



Death effector domain を有する分子 DEDD による細胞周期と細胞サイズの調節

1. はじめに

death effector domain (DED) はアポトーシスに働くカスパーゼ-8, -10 やカスパーゼとデスレセプターである Fas を繋ぐアダプター分子間をつなぐ Fas-associated death domain (FADD) などに含まれるドメインである。これらのタンパク質はアポトーシス誘導時にお互いの DED ドメイン同士で結合して death-inducing signaling complex (DISC) を形成し、アポトーシスの実行に関わる¹⁾。DEDD (death effector domain containing DNA binding) も DED タンパク質ファミリーの新たなメンバーとして同定され、アポトーシスに関する研究がなされてきた²⁻⁴⁾。しかし、最近になり DED タンパク質ファミリーは、アポトーシス進行過程以外に、細胞増殖の調節に直接関わっていることが明らかになり、多機能な分子として注目を集めている。

本稿では、近年我々が DEDD^{-/-}マウスを用いて明らか

とした DEDD の新しい機能について概説したい。

2. DEDD の細胞周期への関与

DEDD は DED タンパク質ファミリーの新メンバーとして 1998 年に発見された²⁾。DEDD を細胞に過剰発現させると核小体に局在し、弱いながらもカスパーゼ-6 を介したアポトーシスを誘導する^{2,3)}。またカスパーゼ-8 と-10 に結合することも知られている⁴⁾。しかしながら、DEDD が生体内で実際にどのような生理機能を有するのか不明のままであった。

そこで我々は DEDD^{-/-}マウスを作製し、まずはじめにアポトーシスにどのような影響が見られるのかを調べた^{5,6)}。その結果 DEDD の過剰発現による実験結果と反し、DEDD^{-/-}、DEDD^{+/+}マウスそれぞれの胎児から作製した 3T3・繊維芽 (3T3・MEF) 細胞において、CD95 や腫瘍壊死因子 α (TNF α) などによるアポトーシス誘導に差は見られなかった。また生体内でアポトーシスが盛んに起こる場である胸腺においても胸腺細胞の数は変わらずアポトーシスに変化はなかった。以上のように DEDD^{-/-}マウスは、野生型と比較して、アポトーシス誘導に変化は見られず、さらにまた、成長を促すホルモンの分泌量や体の各臓器の細胞数は正常であるものの、体のサイズが野生型に比べて平均して 20-25% 小さいことが明らかとなった⁵⁾ (図 1)。さらに詳細な解析を行うと、DEDD^{-/-} 3T3・MEF 細胞は大きさが小さく (図 1)、また BrdU 取り込み実験により細胞周期の G₂/M 期に短縮が見られることが明らかとなった⁵⁾ (表 1)。DED タンパク質である FADD も細胞周期進行制御に関与していることがすでに報告されているが⁷⁾、DEDD にも同様の機能があることが予想された。

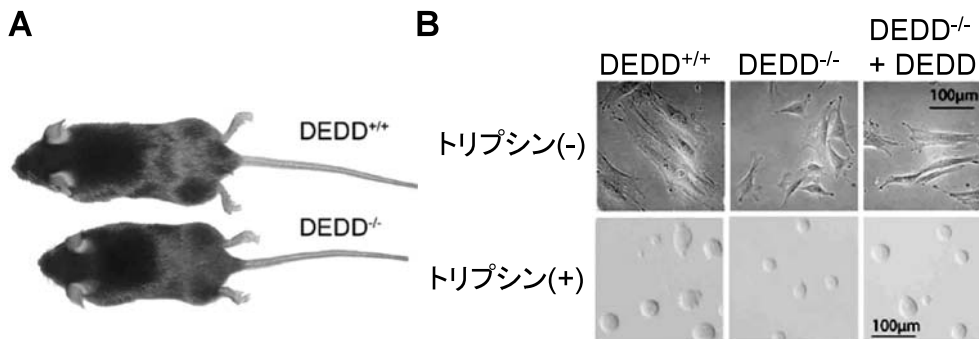


図 1 DEDD 欠損による体と細胞サイズの減少

A) 6 週齢の DEDD^{+/+}マウス (上) と DEDD^{-/-}マウス (下)。B) 左から DEDD^{+/+}3T3・MEF 細胞、DEDD^{-/-}3T3・MEF 細胞、DEDD^{-/-}3T3・MEF 細胞に DEDD を過剰発現させた細胞。上段はトリプシン処理なし、下段はトリプシン処理した細胞である。

