

論文の内容の要旨

論文題目 Apollon/Bruce Ubiquitinates Smac and Caspase 9, and Plays an Indispensable Role in Antiapoptotic Activity against Smac

和 訳 Apollon/Bruce による Smac および Caspase 9 のユビキチン化とアポトーシスの制御に関する研究

指導教官 鶴尾 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 郝 艶彦

【序】

アポトーシスは細胞が能動的に自己を死に導く現象で、全ての多細胞生物の発生および恒常性の維持において重要な役割を果たしている。アポトーシス制御機構の異常により癌、自己免疫疾患、アルツハイマー病等様々な疾患が誘発される。アポトーシス制御に関わる分子として近年注目されているものの一つに、IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) と呼ばれる N 末端に BIR (Baculovirus IAP Repeat) ドメインを持つ一群のタンパク質がある。IAP は、アポトーシスの実行過程において中心的な役割をもつ Caspase と結合し、その活性を阻害することによりアポトーシス抑制に働くことが明らかとなっている。ヒト IAP としては、cIAP1、cIAP2、XIAP、NAIP、Survivin、Livin 等が知られている。RING フィンガーをもつ XIAP、cIAP1、cIAP2 はユビキチン-プロテアソーム-システムの E3 として機能し Caspase の分解や自己の分解による制御等を行っていると考えられている。

Apollon は当研究室で BIR ドメインの相同性を基に、新規ヒト IAP ファミリータンパク質として単離された。Apollon は分子量 530 kDa の巨大なタンパクであり、分子内に一つの BIR ドメインと UBC (Ubiquitin-Conjugating Enzyme) ドメインを持つユニークな構造を持っている(Fig. 1)。

Apollon の相同遺伝子はハエにも存在し、そ

のアミノ酸配列は特に BIR ドメインと UBC ドメインでよく保存されており、これらのドメインが重要な機能を果たしていると考えられる。本研究において私は、Apollon による細胞死の制御とその分子機能を解明する目的で研究を行った。

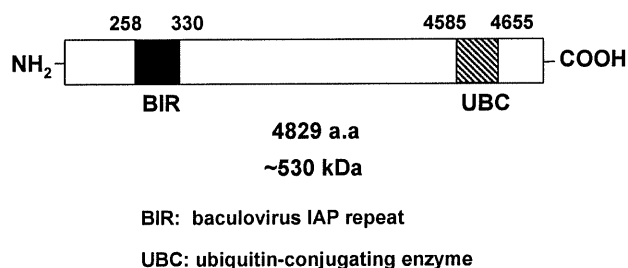


Fig. 1 Apollon の構造

【方法と結果】

Apollon による細胞死の抑制

ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞に Caspase 8、9 を一過性に発現させるとアポトーシスを起こす。このとき Apollon 全長を Caspase 8、9 と同時に発現させると、Caspase により誘導されるアポトーシスを抑制した。さらに、より生理的に近い条件で Apollon の機能を検討するために、Apollon 全長の恒常性発現細胞株を樹立した(Fig. 2 A)。それらの細胞を用いた実験から、Apollon を発現した細胞は、抗癌剤、TNF や Fas 刺激等によるアポトーシスに耐性となることが明らかとなった(Fig. 2 B)。次に Apollon の恒常性発現細胞株を用いて各種細胞死刺激による Caspase 活性化を DEVD-MCA 切断活性で調べたところ、Apollon 発現細胞では Caspase 3 活性化が抑制されていることが分かった。以上の結果から、Apollon は他の IAP ファミリータンパク質と同様に、アポトーシスを阻害することが明らかとなった。

