

論文の内容の要旨

論文題目 Specific inhibition of death receptor-mediated cell death by caspase-8 and -10 prodomains

カスパーゼ 8 および 10 のプロドメインによる death receptor を介する細胞死の特異的阻害

氏名 鹿間 芳明

カスパーゼ 8、10 は、Fas や TNF レセプター等のいわゆる death receptor を介するアポトーシスシグナルを伝達すると考えられている。これらの分子は N 端側にプロドメインと呼ばれる領域、C 端側にプロテアーゼドメインを持ち、後者はさらに large subunit と small subunit に分けられる。Death receptor にリガンドが結合すると、FADD というアダプター分子とカスパーゼ 8、10 プロドメインとの相互作用を介して、レセプターの細胞内部分にカスパーゼ 8、10 が集められ、蛋白複合体 (death inducing signaling complex, DISC) が形成される。カスパーゼ 8、10 は、この DISC 内で上述の各サブユニットの接続部が切断されて活性化する。

カスパーゼ 8、10 のプロドメイン領域のみを細胞内に高発現させると、線維状の凝集塊を形成することが知られている (death effector filament, DEF) が、現在のところこの構造の意義は不明である。以前の研究で我々は、カスパーゼ 8、10 の全長の場合とは異なり、これらのプロドメインのみ (PDCasp8、PDCasp10) を高発現しても細胞死は誘導されないことを示したが、このことから我々は、これらのプロドメインがレセプターを介する細胞死のシグナル伝達を阻害するのではないかという仮説を立て、種々の刺激による細胞死に対する PDCasp8、10 高発現の影響を調べた。

はじめに我々は、GFP (green fluorescent protein) タグを用いて、全長カスパーゼ 8、10、及び PDCasp8、PDCasp10 の細胞内分布を検討した。カスパーゼ 8、10 の全長と GFP の融合蛋白を 293 及び HeLa 細胞に高発現させると、カスパーゼ 8 あるいは 10 は細胞質内に均一に分布し、核内にはほとんど GFP の蛍光はみられなかった。一方、

PDCasp8、PDCasp10 を高発現させると、細胞質内に線維状の凝集塊を形成した。また、PDCasp8 あるいは PDCasp10 と FADD を共に高発現させると、FADD の分布は DEF に一致した。この線維状凝集塊は、既存の細胞骨格を構成する蛋白の局在と一致するという報告はなく、我々の実験でもアクチンや α -チューブリンの局在とは一致しなかった。ところが、同様に PDCasp8 または 10 を高発現させた細胞を、ゴルジ体のマーカーである GM130 に対する抗体で免疫染色したところ、DEF の分布はゴルジ体の分布と一致した。

野生型カスパーゼ 8、10 を 293 及び HeLa 細胞に高発現させると著明な細胞死が観察されるが、PDCasp8、PDCasp10 の高発現では、ほとんど細胞死は起こらなかった。そこで我々は、カスパーゼ 8 あるいは 10 と PDCasp8 あるいは 10 の発現ベクターを同量ずつ導入し、細胞死の誘導をルシフェラーゼアッセイで調べた。野生型カスパーゼ 8 の高発現により誘導される細胞死は、PDCasp8 あるいは 10 を同時に高発現させることによって抑制された。一方、野生型カスパーゼ 10 の高発現による細胞死は、PDCasp8、PDCasp10 の高発現によって抑制されなかったことから、カスパーゼ 10 を介する細胞死のシグナル伝達経路はカスパーゼ 8 を介するものとは異なっている可能性が示唆された。

PDCasp8、PDCasp10 にはそれぞれ、death effector domain (DED) と呼ばれる領域が 2 つずつ含まれおり、FADD 分子の DED 領域と結合するとされている。次に我々は、PDCasp10 の種々の欠失変異体をコードする発現ベクターを作成した。いずれの変異体も、N 端に EGFP のついた融合蛋白となっている。これらの変異体を HeLa 細胞に高発現させ、EGFP 発現細胞のうち線維状凝集塊がみられた細胞の割合を算出した。N 端、C 端のいずれかから約 20 アミノ酸を欠失した変異体は線維状凝集塊の形成能を維持していたが、約 30 アミノ酸以上を欠失してしまうと線維状凝集塊の形成はみられなくなった。また、これらの変異体の FADD との結合能を免疫沈降法で調べたところ、全長 PDCasp8、10 に加え、線維状凝集塊を形成し得た変異体のみが、FADD との結合能を示した。