表1 DEDD^{+/+}3T3・MEF細胞とDEDD^{-/-}3T3・MEF細胞の細胞周期の各期の長さ

細胞種	DEDD ^{+/+} , hr	DEDD ^{-/-} , hr	KO/WT ×100, %
倍加時間	45.8±6.5	37.5±2.5	81.0
G ₁ 期	29.2±4.6	25.1±3.2	85.9
S期	9.1±1.9	8.6±1.1	94.5
G ₂ /M期	7.5±0.5	3.8±0.3	50.7
M期	5.9±0.4	2.9±0.3	49.2
G ₂ 期	1.6±0.4	0.9±0.3	56.3

データは9回の独立した実験の平均値±標準誤差である。

DEDD^{-/-}マウスにおいてアポトーシスに変化が見られないことはDEDDの過剰発現実験などによる結果と相反するものである。マウスにおいてはDEDDのホモログとして48.5%のアミノ酸配列の一致を示すDEDD2の存在が知られている⁸⁾。DEDD2はDEDD同様にカスパーゼ-8と-10に結合することが明らかとなっているので⁹⁾、DEDD^{-/-}マウスにおいてアポトーシスに変化が見られない理由としてはDEDD2がDEDDのアポトーシスに関する機能を相補している可能性が示唆され、今後の研究が待たれる。

3. 細胞周期でのDEDDの制御機構

細胞周期の進行と細胞の大きさは、協調的に厳密な制御を受けている⁹⁾。細胞周期のG₁/S期ではphosphoinositide 3-kinase (PI3K)-mammalian target of rapamycin (mTOR)経路の活性が、その下流に存在するribosomal protein S6 kinase-1 (S6K1)やeukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1)を介して細胞の大きさを規定している^{10,11)}。G₁/S期だけでなくG₂期も細胞の大きさの制御に重要である。G₂/M期に働くcyclin-dependent kinase1 (Cdk1)の活性を制御するWee1キナーゼをコードする遺伝子に変異のある出芽酵母の変異体(wee変異体; weeは「小さい」の意)では、G₂期が短縮し必要量のタンパク質が合成されず小さな細胞が生じる¹²⁾。また、Cdk1活性を調節するもう一つの分子であるCDC25に欠損が生じると、G₂期の遅延が生じ過剰量のタンパク質が合成され、結果として細胞は大きくなる¹³⁾。つまり細胞の大きさはG₁/S期とG₂期の両方で制御されている。

前項で述べたとおりDEDD^{-/-}3T3・MEF細胞ではG₂/M期の長さや細胞の大きさに異常が見られたことから、DEDDもWee1やCDC25同様、Cdk1の活性制御に関与しているのではないかと考えられた。そこで、DEDDとCdk1/

サイクリンB複合体との結合を検討した。その結果、DEDDは*in vitro*, *in vivo*の両実験において、サイクリンBを介してCdk1/サイクリンB複合体と結合することが分かった。また、この結合はM期特異的に見られる現象であり、このことはDEDDのタンパク質レベルの発現がM期に最大となることと一致するものであった^{5,6)}。次に、DEDDのCdk1のキナーゼ活性への影響を解析した。その結果*in vitro*キナーゼアッセイにおいてDEDDは用量依存的にCdk1キナーゼ活性を抑制した。また、DEDD^{-/-}3T3・MEF細胞ではDEDD^{+/+}3T3・MEF細胞に比べてCdk1キナーゼ活性が高いことが明らかとなった。このことより、DEDDはM期においてCdk1/サイクリンB複合体にサイクリンBを介して結合し、そのキナーゼ活性を抑制していると考えられた^{5,6)}。