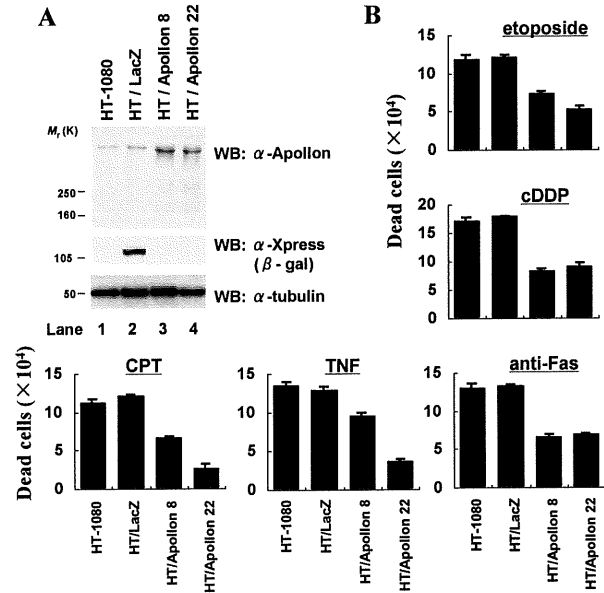


Fig. 2 Apollon による細胞死の抑制

Apollon と Smac、Caspase 9、HtrA2 との結合

Smac はアポトーシスに伴いミトコンドリアから放出され、XIAP、cIAP1、cIAP2 の BIR ドメインに結合し、その Caspase 阻害活性を失わせることが知られている。そこで、Apollon にも Smac との結合が認められるかどうか検討した。免疫沈降実験の結果、Apollon は成熟型 Smac 蛋白質と結合することが分かった。成熟型 Smac は、N 末端に IAP 結合モチーフがある点が他の pro-apoptotic 分子である HtrA2、active Caspase 9 によく似ている。実際、*in vivo* において Apollon は Smac と結合するのみならず、HtrA2、Caspase 9 とも結合することが明らかとなった (Fig. 3 A)。

Apollon の各種欠失変異体を用いた実験より、Apollon の 1~1648 番アミノ酸の断片が Smac、HtrA2、Caspase 9 と結合す

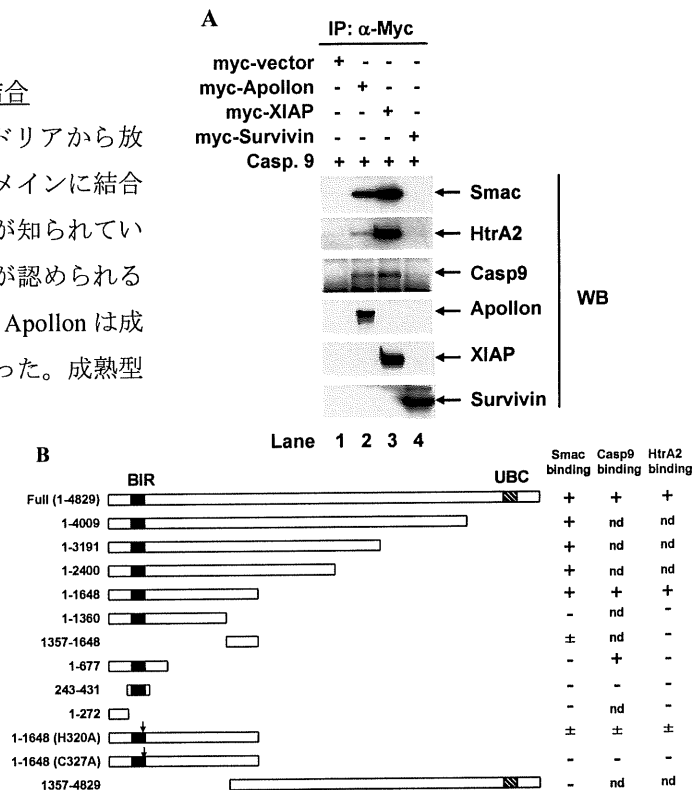


Fig. 3 Apollon と Smac、Caspase 9、HtrA2 との結合

ることが示された。さらに Apollon の 1~677 番アミノ酸断片は Caspase 9 と結合することが確認された。以上の Apollon 断片は BIR ドメインを含んでいる。BIR ドメインに変異を加えた 1-1648 C327A は三つのタンパク質との結合活性を失ったことから、Apollon の BIR ドメインは Smac、Caspase 9、HtrA2 との結合に重要であることが考えられる(Fig. 3 B)。

