

Caspase とその阻害因子 XIAP の各結合蛋白質の 単離・同定：そのアポトーシス制御機構

学位論文内容の要旨

アポトーシスは、発生の過程や生体の防御反応において重要な役割を担っており、また脳虚血やアルツハイマー病といった神経変性疾患においても神経細胞のアポトーシスが惹起されていることが知られている。アポトーシスの実行過程は、アポトーシスを引き起こす proapoptotic factor と、逆にそれを防ぐ因子 antiapoptotic factor によって巧みに制御されている。本研究では proapoptotic factor の代表的な分子である caspase と antiapoptotic factor である XIAP に着目し、アポトーシス制御の分子メカニズムの解明を目的として、以下に記す2種の解析を行った。

1. Yeast two-hybrid 法による caspase-7 の新規基質蛋白質の単離

caspase は、哺乳類において現在までに14種が同定されている。中でも caspase-3、-6 および-7 は様々な細胞内基質を切断することによりアポトーシス特有の形態変化を引き起こすアポトーシス実行因子として知られている。caspase-3 と-7 は、そのアミノ酸配列および基質特異性において非常に類似しているが、caspase-3 と比較して caspase-7 のアポトーシス誘導時における役割はいまだ明らかになっていない。そこで筆者は、caspase-7 の基質の単離を試みた。現在までに同定されている caspase-3 および-7 の結合蛋白質は、すべて不活性化型 pro-caspase には結合せず、プロセシングを受けて活性化型となった caspase とのみ結合することが知られている。したがって、rev-caspase-7 とよばれる恒常的に活性化型の caspase-7 を構築した。また、rev-caspase-7 は、自ら有する活性によって yeast に対し毒性を示すため、活性部位の cystein を serine に変異させた変異体(Rev-C/S)をベイトとして用い、yeast two-hybrid 法によるマウス脳 cDNA ライブラリースクリーニングを行った。

その結果筆者は、caspase-7 結合蛋白質としてプロテアソーム活性化因子 PA28 γ の単離に成功した。PA28 γ は、in vitro において caspase-3 および-7 によって切断され、また予想される切断部位 DGLD⁸⁰ を変異させることによって、その切断が完全に抑えられた。また HeLa 細胞において、Fas 刺激により濃度依存的に内在性 PA28 γ がプロセシングを受け、caspase 阻害薬 z-VAD-fmk および z-DEVD-fmk を前処理することにより、そのプロセシングは完全に抑えられた。さらに caspase-3 欠損型の MCF-7 細胞において、シスプラチン刺激によりその処理時間依存的に内在性 PA28 γ がプロセシングを受

け、同様にそのプロセッシングは caspase 阻害薬により完全に抑制された。これらの結果は、PA28 γ がアポトーシス誘導時において caspase-7 および-3 の細胞内基質であることを示し、caspase によるアポトーシス誘導に対するプロテアソーム系の関与を示唆するものである。またさらに、本研究により確立された rev-caspase を用いた yeast two-hybrid 法は、caspase の基質を単離する上で有効な手段であることを示すものである。

2. 質量分析による caspase 阻害因子 XIAP の結合蛋白質の精製

IAP (inhibitor of apoptosis protein)は、種々のアポトーシス刺激下において、細胞に対して保護的に作用する antiapoptotic factor として知られる蛋白質である。ヒトでは、現在までに5種の IAP ファミリー蛋白質が同定されているが、その中でも XIAP、c-IAP1 および c-IAP2 は、caspase-3、-7、-9 に直接結合し、その活性を阻害することが報告されている。そこで、この抗アポトーシス作用のメカニズムの解明を目的として、XIAP 結合タンパクの精製を行った。

実験には、より生体内の結合を反映させるために HEK293 細胞を用いた。細胞に過剰発現させた Flag-XIAP を抗 Flag 抗体によって免疫沈降し、その後 SDS-PAGE により XIAP 結合タンパクを分離した。分離された各々の蛋白質を質量分析により同定した結果、新規の XIAP 結合蛋白質として、apoptosis inducing factor (AIF)を見出した。AIF は、アポトーシス誘導時にミトコンドリアから核へ移行し、caspase 非依存的にアポトーシスを誘導する因子である。

XIAP に結合し、それを阻害する蛋白質として、現在までに Smac や Omi/HtrA2 といった因子が同定されているが、これらはいずれもアポトーシス刺激によってミトコンドリアから細胞質に漏出し、XIAP と結合し作用することが分かっている。したがって、同様にミトコンドリアタンパクである AIF が細胞質において XIAP と結合することは、大変興味深いものである。実際に、HEK293 細胞を用いて、抗 XIAP 抗体を用いた免疫沈降の結果から、内在性 XIAP と AIF の結合が確認された。また、他の IAP ファミリー蛋白質である c-IAP1、c-IAP2 と AIF との結合も確認されたが、survivin との結合は認められなかった。この結合様式は、Smac および Omi/HtrA2 のそれと一致するものである。

