

氏 名	いま 居 ゆずる
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2131 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	A study on a novel mammalian protein, FLASH, that is involved in the activation of caspase-8 during Fas-induced apoptosis (Fas を介したアポトーシスにおいてカスパーゼ 8 の活性化に関与する新規分子 FLASH の研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 米 原 伸 教 授 上 村 匡 教 授 平 野 丈 夫
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

本論文において申請者は、Fas を介するアポトーシス誘導のシグナル伝達において重要な働きを行う新規分子 FLASH を発見し、その cDNA クローニングによる構造決定を行うと同時に、その作用機作を分子レベルで明らかにした。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。哺乳類動物では Fas と名付けた細胞表面タンパク質がアポトーシス誘導の引き金となるスイッチをオンにするレセプター分子として発見され、免疫系を中心として生理的に重要なアポトーシスを誘導すると注目されている。また、Fas を介するアポトーシス誘導のシグナル伝達経路を理解することで、細胞が死ぬという道筋が決定される分子機構を明らかにすることができる期待され、世界中で精力的に研究が行われている。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が、Fas を介するアポトーシス誘導ではカスパーゼ 8 (FLICE) と呼ばれる酵素が最初に活性化され本質的な役割を有することが証明されてきた。本研究は、Fas を介するカスパーゼ 8 の活性化に関与する FLASH と命名した新規分子を発見し、cDNA クローニングによって構造を決定すると同時に、その作用機作を分子レベルで明らかにしたものである。

Fas が刺激されると、その細胞内ドメイン (death domain と呼ばれる) に FADD (Fas-associated death domain) と命名されたアダプター分子が会合し、さらに FADD にカスパーゼ 8 が会合することが知られている。これらの分子から成る複合体を DISC (death-inducing signaling complex) と呼ぶが、DISC の中でカスパーゼ 8 が自らを切断することによって活性化し、アポトーシスが実行されると考えられてきた。本論文では、カスパーゼ 8 (FLICE) を活性化する DISC の構成成分に未知の分子が存在する可能性を考え、カスパーゼ 8 と結合する分子を Yeast Two-hybrid 法によってクローニングすることを試みた。その結果、新規分子の断片を得ることに成功し、続いてこの断片をプローブとして全長の cDNA をクローニングした。FLASH (FLICE-associated huge protein) と命名したこの新規分子は分子量 220 kDa の巨大分子であり、カスパーゼ 8 や FADD と結合できるドメインと自己会合する領域を有していた。ヒト細胞株に FLASH を強制発現させると、FLASH は Fas の刺激の有無に関わらずカスパーゼ 8 と会合しており、Fas を刺激したときにだけ Fas・FADD とも複合体を形成した。FLASH に特異的に反応するペプチド抗体を作成し、細胞内に発現している FLASH を検出した結果、FLASH は DISC の構成成分であることが判明した。この結果、FLASH は常にカスパーゼ 8 と会合しており、この複合体が Fas が刺激されたときに FADD と共に DISC を構成することが示された。

次に、FLASH が Fas 刺激後のカスパーゼ 8 の活性化に関わるかを調べた。FLASH の全長またはカスパーゼ 8 会合領域や自己会合領域を細胞に強制発現させた後に、Fas を刺激し Fas 誘導アポトーシスや Fas 誘導カスパーゼ 8 の活性化に与

える影響を解析した。その結果、全長の FLASH は Fas 誘導カスパーゼ 8 の活性化や Fas 誘導アポトーシスを増強した。また、カスパーゼ 8 会合領域や自己会合領域だけを発現させたときには Fas 誘導アポトーシスとカスパーゼ 8 の活性化が抑制された。これらの結果は FLASH がカスパーゼ 8 の活性化に深く関わることを示唆したものである。

