

論文の内容の要旨

研究題目「切断部位特異抗体を用いたカスパーゼ標的分子の解析」

指導教官 大海 忍 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 加藤 昌彦

能動的細胞死であるアポトーシスにおいて、カスパーゼと呼ばれる一群のシステインプロテアーゼが活性化し、アポトーシスのシグナル伝達およびその実行に重要な役割をする。現在までに 14 種類のカスパーゼが同定されているが、このうちカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-7 がアポトーシスの実行に直接的関与することが知られている。この 2 つのカスパーゼは基質タンパク質中の DXXD 配列 (X は任意のアミノ酸) を認識し、アスパラギン酸の C 末端側 (DXXD-X) を好んで切断する。このタンパク質分解によりアポトーシスの形態的特徴である核の断片化や DNA の切断などが誘導され細胞死が起こる。

アポトーシスではカスパーゼが中心的な役割を担っているが、他の細胞内プロテアーゼもアポトーシスに関与する。カルシウム依存性システインプロテアーゼである μ -カルパインもアポトーシスで活性化する。通常、細胞内カルシウムイオン濃度はカルパイン活性化の閾値以下に保たれている。加えて、細胞内にはカルパイン阻害タンパク質であるカルバスタチンが存在し、カルパインの活性化はカルシウムイオンとカルバスタチンによって厳密に調節されている。アポトーシスにおいて細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することが報告されており、これがアポトーシスでのカルパイン活性化の誘因と考えられている。しかしながら、カルシウムイオン濃度が上昇してもカルバスタチンが存在するためカルパインの活性化は阻害される。このため、アポトーシスでのカルパイン活性化機構の詳細は不明であった。

本研究では第一章において、カルパイン活性化機構を解明する目的でカルバスタチンのアポトーシスにおける挙動解析を行った。この結果、アポトーシスでカルバスタチンがカスパーゼ-3 様プロテアーゼで切断されることが明らかとなった。この切断はカルパイン活性化に先んじて起こること、切断により細胞内のカルパイン阻害活性が減少することが明らかとなり、このカスパーゼによるカルバスタチン分解がカルパイン活性化と基質分解を誘導する一因であることが示唆された。また、第二章では、抗体によるカスパーゼ-3 基質タンパク質の解析を行った結果について論じる。これはカルバスタチンの切断部位を認識する抗体を用いた実験を発端に見出された基質解析法であり、カスパーゼ-3 の切断によって新たに露出される C 末端配列を認識する抗体を用いて基質タンパク質を解析する方法である。

第一章 アポトーシスにおけるカルパイン阻害タンパク質カルバスタチンの分解

ヒト白血病性 T 細胞株 Jurkat に抗 Fas 抗体を添加してアポトーシスを誘導し、アポトーシスにおけるカルバスタチンの挙動についてイムノブロットで解析した。カルバスタチンは SDS-PAGE で 120 kDa に観察されるが、アポトーシス誘導によって減少し、誘導後 12 時間で完全に消失した。また、カルバスタチンの消失に伴い分解物である 90 kDa フラグメントがアポトーシス誘導 4 時間以降で見られた。この 90 kDa フラグメントは 120 kDa フラグメントが消失しても増加が見られないことから、さらに分解されていることが推測された。カルバスタチンの分解はカスパーゼ-3 の代表的基質タンパク質である poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) の切断と時間的に一致していた。また、 μ -カルパインの活性化はアポトーシス誘導 12 時間以降で確認された (図 1)。

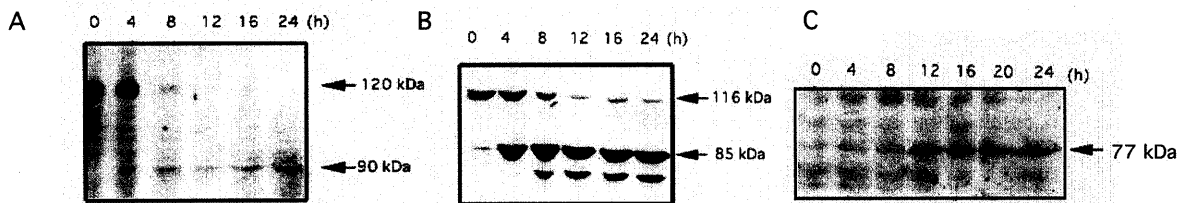


図 1. アポトーシスにおけるカルバスタチンの分解と μ -カルパインの活性化

Jurkat 細胞に抗 Fas 抗体を添加しアポトーシスを誘導した。各時間で細胞を回収し、カルバスタチン (A) および PARP (B)、活性型 μ -カルパイン (C) についてイムノブロットを行った。(C) は μ -カルパインの活性化に伴う自己消化により活性型 μ -カルパインに新たに露出される N 末端配列を認識する抗体を用いた。

