



カスパーゼの新しい機能

1. はじめに

プログラム細胞死の分子機構は線虫の遺伝学的研究によってそのプレクスルがなされ、細胞死実行遺伝子 *ced-3*/カスパーゼが同定された¹⁾。カスパーゼは線虫から哺乳類まで保存されたシステインプロテアーゼで、その機能としては細胞死のメディエーターであることが知られている。しかし最近の研究によって、カスパーゼは細胞死の実行だけでなく、細胞分化、増殖、移動および炎症性サイトカインの放出といったさまざまな生理現象にも関与していることが明らかとなってきた²⁾。

本稿では、近年著者らがショウジョウバエの遺伝学を用いて明らかにしたカスパーゼの活性調節メカニズムと生理機能を中心に、カスパーゼの新しい機能について概説したい。

2. 感染とカスパーゼ

はじめに同定された哺乳類カスパーゼ（カスパーゼ1）はインターロイキン1 β 変換酵素（interleukin 1 β converting enzyme: ICE）であった。線虫から細胞死遺伝子 *ced-3* がクローニングされるとその配列にICEと相同性のあることがわかり、実際にICEは細胞死誘導能も有することが示された³⁾。このことから、カスパーゼの機能は細胞死と免疫系の両方に密接なかかわりをもっていることが予想された。ICEの活性化機構は長い間不明であったが、近年その一端が明らかにされてきた。それによるとアポトソーム中でカスパーゼ9が活性化されるように、ICEは、アダプター分子ASC、Apaf-1に構造的に似たNALP-1、-3、Ipafといった分子と複合体を形成して活性化される（図1）。このICEを活性化する複合体はインフラマソームとよば

れる⁴⁾。アポトソームはApaf-1にシトクロム *c* が結合することによって活性化されるが、インフラマソームはさまざまな感染による細胞内変化に応じて活性化されるほか、細胞障害によって障害細胞から放出されるATPなどの危険信号物質によっても活性化される⁴⁾。マクロファージで活性化されたICEはproIL-1 β やproIL-18の切断による成熟と分泌を促す。また、NALP1インフラマソーム中にはカスパーゼ11（ヒトではカスパーゼ5）が含まれるが、カスパーゼ11はカスパーゼ9と同様にカスパーゼ3を活性化するので、細胞死を誘導する場合もある⁵⁾。多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎で見られる中枢神経系でのIL-1 β 分泌、オリゴデンドロサイト細胞死にはカスパーゼ11が必要であり、インフラマソームを介したカスパーゼの活性化は炎症と細胞死の両方にかかわっていることが示唆されている⁶⁾。

このようにカスパーゼは感染や細胞ストレスといった変化を敏感に感知して、生体に防御機構を発動させるべく活性化される重要な分子であることがわかる。線虫では細胞死がまったくおきない *ced-3* 変異体が得られているが、細胞死を免れた死ぬべき細胞はあいまいな分化を遂げること

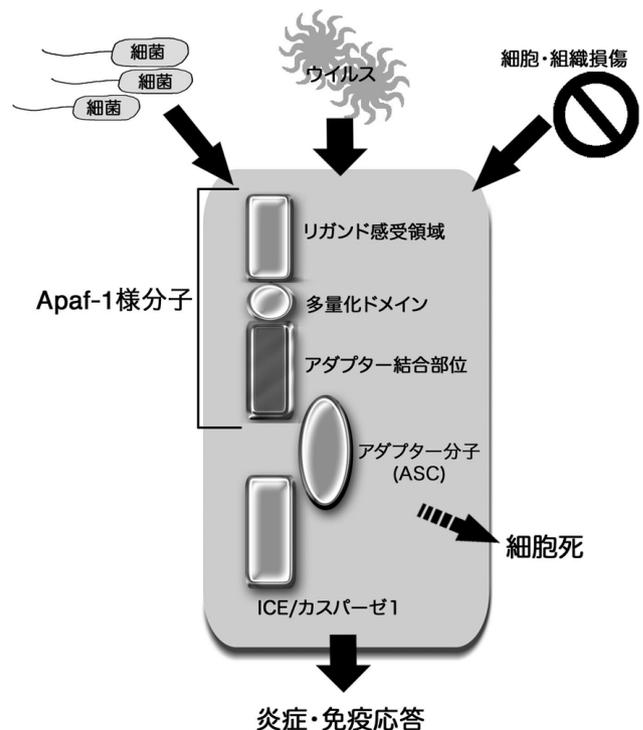


図1 インフラマソームの構成

インフラマソームの活性化刺激は、Apaf-1様分子のリガンド感受領域によって受容され、構造変化、アダプター分子の会合によってICE/カスパーゼ1の多量体化による活性化がおこる。