つぎに、アポトーシス誘導時における XIAP と AIF の結合の生理的意義について検討した。最近、ハエの Smac ホモログである reaper/grim が、XIAP ホモログである DIAP1 をユビキチン化し、その分解を促進するという報告がなされたことから、Smac および AIF が XIAP をユビキチン化し、分解を促進するか否かについて検討した。その結果、*in vitro* において、Smac および AIF が XIAP の自己ユビキチン化を促進する作用が認められ、また動物細胞内においても、Smac および AIF が XIAP の分解を促進する作用が認められた。そこで、AIF の抗 XIAP 作用をより明確に観察するため、AIF の細胞質への漏出がより顕著に起こるアポトーシス刺激について検討した。その結果、ミトコンドリア complex I 阻害薬である rotenone 刺激下において、Smac、HtrA2 に比べ、AIF の細胞質への漏出がより顕著に引き起こされることが確認された。そこで、rotenone 刺激下における AIF の XIAP 分解作用が、アポトーシス誘導に対してどのように影響するかについて検討した。その結果、rotenone 刺激下において、AIF 共発現により、XIAP

の細胞死保護作用および caspase 阻害作用が有意に抑制されることを見出した。以上より、種々のアポトーシス刺激によって AIF および Smac、HtrA2 の細胞質への漏出の度合いが異なり、AIF は、細胞質への漏出がより顕著に引き起こされるアポトーシス刺激下において、抗 XIAP 作用を示す可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 助 教 授 上 原 孝
副 査 助 教 授 平 敬 宏

学位論文題名

Caspase とその阻害因子 XIAP の各結合蛋白質の 単離・同定：そのアポトーシス制御機構

申請者は、アポトーシスの代表的な制御因子である caspase と XIAP に着目し、そのアポトーシス制御の分子メカニズムの解明を目的として、各々の結合蛋白質の単離およびその機能解析を行った。

申請者は、yeast two-hybrid 法により caspase-7 の新規基質蛋白質を単離する目的で、rev-caspase-7 とよばれる恒常的に活性化型の caspase-7 変異体を構築した。また caspase と基質の結合を安定させるため、その活性部位の cysteine を serine に変異させた変異体(Rev-C/S)を構築した。これをベイトとして用い、yeast two-hybrid 法による cDNA ライブラリースクリーニングを行った結果、caspase-7 の新規基質としてプロテアソーム活性化因子 PA28 γ を同定した。PA28 γ は、in vitro において caspase-3 および-7 によって切断され、また予想される切断部位 DGLD⁸⁰ を変異させることによって、その切断が完全に抑えられることを見出した。また HeLa 細胞において、Fas 刺激により濃度依存的に内在性 PA28 γ がプロセッシングを受け、caspase 阻害薬 z-VAD-fmk および z-DEVD-fmk を前処理することにより、そのプロセッシングが完全に抑制されることを明らかにした。さらに caspase-3 欠損型の MCF-7 細胞において、シスプラチン刺激によりその処理時間依存的に内在性 PA28 γ がプロセッシングを受け、同様にそのプロセッシングが caspase 阻害薬により完全に抑制されることを示した。これらの結果は、PA28 γ がアポトーシス誘導時において caspase-7 および-3 の細胞内基質であることを示し、caspase によるアポトーシス誘導におけるプロテアソーム系の関与を示唆する。またさらに、本研究により確立された rev-caspase を用いた yeast two-hybrid 法は、caspase

の基質を単離する上で有効な手段であることを示す。

XIAP は、caspase-3、-7、-9 に直接結合し、その活性を阻害することにより、細胞死シグナルに対して保護的に作用することが報告されている。そこで申請者は、この抗アポトーシス作用のメカニズムの解明を目的として、免疫沈降および質量分析による XIAP 結合蛋白質の単離同定を行った。その結果、新規の XIAP 結合蛋白質として、Apoptosis inducing factor (AIF)を見出した。AIF は、アポトーシス誘導時にミトコンドリアから核へ移行し、caspase 非依存的にアポトーシスを誘導する因子として知られている既知蛋白質である。XIAP に結合し、それを阻害する蛋白質として、現在までに Smac や HtrA2 が同定されているが、これらはいずれもアポトーシス刺激によってミトコンドリアから細胞質に漏出し、XIAP と結合し作用することが分かっている。したがって、同様にミトコンドリア蛋白質である AIF が細胞質において XIAP と結合することは興味深い。また、申請者は、HEK293 細胞を用いて、内在性 XIAP と AIF の結合を確認し、また他の IAP ファミリー蛋白質である c-IAP1、c-IAP2 と AIF との結合も確認した。さらに、アポトーシス誘導時における XIAP と AIF の結合の生理的意義について検討したところ、*in vitro* において、Smac および AIF が XIAP の自己ユビキチン化を促進すること、また動物細胞内において、Smac および AIF が XIAP の分解を促進することを見出した。また、ミトコンドリア complex I 阻害薬である rotenone 刺激下において、Smac、HtrA2 に比べ、AIF の細胞質への漏出がより顕著に引き起こされることを確認し、rotenone 刺激下における AIF の XIAP 分解作用のアポトーシス誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、rotenone 刺激下において、AIF 共発現により、XIAP の細胞死保護作用および caspase 阻害作用が有意に抑制されることを見出した。

以上、申請者は、yeast-two hybrid 法および免疫沈降法の二つの手法を用い、アポトーシス誘導に関わる結合蛋白質の単離を試み、いずれもターゲット蛋白質に特異的に結合する PA28 γ および AIF を同定することに成功した。したがって、本論文審査委員会は、これらの結果は、アポトーシスのメカニズム解明や、さらには脳虚血やアルツハイマー病といった神経変性疾患の解明へ向けて多大な情報をもたらすものと考え、本論文は博士（薬学）の学位を受けるに十分値するものと認めた。