アポトーシスにおけるカルバスタチン分解に関与するプロテアーゼを同定するために、種々のプロテアーゼ阻害剤を用いて解析を行った。結果として、カスパーゼ-3/-7 阻害能を有する阻害剤でのみカルバスタチン分解は抑制された。このことから、カルバスタチンはカスパーゼ-3 様プロテアーゼで切断されることが示唆された。また、大腸菌で発現させたカルバスタチンをアポトーシス細胞より調製した細胞質画分およびカスパーゼ-3、カスパーゼ-7 と反応させることによりアポトーシス細胞で観察される 90 kDa フラグメントが確認された。90 kDa フラグメント生成はカスパーゼ-3 阻害剤によって抑制されることから、カルバスタチンはアポトーシスにおいてカスパーゼ-3/-7 によって切断されることが明らかとなった。また、90 kDa フラグメントの N 末端配列解析の結果から、カルバスタチンは 233 残基目のアスパラギン酸 (DAID233/A) で切断されていることが判明した。

カルバスタチンは 4 つのカルパイン阻害領域を持つため、1 分子で 4 分子のカルパインを阻害する。カスパーゼ-3 の切断によって生じる 90 kDa フラグメントは N 末端側にある阻害領域を消失しているためカルパイン阻害活性が減少する。また、アポトーシス細胞で 90 kDa フラグメントの増加が見られないことから、細胞内のカルバスタチン活性は減少していると考えられる。アポトーシスでカルバスタチンの分解後に μ -カルパインが活性化することから、カスパーゼ によるカルバスタチン分解がカルパイン活性化に必要であると推察された。このことは、カスパーゼがカルバスタチン分解を介してカルパイン活性化を誘導するという、プロテアーゼ間の cross-talk がアポトーシスにおいて存在することを示唆し

ている。

第二章 切断部位特異抗体によるカスパーゼ-3 基質タンパク質の解析

カスパーゼ-3 およびカスパーゼ-7 (以下、カスパーゼ-3 で代表表記) はアポトーシスの実行に重要な働きをする。これらのプロテアーゼは基質タンパク質に存在する DXXD 配列を主に認識し切断する。この切断によって生じる基質タンパク質の N 末端側断片には DXXD-COOH という新たな C 末端配列が露出される。切断部位特異抗体はプロテアーゼの切断によって生じる N 末端配列または C 末端配列を認識する抗体である。今回、第一章で同定したカルパスタチンの切断部位に対する抗体によってアポトーシス依存的にカルパスタチンとは異なるタンパク質が検出された。解析の結果、この抗体はカスパーゼ-3 の切断により生じた C 末端配列を認識していることが明らかとなった。この結果から、切断部位に対する抗体 (カスパーゼ-3 切断部位特異抗体) によってカスパーゼ-3 の基質検索が可能であることが示され、本研究ではこの方法を用いて基質タンパク質の解析を行った。

今回、カルパスタチンの切断部位に対する抗体 (#1234 抗体) と Hsp 110 family に属する Apg-2 (ATP and peptide-binding protein in germ cells -2) に存在するカスパーゼ-3 認識配列に対する抗体 (#1339 抗体) の 2 種類の抗体を作製した。これらの抗体によってアポトーシス依存的にイムノプロットで観察されるフラグメントの構造解析を行った。作製した抗体および抗原ペプチド配列、アポトーシス依存的に認識されたフラグメント、同定したタンパク質を表 1 に示した。

表 1. 作製した抗体と同定されたタンパク質

抗体名	抗原ペプチド配列 (タンパク質名(アミノ酸残基番号))	認識フラグメント	同定タンパク質
#1234 抗体	(C)SSKPIGPDDAI D-COOH (カルパスタチン(222-233))	95 kDa	非骨格筋型ミオシン重鎖(A 型)
#1339 抗体	(C)IISSFKNKEDQYDHL D-COOH (Apg-2 (712-727))	125 kDa 93 kDa 85 kDa	Ku80