がある以外に、線虫個体そのものは特に異常もなく発生・成長する。しかし、線虫を用いた感染モデルにおいて *ced-3* の新たな働きが示唆されてきた。*ced-3* 変異体はサルモネラ (*Salmonella typhimurium*) 感染に高感受性を示した⁷⁾。ワクシニア (*Vaccinia*) ウイルスを線虫に感染させるモデルも考案され、細胞死経路とウイルス増殖との関係が調べられた結果、*ced-3* 変異体、あるいはその活性化因子 *ced-4* 変異体ではウイルスの増殖が亢進した⁸⁾。これら感染モデルにおいて *ced-3* が感染にかかわることは明らかだが、その作用点や細胞死とのかかわりなど詳しい作用機構は不明である。

カスパーゼと自然免疫系の関連はショウジョウバエにおいても知られている⁹⁾。ショウジョウバエの自然免疫系は、菌類を認識して活性化される Toll 経路と細菌を認識して活性化される IMD (immune-deficiency) 経路に分けられるが、IMD 経路の活性化にはカスパーゼ 8 類似のタンパク質 Dredd が必要である。このように生体防御機構にカスパーゼが深くかかわることが進化的に保存されていることがわかる。

3. 非細胞死機能に関与するカスパーゼ活性の調節機構

カスパーゼの活性上昇は細胞死を誘導するにもかわらず、非細胞死生理機能に関与すると考えられている。この場合の細胞死が誘導されない理由として、カスパーゼ下流

細胞死シグナルの特異的抑制、カスパーゼの細胞局所的活性化、または細胞死を誘導しない低レベルのカスパーゼ活性、が想定される。

ショウジョウバエ IκB kinase ε (DmIKKε) は、筆者らが行った細胞死因子のスクリーニングの過程で、カスパーゼ依存的細胞死カスケードを正方向に調節する因子として同定された⁹⁾。DmIKKε は IκB キナーゼファミリーに属し、哺乳類の TBK1 (TANK-binding kinase 1) (NAK/T2K) および IKKε (IKKι) のホモログとして分類されている¹⁰⁾。哺乳類において TBK1 および IKKε は、TNFα (tumor necrosis factor α) や LPS (lipopolysaccharide) 刺激の下流での NF-κB 活性化、あるいはウイルス感染時にインターフェロンの発現を制御するキナーゼとして報告されている¹¹⁾。DmIKKε はショウジョウバエ複眼においても培養細胞においても、カスパーゼ活性化を伴う強い細胞死誘導能を示した⁹⁾。DmIKKε はキナーゼドメインをもつタンパク質であるため、基質のリン酸化を介したシグナル伝達によるカスパーゼ活性調節について検討した。種を超えて保存された細胞死抑制因子 IAP は、E3 ユビキチンリガーゼ活性をもち、基質であるカスパーゼを分解して細胞死を抑制するが、細胞死刺激を受けた場合は IAP の自己ユビキチン化と自己分解が亢進され、カスパーゼの活性化と細胞死が誘導される。DmIKKε によるカスパーゼの活性化がショウジョウバエ IAP である DIAP1 のリン酸化および分解促進

