

アポトーシスにおけるゲノム構造変化の分子機構と生理作用

長田重一 (CREST・大阪大学大学院医学系研究科)

動物細胞は絶えず、下界からの刺戟 (たとえば、ウイルス感染、紫外線、種々の化学物質) にさらされており、この刺激はゲノムを損傷する。アポトーシスは生体の恒常性を維持するうえでこれら傷ついた細胞、有害な細胞、無用の細胞を除去する細胞死の機構である。この過程では、カスパーゼと呼ばれる一群のプロテアーゼが順次、活性化され、種々の細胞内コンポーネントを切断し、細胞膜の湾曲、核の凝縮と断片化を引き起こし細胞を死へと導く。また、アポトーシスの最終段階では染色体 DNA がヌクレオソームの単位へと断片化される。

私達は、“death factor” として作用するサイトカイン、Fas リガンドとその受容体 (Fas) を介したアポトーシスのシグナル伝達の解析から、アポトーシス時に活性化される DNase (CAD, caspase-activated DNase) とその阻害蛋白質 (ICAD, inhibitor of CAD) を同定した。CAD は増殖している細胞内では ICAD と複合体を結合しており、アポトーシスの刺激によりカスパーゼが活性化されるとこのプロテアーゼが ICAD を切断、不活化し、これによって自由になった CAD が染色体 DNA を切断する。この染色体断片化の機構は Fas リガンドばかりでなく、抗癌剤、放射線照射などによって誘導されるアポトーシスの際も活性化される。

私達は、CAD, ICAD の組み換え蛋白質を大量に調製し、CAD はヒスチジン残基を活性部位に持ち、Mg イオンを要求する DNase であることを示した。一方、ICAD は CAD の阻害因子としての作用ばかりでなく、CAD が合成される際、その正常な蛋白質の folding を促進するシャペロンとして作用する。CAD の無細胞系での合成機構の解析から、CAD が合成される際、リボソーム上で CAD の N-末端領域が folding した後、その領域に ICAD が結合すること、その後 CAD の C-末端領域は N-末端に結合した ICAD とともに general chaperone である Hsp70, Hsp40 蛋白質により folding され、CAD・ICAD 複合体としてリボソームから遊離することが示された。そして、シャペロンとしての活性に必須な ICAD の領域 (N-末端 80 アミノ酸) および、その領域と CAD との複合体の NMR による構造解析から、CAD と ICAD の N-末端領域は同等の構造を持つこと、これらはイオン結合によって会合することが示された。

一方、カスパーゼによって切断されない ICAD の変異体を発現するトランスジェニックマウス、CAD, ICAD のノックアウト・マウスの解析から、アポトーシス時に染色体 DNA を切断する機構は、死につつある細胞で活性化される CAD によるものばかりでなく、アポトーシスを起こした細胞が食細胞に取り込まれた後、食細胞によって起る機構も存在することが示された。一方、ショウジョハエにおいても CAD, ICAD 遺伝子はそのアポトーシス時の DNA 切断に関与していることが認められ、この機構が哺乳動物ばかりでなくハエなどの下等動物にも保存された普遍的な機構であることが明らかとなっている。

参考文献

1. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456 (1995).
2. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
3. Enari, M. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
4. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99 (1998).
5. Nagata, S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genetics* **33**, 29-55 (1999).
6. McIlroy, D. *et al.* An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes & Develop.* **14**, 549-558 (2000).
7. Mukae, N. *et al.* Identification and developmental expression of inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**, 21402-21408 (2000).

8. Yokoyama, H. *et al.* A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**, 12978-12986 (2000).
9. Otomo, T. *et al.* Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nature Struct. Biol.* **7**, 658-662 (2000).
10. Sakahira, H., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* **275**, 8091-8096 (2000).