我々は次に、Fas レセプター刺激による細胞死を、PDCasp8、PDCasp10、およびその欠失変異体が抑制できるかどうかを調べた。予想されたように、PDCasp8、PDCasp10 はともに、Fas レセプター刺激による細胞死を有意に抑制した。それに加え、先の実験と同様、PDCasp10 の欠失変異体のうち、線維状凝集塊を形成するものだけが、Fas レセプター刺激による細胞死を抑制した。以上をまとめると、DEF の形成、FADD との結合、及び death receptor を介する細胞死の抑制には、PDCasp10 の 2 つの DED がいずれも必要であることが示された。

最近、カスパーゼ 8 及びその類似蛋白、すなわち DED ドメインを有する FADD、c-FLIP、カスパーゼ 10 等の蛋白に NF- κ B 活性化能があることが報告された。NF- κ B は細胞の増殖、炎症反応、アポトーシス制御等にかかわる様々な遺伝子を制御する転写因子であるが、アポトーシスに対しては抑制的に働くことが多いとされている。カスパーゼ 8、10 の高発現による NF- κ B 活性化は、各々のプロドメイン領域のみを高発現させた場合でもみられるという。そこで我々は、PDCasp8、PDCasp10、及び PDCasp10 の欠失変異体の NF- κ B 活性化能を調べた。PDCasp8、PDCasp10 を高発現させると NF- κ B の活性化が観察されたが、PDCasp10 の欠失変異体に関しては、N 端あるいは C 端から約 20 アミノ酸を欠失したもののみが NF- κ B 活性を有し、それ以上削ったものでは活性がみられなくなった。このように、death receptor を介する細胞死を阻害し得るこれらのポリペプチドが NF- κ B の活性化をも引き起こすことから、これ

が細胞死抑制のメカニズムのひとつである可能性も考えられた。

Fas を介するシグナル伝達はリンパ球のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすと考えられている。次に我々は、抗 Fas 抗体による刺激に感受性を示す、ヒト T 細胞由来の細胞株である Jurkat 細胞を用いて実験を行った。EGFP と融合した PDCasp8 あるいは PDCasp10 をコードする発現ベクターを Jurkat Tet-On 細胞に stable に導入し、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (DOX) 処理にて発現を誘導した。293 や HeLa 細胞と同様に、これらのプロドメインは Jurkat 細胞内でも DEF を形成した。

このように作成した Jurkat クローンを用いて、我々は PDCasp8、10 が Fas を介する細胞死を抑制するかどうかを検討した。DOX 処理にて PDCasp8 あるいは PDCasp10 の発現を誘導した後、フローサイトメトリーでゲートをかけて GFP 陽性細胞と陰性細胞に分け、各々についてアポトーシスの解析を行った。GFP 陰性群では抗 Fas 抗体処理によりアポトーシス細胞数が増加したが、GFP 陽性群では増加しなかった。このことから、PDCasp8 の発現により、Jurkat 細胞でも Fas を介するアポトーシスが抑制されることが示された。また、このアポトーシス抑制は、カスパーゼ 8、及びその下流のカスパーゼ 3 の切断、活性化の阻害を伴っていることから、カスパーゼ活性化の上流で抑制が起こっていることが示された。一方、プロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロスポリン (STS) で処理すると、GFP 陽性群、陰性群いずれでもアポトーシス細胞数が増加したことから、これらのプロドメインの抗アポトーシス作用は Fas を介する経路に特異的であることが示唆された。

近年、新たな TNF ファミリーメンバーである TRAIL (Apo-2L) が同定された。TRAIL はそのレセプターである death receptor 4 (DR4、あるいは TRAIL-R1)、および DR5 (あるいは TRAIL-R2) に結合して、主として形質転換した細胞や腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する。PDCasp8 や PDCasp10 が TRAIL により誘導されるアポトーシスをも抑制するかどうかを調べるために、我々は HeLa 細胞及び Jurkat クローンをヒト組換え TRAIL で処理し、細胞死の程度をそれぞれルシフェラーゼアッセイ及びフローサイトメトリーで解析した。PDCasp8、PDCasp10 いずれも、HeLa 及び Jurkat 細胞において、TRAIL により誘導される細胞死を抑制した。

以上のことから、PDCasp8 および PDCasp10 は各々の全長に対する dominant-negative な阻害効果を持つことが示された。カスパーゼ 8、10 にはいずれも、PDCasp8 および PDCasp10 に類似したプロドメイン領域のみのアイソフォームが存在することが知られているが、カスパーゼ 10 の各アイソフォームの発現は各組織の間で、またがん細胞由来の種々の細胞株の間でも大きく異なっていることが報告されている。さらに、プロテアーゼ部分を持たないカスパーゼ 8 アイソフォームの一つが最近新たに見出されたが、このアイソフォームの末梢血単核球での発現レベルが、一部の SLE 患者では健常人に比べ有意に低下しているという。今回の実験結果から、これらのアイソフォームが、death receptor を介する細胞死のシグナル伝達に対する制御機構を担っている可能性があると考えられた。