパーゼ8の活性化を抑制することが知られていた。そして、Casp 8 DEDsとMC159には何故DEDが二回繰り返し存在しているのか、また、これらのDEDsはなぜカスパーゼ8の活性化に相反する活性を有するかを解析した。その結果、二回繰り返したDEDsは協調的に働き、一個のDEDだけではFADDやカスパーゼ8への結合能やアポトーシス制御能が著しく損なわれていることを明らかにした。しかし、カスパーゼ8のDEDsのC末端側のDEDは一個だけで弱いながらもCasp 8 DEDsへの結合能を有していた。一方、MC159のC末端DEDはこのような活性を有していなかった。カスパーゼ8の活性化を誘導するか抑制するかという違いは、この部分がになっている可能性が考えられた。

哺乳類細胞の中には、cFLIPと呼ばれる2回繰り返したDEDsを有する分子を発現しているものがある。cFLIPのアポトーシス(カスパーゼ8の活性化)への影響に関しては、アポトーシスを誘導するという報告と抑制するという相反する報告が存在する。本研究では、cFLIPの活性を詳しく解析した結果、cFLIPは高発現するとアポトーシスを誘導するが、低発現では抑制するということを明らかにした。更に、その作用機作を解析した結果、cFLIPを低発現させるとDEFと呼ばれるカスパーゼ8を含むフィラメント状の細胞内構造体(FADDやCasp 8 DEDの高発現で誘導される構造体で、DEFの中でカスパーゼ8の活性化が起こるとされている)が破壊されること・高発現させるとcFLIPはカスパーゼ8と共に細胞内に球状の凝集体(DEFとは明らかに異なった形態)を形成してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。従って、

cFLIPはその細胞内濃度が低ければカスパーゼ8の凝集(DEF形成)を阻害し、細胞内濃度が高いとカスパーゼ8を含む凝集物(DEFとは異なる)を形成してカスパーゼ8の活性化を誘導することを示すことができた。

CARDはDEDと同じように $\alpha$ ヘリックスが繰り返す構造をとるが、DEDとは異なり、カスパーゼ9やApaf-1内に一個しか存在しない。CARDの活性をDEDと比較したところ、CARDを過剰発現してもDEDのようにカスパーゼの活性化やアポトーシスの誘導を引き起こすことはなく、DEF用の構造物もつくらなかった。この結果は、DEDとCARDのは構造上類似性を持ち、どちらもカスパーゼ分子中に存在するが、その作用の分子機構は異なっていることを示した。

### 論文審査の結果の要旨

アポトーシスという細胞死は多細胞生物が正常に発生し、生体の恒常性を維持するためには必要不可欠の重要な現象である。アポトーシスを実行する細胞内分子機構としては、生物の種を越えて保存されているカスパーゼというプロテアーゼの活性化という事象が示され、注目を集めている。しかし、カスパーゼが活性化される分子機構については不明な点が多い。本申請論文により、申請者はカスパーゼの活性化機構について、カスパーゼ8の活性化に関わるDEDというタンパク質間相互作用をになうドメインの構造と機構を解析し、DEDによるカスパーゼ8の活性化の制御機構を明らかにしている。本研究は、アポトーシス誘導と阻害の細胞内分子機構の解明に貢献をした研究であると評価できる。

まず申請者は、マウスカスパーゼ8のcDNAクローニングを行った。カスパーゼ8はヒトで明らかにされた分子であるが、マウスのcDNAクローニングを行うことにより、その後のカスパーゼ8遺伝子破壊マウスの作成等に貢献した研究である。申請者は、クローニングしたカスパーゼ8のDED領域だけを細胞内に発現させるとカスパーゼ8の活性化を誘導し、細胞にアポトーシスを誘導できることを見いだした。そして、同じDEDだけを有するウイルスタンパク質MC159はカスパーゼ8の活性化を抑制するのに、Casp8 DEDはカスパーゼ8の活性化を誘導することに注目し、両タンパク質の性質を比較した。アポトーシス実行の細胞内分子機構の解析ではカスパーゼ活性化機構が一つの焦点となっているが、これに先駆ける研究となるものであった。

更に、申請者はCasp8 DEDやMC159にはDEDが2回繰り返し存在することに興味を覚え、2つのDEDから欠失変異体やキメラ変異体を作成してその生物活性や結合活性を行った。その結果、DEDが2つ並んで存在することにより、カスパーゼ8の活性化や活性化抑制が効率よく行われることを示すと同時に、1つずつのDEDが異なった活性を発揮するためのポテンシャルを有することを明らかにした。以上の研究は、現在の生物学で最も注目されている研究分野の一つであるアポトーシスの研究領域において、その細胞内分子機構の理解に確固とした手がかりを与えるものであった。

更に、申請者はカスパーゼ8活性化の細胞内阻害因子/活性化因子として報告されたcFLIPについての研究を行った。cFLIPはカスパーゼ8の活性化を誘導するという報告と、抑制するという相反する報告がなされており混乱していたが、申請者の研究により、cFLIPの2つ並んだDEDの細胞内濃度によって相反する活性の説明ができることが明らかとなった。また、cFLIPによるカスパーゼ8の活性化は、FADDやCasp8 DEDの強発現によるカスパーゼ8の活性化と異なる機構によることも見いだした。以上の研究は、アポトーシスの誘導と阻害が細胞内で制御されている現象を分子レベルで具体的にとらえたものであり、アポトーシスの細胞内シグナル伝達機構を明らかにする上で、大きな貢献をしている。

よって、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と判定した。