一方、未成熟型 Smac、HtrA2 前駆体は Apollon 結合能を持たず、ミトコンドリアターゲッティングシグナル (MTS) が切断された成熟型となって Apollon と強く結合することが分かった。また、成熟型 Smac、HtrA2 の N 末端 4 アミノ酸残基の直前に methionine をつけ加えると、Apollon との結合能を完全に失うことから、N 末端 4 アミノ酸が Apollon との結合に重要であることも示された。

Apollon による Smac、Caspase 9 のユビキチン化と分解

Apollon は C 末端に他の IAP ファミリーにはない UBC ドメインを持つ。この UBC ドメインは、異種間でよく保存されていることから何らかのタンパク質のユビキチン-プロテアソーム-システムによる制御を行っている可能性が考えられた。私は、Apollon は *in vivo* で Smac、活性化 Caspase 9 をポリユビキチン化することを見出した(Fig. 4 A)。さらに、Apollon を過剰発現した細胞では、Smac、Caspase 9 の分解が亢進していた (Fig. 4 B and C)。それに対して、Apollon と結合しない Smac の変異体は分解が亢進されなかった。これらの結果から、Apollon は Smac、Caspase 9 と結合し、これらの分子のユビキチン-プロテアソーム-システムによる分解を促進することにより、アポトーシスを阻害していることが明らかとなった(Fig. 5)。

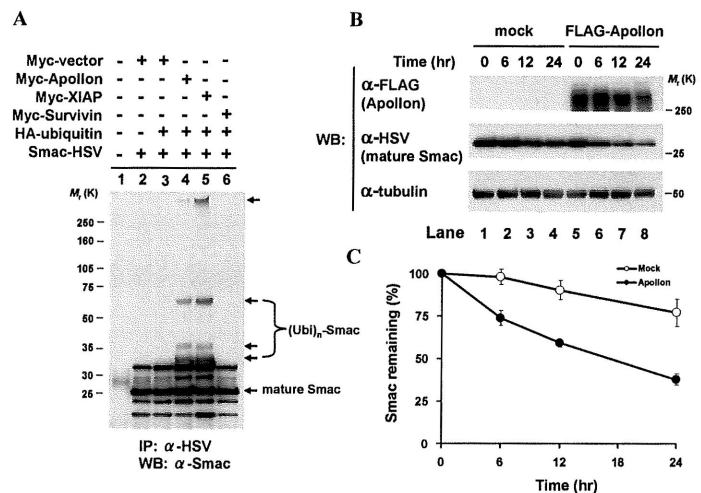


Fig. 4 Apollon による Smac のユビキチン化と分解促進

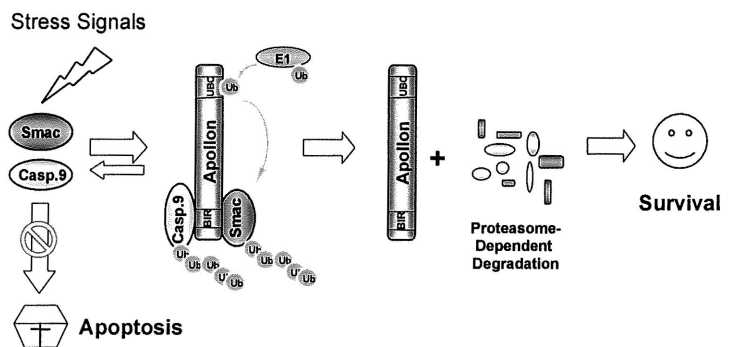


Fig. 5 Apollon の分子機能モデル

Smac による Apollon 欠損細胞の細胞死誘導

生理的発現量の Apollon による細胞死の制御を解析するために、Apollon 欠損マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を用いてアポトーシス刺激に対する感受性を検討したところ、Apollon 欠損 MEF は、抗癌剤や Fas 抗体などさまざまなアポトーシス刺激に高感受性を示した。このことから、生理的発現量の Apollon が、細胞死制御に重要な役割を果たしていることが示された。

正常細胞では、Smac を過剰発現してもアポトーシスが起こらない。アポトーシス刺激があると成熟型 Smac はミトコンドリアから細胞質へ放出され、IAP に結合することでアポトーシスを増加す