Cdk1のキナーゼ活性の制御は多段階で行われている。まずWee1キナーゼ(ヒトではMyt1)がCdk1のThr14とTyr15をリン酸化し、ついでNim1キナーゼ(ヒトではCAK)によりThr161がリン酸化され不活性な待機状態となる。細胞周期が進行しM期に進入する準備が整うと、CDC25がThr14とTyr15のリン酸基を脱リン酸化し、Cdk1を活性化する。これらの活性化ステップは細胞質で起こり、一旦活性化したCdk1/サイクリンB複合体は核内へ移動してラミンに代表される色々な基質をリン酸化し、M期を開始させる¹⁴⁾。DEDDはThr14とTyr15のリン酸化状態には影響しなかった。また、DEDDは核に局在していることから、DEDDによるCdk1/サイクリンB複合体のキナーゼ活性抑制は、CDC25により脱リン酸化を受けたCdk1/サイクリンB複合体が核内へ移動した後に起こる全く新規の制御機構と考えられた^{5,6)}。さらに、DEDDはヒト、マウス、ラット、カエル、ゼブラフィッシュなどの高等脊椎動物においてのみ存在するので、この新たな制御機構もそれらの生物特異的に起こると考えられる。このDEDDによるCdk1/サイクリンB複合体のキナーゼ活性の抑制がM期の進行を遅らせることによって、正常な大きさの細胞が形成されると考えられる(図2)。

しかし、G₂/M期のわずか2~3時間の延長が生物全体の体のサイズにまで影響を与えるかは議論を呼ぶところである。そこでもう一つの細胞サイズ制御機構であるPI3K-mTOR経路へのDEDDの影響を検討した。まず、PI3K-mTOR経路の構成因子とDEDDとの結合を調べたところDEDDはS6K1と特異的に結合し、さらにそのキナーゼ活性を促進した(投稿中)。S6K1はmTORの下流に存在し、その活性化はタンパク質合成装置であるリボソーム量、ひ