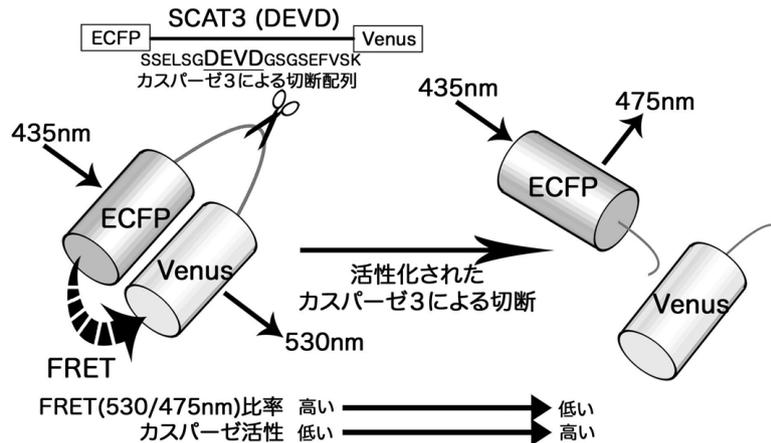


図2 カスパーゼ活性検出プローブ、SCAT3

FRETを利用したカスパーゼ活性検出プローブの概説。SCAT (sensor for activated caspase based on FRET) は、ドナーに ECFP、アクセプターに Venus をもち、その2種類の蛍光タンパク質をつなぐスペーサーにカスパーゼ活性により切断される配列を含んでいる。特に、カスパーゼ3の切断至適配列である DEVD をスペーサーに含む SCAT を SCAT3 として、カスパーゼ3活性の検出に用いている。カスパーゼ活性は、ECFP を励起したときの ECFP の蛍光強度に対する Venus の蛍光強度の比率 (Venus/ECFP) を指標に観察することができる。カスパーゼ活性が低い場合は、FRET によって Venus の蛍光強度が上昇するため、FRET 比率が高くなる。一方、カスパーゼ活性が上昇すると、SCAT3 の切断が誘導されるため、FRET が消失して ECFP の蛍光強度が上がるため、FRET 比率が低くなる。

によるかどうかを検討した結果、DmIKK ϵ はDIAP1と複合体を形成してDIAP1をリン酸化することで、ユビキチンプロテアソーム系を介したDIAP1の分解を促進することが実験的に明らかになった。このIAPに対するリン酸化と分解促進反応は、TBK1の共発現においても同様に観察されたことから⁹⁾、種を超えて保存されたIAP調節メカニズムの一つであると考えられる。

DmIKK ϵ の生理的役割がDIAP1分解を介したカスパーゼ活性化誘導であるとするれば、DmIKK ϵ 変異体において細胞死が減少するなどの影響が推測されたが、DmIKK ϵ 変異体においてもRNAiを用いたノックダウン個体においても、生理的細胞死は抑制されなかった⁹⁾。しかしながら、DmIKK ϵ をノックダウンした細胞において、内在性DIAP1タンパク質の蓄積が観察されたことから、内在性のDmIKK ϵ によるDIAP1レベルの調節が、細胞死以外に関与するカスパーゼ機能を制御する可能性が示唆された。そこで、細胞死を誘導しない低レベルのカスパーゼ活性を検出するために、FRET (fluorescence resonance energy transfer: 蛍光共鳴エネルギー移動) にもとづいてカスパーゼ活性を検出する蛍光タンパク質プローブ (SCAT3: 図2)¹²⁾を用いて、生きた細胞におけるカスパーゼを確認した。その結果、ショウジョウバエ培養細胞および幼虫のさまざまな組織において低レベルのカスパーゼ活性が検出された⁹⁾。

DmIKK ϵ のノックダウンによってこのカスパーゼ活性は抑制されたことから、内在性のDmIKK ϵ がDIAP1を介して細胞死を誘導しない低レベルのカスパーゼ活性を調節しているものと考えられた。

4. ショウジョウバエの発生に関与するカスパーゼの新しい機能

(1) 形態形成

前述したDmIKK ϵ によって調節されるカスパーゼ活性は、細胞の形態形成にも関与することが報告された。ショウジョウバエ触角先端に位置する触鬚 (しよくしゅ) は、野生型では美しい樹状形態を示している。DmIKK ϵ をノックダウンすると触鬚の側枝の分岐増加・屈曲が観察され、その表現型はDIAP1のノックダウンによって一部みられなくなった¹³⁾。このことから、DmIKK ϵ の調節するカスパーゼシグナルが触鬚の形態形成に関与していると考えられる¹³⁾ (図3)。