Fas を介するアポトーシスは、自己反応性免疫担当細胞の除去やがん細胞の除去において機能することが知られている。そこで、Fas を介するアポトーシスを抑制するがん遺伝子産物が FLASH を介してカスパーゼ 8 の活性化を抑制する可能性を解析した。アデノウイルスのがん遺伝子産物 E1B 19 K タンパク質は、Fas を介するアポトーシスとカスパーゼ 8 の活性化を抑制するが、Fas・FADD・カスパーゼ 8 には直接結合できないことが報告されていた。そこで、FLASH と E1B 19 K が細胞内で結合できるかを解析したところ、両者は結合すること、E1B 19 K は FLASH とカスパーゼ 8 の複合体をミトコンドリア外膜や核膜の表層にトラップすることを示唆する結果を得た。また、E1B 19 K の Fas を介するアポトーシス誘導阻害活性は、FLASH を過剰発現することで解除できることも示した。これらの結果は、がん遺伝子産物 E1B 19 K が細胞をがん化させる際に、FLASH を介してカスパーゼ 8 をミトコンドリアや核膜に隔離することによりカスパーゼ 8 の DISC への移動を阻止することを示唆するものである。がん細胞が Fas を介する除去機構から免れる分子機構の一つを示しており興味深い。

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、特に Fas を介するアポトーシス誘導時におけるカスパーゼ 8 の活性化機構を解析し、カスパーゼ 8 の活性化に関わる新規分子 FLASH を発見し、そのクローニングと解析を行っている。本研究は、アポトーシス誘導の細胞内シグナル伝達の解明に極めて重要な貢献をした研究であると評価できる。

まず申請者は、細胞表層のアポトーシス誘導レセプター分子 Fas を刺激したときのカスパーゼ 8 の活性化に関与する新規分子が存在すると考え、カスパーゼ 8 と結合する分子を Yeast two-hybrid 法でスクリーニングし、FLASH と命名した分子をクローニングしている。従来、Fas を刺激したときのカスパーゼ 8 の活性化にはアダプター分子 FADD だけの関与で十分だという考えを提唱する研究者が多数存在していた。その中で、新たな分子 FLASH を見いだしたことは、アポトーシスの誘導と制御機構を分子レベルで理解する上で独創的かつ重要な発見であり、高く評価できる。

更に、申請者はこの FLASH のドメイン解析を行い、カスパーゼ 8 と会合するドメインを決定すると同時に、FLASH には自己会合領域の存在することを明らかにした。線虫のカスパーゼである CED-3 は CED-4 という自己会合能力のあるタンパク質によって活性化され、哺乳類のカスパーゼ 9 は Apaf-1 という自己会合能力のある CED-4 ホモログによって活性化されることを考えあわせると、CED-4 様活性が不必要とされてきた Fas 下流のカスパーゼ 8 の活性化にも CED-4 様活性を有する分子の関与することを示したことになり、大変興味深い。更に、FLASH の全長や上記各領域だけを細胞に過剰発現させる実験を行い、FLASH が Fas の下流におけるカスパーゼ 8 の活性化に、カスパーゼ 8 会合ドメインと自己会合領域の二カ所で深く関わることを示した。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大きな新しい手がかりを与えるものであった。

更に、申請者はがん遺伝子産物であるアデノウイルス E1B 19 K タンパク質が FLASH と結合し、FLASH とカスパーゼ 8 の複合体をミトコンドリア外膜や核膜に隔離することによって Fas を介するカスパーゼ 8 の活性化を抑制することを示した。アデノウイルス E1B 19 K タンパク質は、アポトーシスを抑制する Bcl-2 のファミリーに属する分子である。線虫では、Bcl-2 ファミリーに属する CED-9 が CED-4・CED-3 とアポトゾームと呼ばれる複合体を作って CED-3 の活性を抑制することが報告されている。一方、哺乳類で明らかにされた CED-4 ホモログである Apaf-1 は Bcl-2 ファミリータンパク質とは会合しないことが最近明らかとなってきた。線虫のシステムとは異なっているとされていた Fas を介するアポトーシス誘導の分子機構が、アポトゾームという意味においては、Apaf-1・カスパーゼ 9 の系より線虫から保存されていたことを示している。また、申請者の研究により FLASH を介して Fas を介するアポトーシス誘導が正方向と負の方向両方に制御されることが示されたが、これにより、発がんの分子機構や免疫系の制御機構に新たな光が当てられたと考えら

れる。以上の研究は、アポトーシスの実行時に細胞内で引き起こ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。