る。それに対して、Apollon^{-/-} MEF 細胞では全長 Smac や細胞質に発現する活性型 Smac を発現するとそれだけで細胞死が引き起こされることを見出した。また、この細胞死は Apollon、XIAP の発現により抑えら

れた。さらに、IAP を特異

的に阻害する細胞透過性の Smac N ペプチド(Smac N7-R8)を用いて検討したところ、Apollon^{-/-} MEF 細胞において細胞死の誘導活性を持つことを見出されたが、Apollon^{+/+} MEF 細胞では、有意な差が認められなかった。このことから、Apollon 欠損 MEF における Smac の細胞死誘導は、Smac の N 末端アミノ酸残基に依存することが考えられる。さらに Smac の役割を調べるため、一連の Smac 変異体を作製し、Apollon^{-/-}細胞と Apollon^{+/+}細胞との感受性の差を検討したところ、アポトーシスの誘導は成熟型 Smac の N 末端 AVPI 配列に依存することが確認された(Fig. 6 A and B)。siRNA により Apollon の発現をノックダウンさせた細胞でも同様の結果が得られた。これらの結果から、Apollon は Smac による細胞死誘導の制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

【まとめと考察】

本研究において、Apollon は Smac、Caspase 9 と結合し、これらの分子のユビキチン-プロテアソーム-システムによる分解を促進することにより、アポトーシスを阻害していることが明らかとなった(Fig. 7)。また、Apollon 欠損マウス由来の細胞はさまざまな刺激に対する細胞死感受性が高まることから、Apollon は生理的にアポトーシス抑制作用に重要であると考えられる。興味深いことに、Smac を過剰発現すると Apollon 欠損細胞において細胞死を誘導したこと

から、Apollon は Smac による細胞死誘導から細胞を守るために必要な分子であることがはじめて示された。Apollon は巨大な分子であり、今回示した Smac、Caspase 9 以外にも、Apollon と結合し、ユビキチン化等の制御を受ける分子が存在する可能性が考えられる。今後、Apollon の結合タンパク質、分子機能等についてさらに詳細に解析する必要がある。

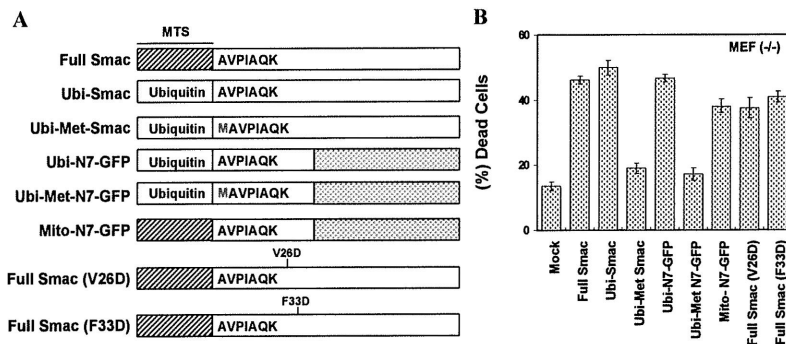


Fig. 6 Apollon 欠損細胞での Smac による細胞死

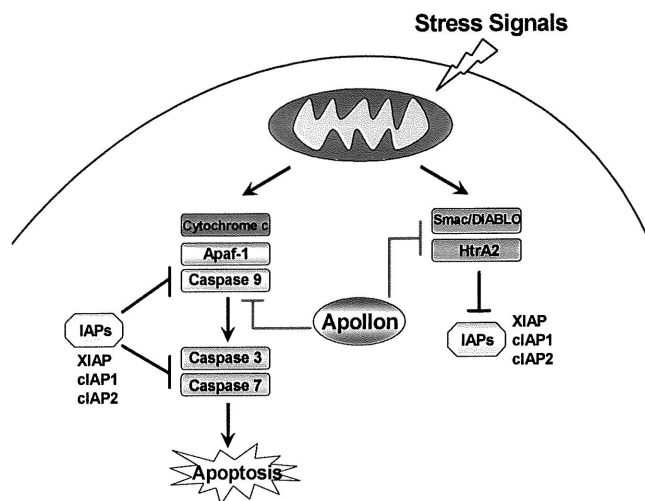


Fig. 7 Apollon によるアポトーシス阻害の模式図