実際に、*hid*変異体 (カスパーゼシグナルの上位に位置する*hid*の機能欠失変異: カスパーゼ活性の抑制) では、触鬚の側枝の増加が観察され、一方DIAP1の変異体 (カスパーゼ活性の上昇) では、側枝の減少・短縮が観察されることから、触鬚の形態形成におけるカスパーゼ活性の寄与が予測される。アクチンフィラメントの形状やアクチン

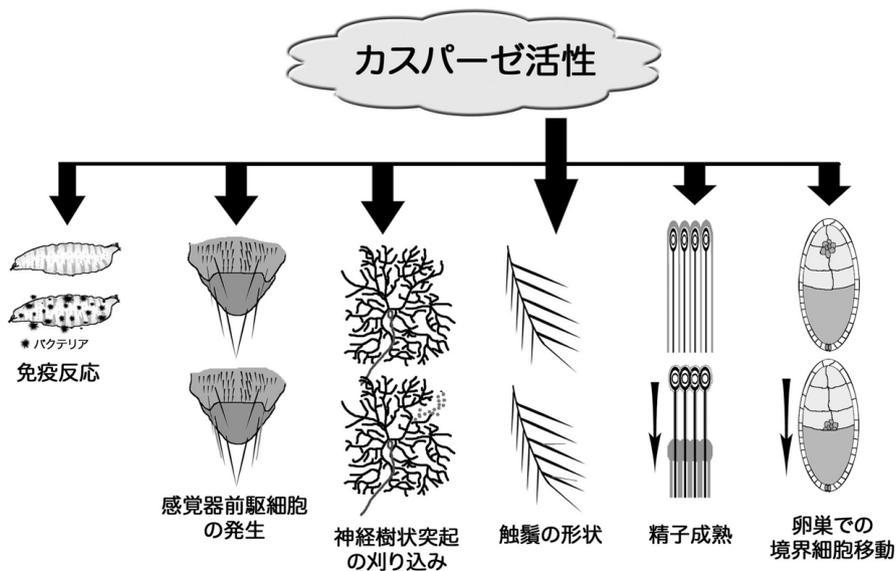


図3 ショウジョウバエで報告されたカスパーゼの新たな生理機能

神経樹状突起の刈り込み、および精子成熟には、細胞局所的なカスパーゼ活性が関与していると報告されている。免疫反応、感覚器前駆細胞の発生、触鬚の形状、卵巣での境界細胞移動に関しては本文中に記載。

フィラメント同士の束形成に必要なシグナルの変異体では、触鬚の形態に異常がみとめられることから、触鬚の形態形成にはアクチン細胞骨格系の再編成が必要であると考えられている。これらの結果を考察すると、カスパーゼシグナルによるアクチン骨格制御が示唆される。

(2) 細胞移動

ショウジョウバエでは、卵胞細胞に由来する“境界細胞”のダイナミックな移動が卵形成時の卵成熟に重要である。アクチンの重合を促進する低分子量Gタンパク質Racのドミナントネガティブを境界細胞に発現させると、この細胞運動が阻害されて移動が途中停止してしまうが、DIAP1を発現させることでその表現型はみられなくなった¹⁴⁾。この効果は、ドミナントネガティブ型Dronc(ショウジョウバエカスパーゼ9ホモログ)の共発現でも観察されたことから、カスパーゼ活性が細胞移動に関与することが示唆されている¹⁴⁾(図3)。加えて、DmIKKεを卵胞細胞に発現させることによって、細胞は死なずに移動が抑制された¹³⁾。卵胞細胞の移動においても、DmIKKεの発現によって制御されるカスパーゼ活性がアクチンの脱重合を誘導し、細胞移動を抑制していると考えられる。