本研究において非骨格筋型ミオシン重鎖 (A 型) (nonmuscle myosin II-A; 以下、myosin II-A と略) と DNA 依存性プロテインキナーゼの構成要素である Ku80 がアポトーシス依存的に抗体によって検出された。これらのフラグメントはアポトーシス誘導時にカスパーゼ-3 阻害剤を添加することによって観察されなかったことからアポトーシスにおいてカスパーゼ-3 によって切断されることが示唆された。また、今回作製した抗体はアポトーシス細胞で myosin II-A や Ku80 を認識したが、アポトーシスを誘導していない細胞ではこれらのタンパク質を検出しなかった。抗体作製に使用した抗原ペプチドにはカスパーゼ-3 の切断によって生じる C 末端配列 DXXD-COOH が存在し、この C 末端配列に対する抗体が生成されている事を確認している。よって、今回作製した抗体はカスパーゼ-3 切断によって新たに露出された myosin II-A や Ku80 の C 末端配列を認識していると考えられ、抗体の認識配列は切断部位と一致していることが推測された。そこで、抗体の認識配列解析を行った。解析は合成ペプチドを用いて行った。実

際には myosin II-A や Ku80 に存在するカスパーゼ-3 認識配列およびそれに類似した配列を C 末端に持つペプチドを合成し、抗体のフラグメント認識を阻害するペプチドを見出した。このフラグメント認識を阻害するペプチドの配列から抗体の結合部位、すなわちカスパーゼ-3 の切断部位を決定した。解析の結果、同定された切断部位を表 2 に示した。なお、myosin II-A は表 2 で示した以外にも #1234 抗体で検出された 95 kDa フラグメントの N 末端配列解析の結果から 1153 残基目のアスパラギン酸 (DTLD1153/S) でも切断されていることが明らかとなった。

表 2. 抗体結合反応阻害実験による切断部位の解析

タンパク質名	阻害ペプチド	切断部位
myosin II-A	AGDGSDEEVD-COOH	EEVD1948/ GK
Ku80	TAAVFEEGGDVDDLLD-COOH	DLLD730/MI

以上の結果から、カスパーゼ-3 切断部位を認識する抗体によって基質タンパク質の検索と切断部位の解析が可能であることが示された。これまでにカスパーゼ-3 の基質タンパク質は多数報告されているが、その同定方法は第一章で見たカルパスタチンと同様にアポトーシスでの挙動変化を指標に解析されてきた。これに対して抗体を用いた基質タンパク質解析法は切断されたフラグメントから解析する方法で、切断による分子量変化が少ない基質タンパク質の検索も可能である。また、切断部位の決定は切断フラグメントのアミノ酸配列解析によるものが主な方法であったが、今回行った抗体と合成ペプチドによる切断部位解析法は従来の解析法に比べ非常に簡便な方法である。本研究で行った抗体を用いた基質検索法および切断部位解析法はカスパーゼの基質検索に有用であると考えられ、この方法を用いたさらなる基質解析が期待される。

切断部位特異抗体によるイムノブロット
アポトーシス

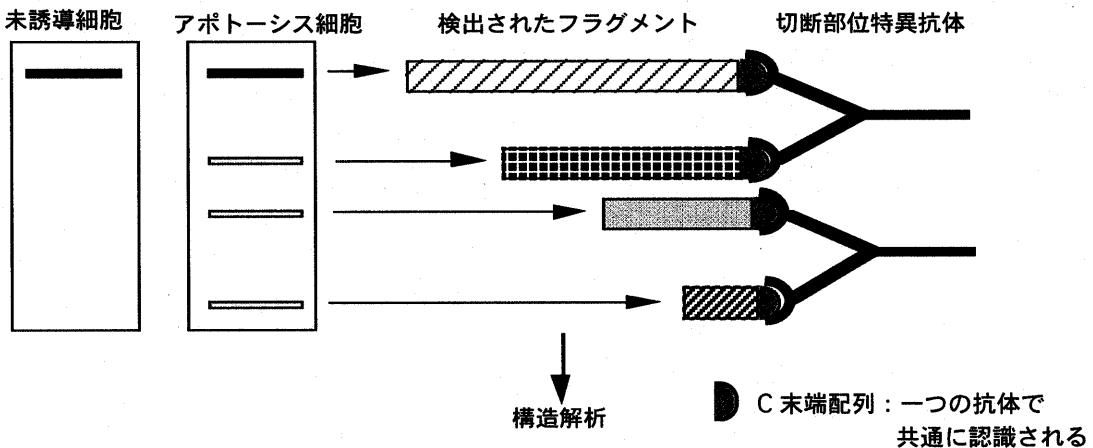


図 2. 切断部位特異抗体による基質タンパク質検索の概念図

切断部位特異抗体はカスパーゼ-3 の切断によって生じる C 末端配列を認識する。この配列と類似する C 末端配列を持つタンパク質はアポトーシス未誘導細胞でも認識される。