

Title	Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis
Author(s)	坂平, 英樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/41781
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	坂 平 英 樹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15214 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis (アポトーシス時における DNA 断片化の分子機構)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一 (副査) 教授 辻本 賀英 教授 高井 義美

論文内容の要旨

【目的】

アポトーシスは、様々な刺激に反応して細胞が除去される細胞死の過程であり、形態学的に細胞膜の湾曲、核の凝縮などを伴い、最終段階としてアポトーシス小体を形成して、細胞そのものが断片化する。また生化学的には、染色体DNAの断片化がアポトーシスの指標として知られており、電気泳動を行うと約180bpを単位としたDNAラダーとして観察される。この染色体DNAの断片化は、細胞死を決定づける最終的な出来事と考えられた。私は、この染色体DNAの断片化がどのような分子で制御されているのかを解明する目的で、これに関与する分子の精製、cDNAの単離を行い、その分子機構を解析した。

【方法ならびに成績】

Fasリガンドはその受容体Fasに結合すると、システインプロテアーゼであるCaspaseを活性化し、アポトーシスを誘導する。以前我々の研究室では、Fasを活性化した細胞からの抽出液が核に作用してアポトーシス(染色体DNAの断片化や核の凝縮)を引き起こすことを見いだした。さらに増殖している細胞からの抽出液をCaspase 3で処理しても、同様の現象が見られることをも示してきた。したがって染色体DNAの断片化を引き起こす因子は、正常に増殖している細胞の細胞質画分において不活性型として存在し、それはCaspase 3によって活性化されると考えられた。また核の代わりにプラスミドDNAを基質として用いると、Caspase 3に依存したDNase活性が顕著に検出されることから、このDNaseをCaspase-activated DNase、CADと命名した。一方、増殖している細胞のS100画分が、Fasで活性化した細胞の抽出液中のCAD活性を阻害できることも見出し、その因子をInhibitor of CAD、ICADと命名した。そこで、マウスリンパ腫由来のWR19L細胞株を200 μ l (4×10^6 細胞)を培養し、そのS100画分から、種々のカラムクロマトグラフィーを用いてICADを精製した。そして精製したタンパク質のアミノ酸配列を決定し、それをもとにICAD cDNAのクローニングを行ったところ、alternative splicingで生じたと考えられる2個の異なるcDNAが得られた。それらcDNAは、それぞれ331アミノ酸、265アミノ酸残基からなる酸性タンパク質(pI=約4.5)をコードしており、ICAD-L、ICAD-Sと命名した。分子量から推定して、精製したタンパク質はICAD-Sと考えられた。一方、共同研究者の江成らによって、CADはマウスリンパ節からICADのアフィニティーカラムを用いて精製された。その分子の遺伝子クローニングを行ったところ、そのcDNAは、344アミノ酸残基からなる塩基性タンパク質(pI=8.7)をコードしていた。ICADはそのアミノ酸配列上に、Caspase 3によって切断され

る部位を2箇所持っており、それらの部位に点変異を導入したタンパク質 (ICADdm) は、Caspase 3 に抵抗性になるが、CAD に対する阻害活性も失われなかった。そこで、スタウロスポリンで刺激すると、顕著にアポトーシスを起こす事が知られているヒト Jurkat を用いて、ICADdm を過剰発現させた細胞株 (JILdm 細胞) を樹立した。JILdm 細胞では、スタウロスポリン刺激により死滅するが、染色体 DNA の断片化は全く検出されなかった。また、核の断片化こそ起こらないものの、著明にクロマチン凝縮が引き起こされ、核の形態変化と DNA の断片化は独立した出来事であることが示唆された。一方、CAD を cell-free 翻訳系を用いて合成したところ、ICAD の有無にかかわらず CAD は発現するが、その DNase 活性は ICAD-L 存在下でのみ検出された。このことは ICAD-L が CAD 阻害分子としてのみならず、CAD の生合成時においてシャペロン様分子として機能することを示している。ICAD-L と同等の CAD 阻害活性をもつ ICAD-S においては、そのようなシャペロン様活性は認められなかった。また、CAD、ICAD-L、ICAD-S を発現する組換えバキュロウイルスを作成し、蚕由来の Sf9 細胞に共感染させたところ、ICAD-L が ICAD-S に比べ優位に CAD と複合体を形成した。また、Jurkat 細胞の S100画分をイオン交換カラムによって分画したところ、CAD 活性の画分と ICAD-L が一致したことから、ICAD-L は CAD と複合体を形成しており、ICAD-S はフリーな状態で存在していることが示された。

【総括】

本研究において、アポトーシス時の染色体 DNA の断片化が、DNase である CAD とその阻害分子である ICAD によって制御されていることが明らかとなった。さらに ICAD によって、アポトーシス時の染色体 DNA の断片化を完全に阻害しても、細胞死そのものは抑えられないことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスは、形態学的に細胞膜の湾曲、核の凝縮などを伴った、生理的な細胞死であり、生化学的には、染色体 DNA の断片化によって特徴づけられている。本研究は、アポトーシス時に染色体 DNA の断片化を引き起こす分子を同定し、その分子機構を明らかにしたものであり、学位の授与に値すると思われる。