(3) 細胞の運命決定

カスパーゼ活性の細胞死以外の生理機能として、感覚器前駆細胞の数の調節が挙げられる。ショウジョウバエ成虫の中胸小楯板に位置する剛毛の数は左右あわせて4本であるが、カスパーゼ活性の低下を示す変異体や遺伝子発現系統では、5本または6本に変化する。この剛毛はわれわれ哺乳類の体毛とは違い、周辺環境からの刺激を物理的または化学的に感知するための外感覚器(機械受容器)として知られている。発生過程において、感覚器前駆細胞(SOP)とよばれる1個の細胞は、3回の細胞分裂を経て最終的に5種類の細胞(シャフト・ソケット・神経・グリア・シース)に分化する。剛毛の数は、数十個の神経前駆細胞で構成されるクラスターから“手を挙げる”SOPの数を制限することで決まると考えられており、クラスター内におけるカスパーゼ活性の存在と生理機能が予測されていた。筆者らは、SCAT3を用いてクラスター内の細胞に低レベルのカスパーゼ活性が存在することを示し、また、クラスター内にTUNEL陽性細胞(死細胞)が観察されないことを示した¹⁵⁾。加えてSOP増加の表現型は、生理的細胞死を抑制しないDmIKKεのノックダウン個体においても同様に観察されたことなどから、SOPの数の調節には細胞死以外のカスパーゼ機能が関与すると考えられた⁹⁾(図3)。

カスパーゼが細胞死以外の生理機能を伝達するために

は、その生理機能に必要なシグナル分子を基質として分解している可能性がある。そこで筆者らはカスパーゼ新規基質の同定のために、Droncドミナントネガティブ型を発現させて剛毛増加の表現型を構築し、その表現型を促進または抑圧するような染色体領域の探索(ドミナントモディファイアースクリーニング)を行った¹⁵⁾。その結果、哺乳類GSK3βのホモログであるショウジョウバエShaggyのアイソフォーム(sgg46)を基質候補として同定した¹⁵⁾。Shaggyを介するWinglessシグナルは、SOPの発生を制限して上皮系の細胞へと分化を誘導することから、低レベルのカスパーゼ活性はSgg46の切断と活性化を介して、クラスター内に存在する抑制シグナルのみだれを調整する機能を担っていると考察する。

5. おわりに

ここではカスパーゼの細胞死以外の生理機能について、一部概説した。ここで述べた以外にも、カスパーゼの新機能について多くの報告がなされている²⁾。しかしながらカスパーゼ活性から生理機能が発揮されるまでの段階はいまだ不明な点が多く、興味深い。今後、カスパーゼの関与する生理機能がその標的とする基質も含めて解明されることを期待したい。

- 1) Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. (1986) *Cell*, 44, 817-829.
- 2) Kuranaga, E. & Miura, M. (2007) *Trends in Cell Biol.*, 17, 135-144.
- 3) Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweg, E.A., & Yuan, J. (1993) *Cell*, 75, 653-660.
- 4) Mariathasan, S. & Monack, D.M. (2007) *Nature Rev. Immunol.*, 7, 31-40.
- 5) Kang, S.J., Wang, S., Hara, H., Peterson, E.P., Namura, S., Amin-Hanjani, S., Huang, Z., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Thornberry, N.A., Moskowitz, M.A., Yuan, J. (2000) *J. Cell Biol.*, 149, 613-653.
- 6) Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H., & Miura, M. (2001) *J. Exp. Med.*, 193, 111-122.
- 7) Alallay, A. & Ausubel, F.M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 2735-2739.
- 8) Liu, W.H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 4174-4179.
- 9) Kuranaga, E., Kanuka, H., Tonoki, A., Takemoto, K., Tomioka, T., Kobayashi, M., Hayashi, S., & Miura, M. (2006) *Cell*, 125, 583-596.
- 10) Wasserman, S. (2000) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10, 497-502.
- 11) Kawai, T. & Akira, S. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 131-137.
- 12) Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., & Miura, M. (2003) *J. Cell Biol.*, 160, 235-243.
- 13) Oshima, K., Takeda, M., Kuranaga, E., Ueda, R., Aigaki, T., Miura, M., & Hayashi, S. (2006) *Curr. Biol.*, 16, 1531-1537.

- 14) Geisbrecht, E.R. & Montell, D.J. (2004) *Cell*, 118, 111-125.
 15) Kanuka, H., Kuranaga, E., Takemoto, K., Hiratou, T., Okano, H., & Miura, M. (2005) *EMBO J.*, 24, 3796-3806.