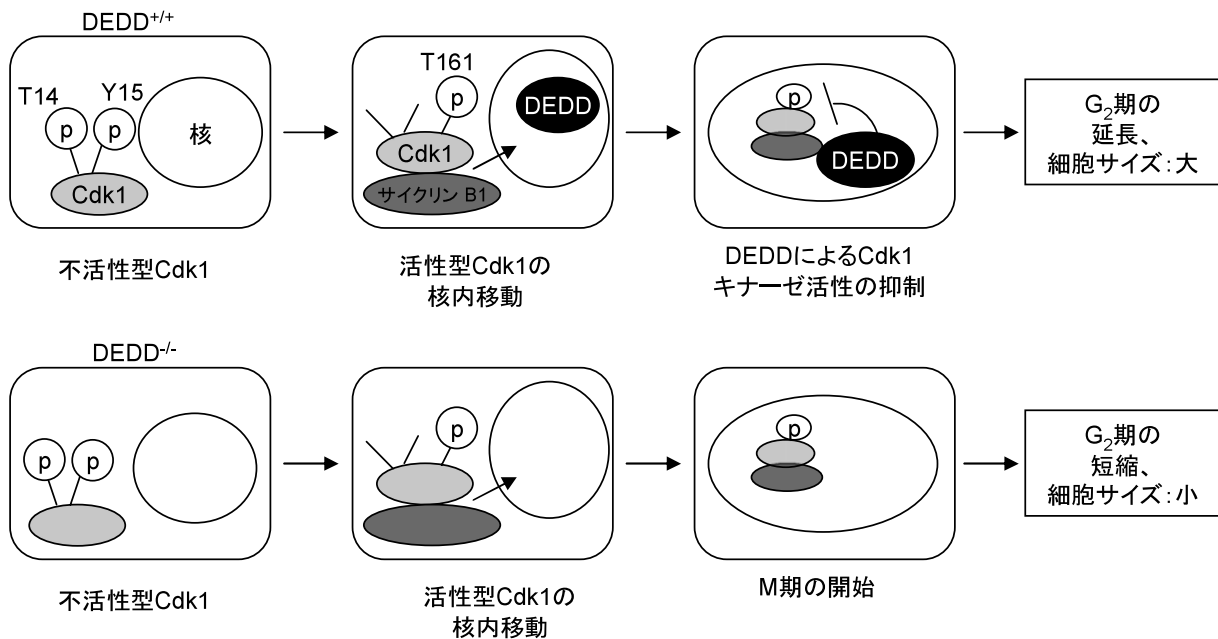


図2 DEDDによるCdk1/サイクリンB1複合体の新たな制御機構

Cdk1のThr14とTyr15がリン酸化された状態ではCdk1/サイクリンB1複合体は不活性状態で細胞質に留まっている。Thr14とTyr15が脱リン酸化され、Thr161がリン酸化されるとCdk1/サイクリンB1複合体は活性化状態となり、核内へ移動する。核内ではDEDDがサイクリンB1を介してCdk1/サイクリンB1複合体に結合し、Cdk1のキナーゼ活性を抑制する。その結果、G₂期が延長して細胞はその大きさを増大させることができる。それに対してDEDD^{-/-}細胞ではDEDDによるG₂期の延長がないため細胞は十分に大きくなることができない。

いては細胞内のタンパク質含有量の増大を招き、結果として細胞サイズの増加につながる¹⁵⁾。したがって、DEDDはCdk1/サイクリンB複合体だけではなくS6K1の活性も制御することによって細胞と体のサイズの制御を行っていると考えられた。

4. DEDDと疾患の関連：II型糖尿病とがん

前項で挙げたS6K1についてもノックアウトマウスの作製が報告されており、DEDD^{-/-}マウス同様に、S6K1^{-/-}マウスは体が小さくなることが知られている¹⁶⁾。S6K1^{-/-}マウスにおける体の大きさの減少は幼少期までの間に見られ、成年期になるに従い大きさは野生型に近づく。これはS6K1のホモログであるS6K2がS6K1の働きを相補しているためと考えられている。しかし、S6K1^{-/-}マウスでは成体になっても、膵臓のランゲルハンス島においてインスリンの分泌を担うβ細胞のみ、その数と大きさが減少したままで、その結果としてS6K1^{-/-}マウスは耐糖能異常、つまりII型糖尿病の様相を呈することが明らかとなっている¹⁷⁾。幼少期にインスリン、insulin-like growth factor (IGF)などのβ細胞の増殖に必要な因子が不足すると、

成体になってそれらの因子の分泌量が十分になったとしても、β細胞の数や大きさは正常に戻らないという報告がなされているので¹⁸⁾、S6K1^{-/-}マウスにおける幼少期のインスリン等の分泌量不足が成体でのβ細胞特異的な数と大きさの減少の原因と考えられている。そこでDEDD^{-/-}マウスについてもβ細胞の解析を行ったところ、S6K1^{-/-}マウス同様に大きさの減少が見られた。糖負荷実験でも耐糖能異常を示し、またインスリンの分泌量と筋組織における糖取り込みの減少も観察された(投稿中)。以上DEDDがII型糖尿病に関連することが証明され、メタボリック症候群の治療ターゲットとなることが今後期待される。また、DEDDは細胞周期の制御に関わることからがんの発生の関連も考えられ、今後の研究に興味を持たれる。

5. おわりに

ここではDEDDのアポトーシス以外の生理機能および疾患との関連について概説した。DEDDはCdk1/サイクリンB複合体とS6K1の活性を制御することにより細胞の大きさを制御し、さらにII型糖尿病とも関連することが明らかとなった。DEDタンパク質ファミリーにおいてアポ

トーチス以外の機能が解析されている分子としてFADDが知られているが、その他の分子についてはまだ不明な点が多く残されている。DEDDホモログであるDEDD2を含めた他のDEDタンパク質のアポトーシス以外の生理機能の解析の展開が待たれるところである。

