

論文の内容の要旨

論文題目 Cdc6 Inhibits Apoptosome-mediated Caspase-9 Activation

和訳 Cdc6 はアポプトソームを介したカスパーゼ 9 の活性化を抑制する

氏名 新美 晋一郎

造血細胞以外の全ての細胞は、増殖するのは細胞外マトリックス、すなわち足場への接着を必要とする。その接着を無くす（足場消失のシグナル）と、細胞は細胞周期の G1 期に停止するか、アポトーシスを誘導する。しかし、癌化した細胞では、接着を無くしても増殖することができるようになる。この能力は腫瘍形成及び転移能とよく相関することから、発癌機構の根底をなすと考えられている。

最近、当研究室の竹内らは、足場消失のシグナルが mTORC1(mammalian target of rapamycin complex 1)の不活化を引き起こすことによって、G1 期で停止することを見出した。増殖刺激を受けると Tsc2 が不活性化されることによって Rheb が活性化される。その後 Rheb によって活性化された mTORC1 が翻訳効率を上昇させることによって増殖亢進する機能を持っている。この活性は癌細胞では高く、細胞癌化の一因と考えられている。その一方で、mTORC1 はアポトーシスを誘導するという癌抑制能を果たす一面も持ち合わせている。Tsc2 の変異もしくは活性型 Rheb による mTORC1 の恒常的活性化によって足場消失によって引き起こされる G1 期細胞周期因子の発現停止をすべて抑制できるが、細胞周期の G1 期停止、アポトーシスの誘導からは逃れることはできない。これらから逃れるためには、mTORC1 の活性化以外に Cdc6 の発現が必要である。Cdc6 の主な機能は、染色体上の複製開始点で複製前複合体を形成することである。私は、細胞癌化は、単なる mTORC1 の活性化の持続が原因ではなく、mTORC1 によるなんらかの影響を受けること、もしくは mTORC1 の機能の部分的な不活化によって、アポトーシスなどの癌抑制機構が遮断された

結果である可能性を考えた。そこで、(1) mTORC1 の活性化によって足場消失時にアポトーシスが誘導されるか、(2) 誘導されるならば、そこから先どのようにしてアポトーシスが抑制されるか、について解析し始めた。

mTORC1 が活性化すると、E2F-DP1 転写複合体が活性化される。その結果、*cdc6*, *cyclinA* のような S 期開始に必要な因子の遺伝子の転写が活性化される。しかし、E2F は Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) というアポトーシスを制御する遺伝子の発現の誘導活性をもつ。Apaf-1 は、アポトーシスの誘導活性をもつ蛋白質複合体 (アポプトソーム) の構成因子の一つとして同定され、その後のいくつかのグループによる解析で、アポプトソームに取り込まれた Apaf-1 はカスパーゼファミリーの一つであるカスパーゼ-9 を活性化することでアポトーシスが誘導されることが示された。ストレス非存在下では、Apaf-1 は、”閉じた構造”すなわち N 末端のカスパーゼ-9 の結合部位が C 末端側のドメインに覆われている状態をしている。ストレスに曝されると、ミトコンドリアに存在するシトクロム c が Apaf-1 の C 末端に結合することによって、Apaf-1 は”開いた構造”すなわち Apaf-1 がカスパーゼ 9 に結合できる状態に変換される。

mTORC1 の恒常的活性化条件下の指標として、Tsc2 変異をもつラット由来の細胞 (Eker 細胞) もしくは活性型 Rheb を過剰したラット胎生線維芽細胞 (REF 細胞) を用いて足場消失時にアポトーシスが誘導されるかを調べた。その結果、これらの細胞では野生型 REF 細胞と比べて、Apaf-1 の発現が転写レベル、蛋白質レベルで発現が高いまま維持されること、カスパーゼ 9 の活性化が著しく上昇することが観察された。さらに、このカスパーゼ 9 の活性化は、Cdc6 の発現によって抑制されることを発見した。故に、mTOR 活性化条件下における足場消失時に起こるアポトーシスの遮断は、Cdc6 の発現の影響であることが示唆された。

次に、Cdc6 がカスパーゼ 9 の抑制に直接的に働くかを突き止めるために、足場消失時における Cdc6 とアポプトソームの構成因子 (Apaf-1、カスパーゼ 9、シトクロム c) との結合の変動を調べた。その結果、Cdc6 を過剰発現させると、Cdc6 がシトクロムを含んだ Apaf-1 に結合することによって、カスパーゼ 9 と Apaf-1 の結合すなわちアポトーシス複合体 (アポプトソーム) の形成を阻害することが示唆された。さらに、この Cdc6 の Apaf1 への結合は ATP 加水分解を伴っていることを明らかにした。