倉永 英里奈, 三浦 正幸
 (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室)

Non-classical caspase functions

Erina Kuranaga and Masayuki Miura (Department of Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

軟骨アグリカンとコンドロイチン硫酸合成機構

1. はじめに

軟骨は、成人・成獣においては関節、鼻部、耳介等に局在し主として個体の運動機能を助ける一方、胎生期においては殆どの骨の原基として機能し骨格形成に重要な役割を果たしている。軟骨組織には血管と神経支配がなく、細胞成分としては軟骨細胞のみであり、その細胞外マトリックスは軟骨特有の分子群によって構成されている。軟骨の物理的特性はその特殊なマトリックスにあり、強力な保水作用と弾力性は特にヒアルロン酸とアグリカンによるものといつてよい。アグリカンの最大の特徴は大量のコンドロイチン硫酸 (CS) を含有する点であり、アグリカン以外の分子は、この特徴を持たない。軟骨組織の同定に CS の存在を示すアルシヤンプルー等の染色法が用いられ、軟骨細胞の決定的指標としてアグリカンの発現が採用されているのはこのためである。変形性関節症等の軟骨破壊性疾患においてはアグリカンの分解が決定的過程と考えられ、アグリカナーゼの生体内機能に関する研究が行われている。また、軟骨組織再生・組織工学分野ではアグリカンやヒアルロン酸と類似の物理的特性を持つ素材の開発やアグリカンを発現する軟骨細胞への分化機構の解明に向けた研究が行われている。アグリカンの分解機構、軟骨の再生医療・組織工学に関しては他稿に譲ることとし、本稿ではアグリカンに焦点を絞り、アグリカンの機能本体である CS の合成機構に関して最近我々が得た研究成果を含めて解説する。

2. プロテオグリカン会合体¹⁾

硝子軟骨の組成は水分が約 80%、コラーゲンが 12%、プロテオグリカンとヒアルロン酸が 2%、その他が約 6% である。乾燥重量で比較した総タンパク質における割合は II 型コラーゲンが約 60%、アグリカンが約 35% とされている。

軟骨マトリックスは II, IX, XI 型等軟骨特有のコラーゲンから成る線維成分とその間隙を埋めるヒアルロン酸、アグリカン等のプロテオグリカン群およびその他の糖タンパク質から構成されている。前者の線維成分が組織の基本骨格を構築して剛性を担う一方、後者は線維間に沈着して軟骨に独特の硝子様形態と弾力性を与えている。後者の主成分はアグリカンとヒアルロン酸で、これらの分子はリンクタンパク質 (link protein, LP) とともにプロテオグリカン会合体という一定の構造を形成して組織に沈着している。ヒアルロン酸 1 分子当たり 100 以上のアグリカンと LP が特異的に結合しており、会合体は 10^8 - 10^9 Da に及ぶ (図 1 A)。

3. アグリカンの球状ドメイン²⁾

アグリカンのコアタンパク質は G1, G2, G3 と呼ばれる三つの球状ドメインと二つのグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) 結合ドメインからなる。N 末端側の G1 と C 末端側の G3 ドメインが各々、他のマトリックス分子と特異的に結合することによってアグリカンは組織に安定に沈着し、中央のドメインに共有結合した GAG 鎖が局所で機能を発揮すると考えてよい。

N 末端側の G1 ドメインはヒアルロン酸および LP と特異的に結合する。これら 3 分子の特異的結合がアグリカン会合体の安定な沈着に必須である。LP は G1 ドメインと相同な分子で、LP と G1 ドメインは各々 A, B, B' の三つのサブドメインより成る (図 1B)。A サブドメインは Ig-フォールドの構造を取り、B および B' サブドメインは各々リンクモジュールという構造を取っている³⁾。リンクモジュールはヒアルロン酸と特異的に結合するモジュールとして知られ TSG6 や CD44 にも存在するが、LP と G1 ドメインにおいてはリンクモジュールが二つ隣り合わせに並ぶ点の特徴である。LP とアグリカン G1 においてはヒアルロン酸との結合の最小単位は B-B' であり、B あるいは B' 単独のリンクモジュールには結合能がない⁴⁾。A サブドメインは B-B' とヒアルロン酸との結合を補強する。アグリカンの G1 と LP とは A サブドメイン同士で結合する。