- 1) Barnhart, B.C., Lee, J.C., Alappat, E.C., & Peter, M.E. (2003) *Oncogene*, **22**, 8634-8644.
- 2) Stegh, A.H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhänsel, C., Hofmann, T.G., Grummt, I., Krammer, P.H., & Peter, M.E. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5974-5986.
- 3) Schickling, O., Stegh, A.H., Byrd, J., & Peter, M.E. (2001) *Cell Death Differ.*, **8**, 1157-1168.
- 4) Alcivar, A., Hu, S., Tang, J., & Yang, X. (2003) *Oncogene*, **22**, 291-297.
- 5) Arai, S., Miyake, K., Voit, R., Nemoto, S., Wakeland, E.K., Grummt, I., & Miyazaki, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 2289-2294.
- 6) Miyazaki, T. & Arai, S. (2007) *Cell Cycle*, **6**, 1419-1425.
- 7) Hueber, A.O., Zörnig, M., Bernard, A.M., Chautan, M., & Evan, G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 10453-10462.
- 8) Roth, W., Stenner-Liewen, F., Pawlowski, K., Godzik, A., & Reed, J.C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 7501-7508.
- 9) Montagne, J. (2000) *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, **4**, 195-202.
- 10) Schmelzle, T. & Hall, M.N. (2000) *Cell*, **103**, 253-262.
- 11) Fingar, D.C., Richardson, C.J., Tee, A.R., Cheatham, L., Tsou, C., & Blenis, J. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 200-216.
- 12) Wu, L. & Russell, P. (1993) *Nature*, **363**, 738-741.
- 13) Rupes, I. (2002) *Trends Genet.*, **18**, 479-485.
- 14) Morgan, D.O. (1995) *Nature*, **374**, 131-134.
- 15) Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., & Harlow, E. (2002) *Blenis. J.*, **16**, 1472-1487.
- 16) Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., & Kozma, S.C. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6649-6659.
- 17) Pende, M., Kozma, S.C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Le Marchand-Brustel, Y., Klumperman, J., Thorens, B., & Thomas, G. (2000) *Nature*, **408**, 994-997.
- 18) Swenn, I., Borg, L.A., Crace, C.J., & Schnell Landstrom, A. (1992) *Diabetologia*, **35**, 939-945.

倉部 誠也, 新井 郷子, 宮崎 徹

(東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター
分子病態医学)

The cell cycle and cell sizing regulation via death effector domain

Nobuya Kurabe, Satoko Arai, and Toru Miyazaki (Division of Molecular Biomedicine for Pathogenesis Center for Disease Biology and Integrative Medicine (CDBIM), Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

繭の色はどのようにして彩られるのか

1. はじめに

カイコの研究をしたことがない方でも、カイコの繭の実物や写真を一度くらいは見たことがあるだろう。その繭の色は何色だっただろうか。日本ではほとんどの方が白繭を思い浮かべることと思う。しかし、実はカイコの繭色は系統によって白色、黄色、紅色、肉色、筐色、緑色と様々に異なる(図1A)。現在の日本の養蚕業では圧倒的に白繭種が用いられているが、例えば東南アジアの養蚕業では黄繭種が主である。では、何が繭に色を付けているのだろうか？なぜ繭色の違いが生じるのだろうか？最近、この問への答えを導く遺伝子のひとつが明らかとなった。これまでの繭色研究の知見と共に紹介したい。

2. 繭色は餌の桑葉が含む色素に由来する

カイコの繭色を生み出している色素成分は、主に脂溶性のカロテノイド系色素(黄・赤)¹⁾と水溶性のフラボノイド系色素(緑)^{2,3)}である(図1B)。これらの色素はいずれもカイコの幼虫の食餌の桑葉に由来する。繭に色が付くためには、色素はまず腸管細胞に吸収され、体液を介し、絹糸腺という器官に輸送され、絹糸腺腔にある液状絹糸に分泌されなくてはならない(図1C)。つまり、色素が繭にたどり着くまでの間に、腸管細胞、体液、絹糸腺細胞という三つの障壁が存在する。同じ桑葉を食べても系統によって繭色の違いが生まれることから、色素の輸送は単純拡散によるものではなく、特定の遺伝子が積極的に関与するものであることは明らかである。では、その遺伝子はどのようなものなのだろう。

3. 繭色をつかさどる遺伝子座

メンデルの遺伝法則が再発見され近代遺伝学が始まったのは1900年であるが、1906年、外山亀太郎はタイ白繭種とタイ黄繭種を交雑するとF₁は黄繭のみを、F₂は黄繭と白繭とを3:1の比で生じることを示した⁴⁾。これはメンデル則が動物においても成り立つことを示した初めての論文報告にもなっている。その後、多くの品種を用いて交雑実験や色素分析等が行われ、繭色をつかさどる遺伝子座群の同定と、その遺伝子座の作用機序の解析がなされてき