



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis                                                                |
| Author(s)    | 坂平, 英樹                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41781">https://hdl.handle.net/11094/41781</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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 1 5 2 1 4 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<br>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<br>(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)<br>教 授 長 田 重 一<br><br>(副査)<br>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200ℓ（ $4 \times 10^{11}$  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 のアフィニティーク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考えられる。