

Title	アポトーシス実行因子カスパーゼの分子機序と生体に おける生理的役割の解明 - 可視化技術の確立と新規 モデル動物の作製-
Author(s)	小南, 勝也
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69672
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

アポトーシス実行因子カスパーゼの分子機序と 生体における生理的役割の解明

- 可視化技術の確立と新規モデル動物の作製-

2017年

小南 勝也

内容

緒論		
本論		
第一章	外因性アポトーシスシグナル伝達における	
	caspase-8 の活性化機構の解明	
第二章	数理モデルによる caspase-8, caspase-3 の活性化量の検討	
第三章	発生時のアポトーシス解析を目的とした	
	<i>Xenopus</i> Bid および <i>Xenopus</i> caspase-106 の単離、	
	ならびに SCAT3 発現トランスジェニックカエルの作製	
総括		
結論		
謝辞		
引用文献		

<u>緒論</u>

細胞死の一種であるアポトーシスは、器官形成や臓器形成といった生物の発生過程に、 また成体においては生体防御、恒常性の維持、さらに老化などに関与する。アポトーシス の異常により、成体では免疫不全、自己免疫疾患、がんなどの重篤な疾患を引き起こす。 このようにアポトーシスは生物において必須の生命現象であり、厳密な制御機構が存在す る。内因性のサイトカインの他、外因性の細菌やウイルス、放射線などの種々の因子によ りアポトーシスが誘導されると、アポトーシス実行因子であるシステインプロテアーゼの "カスパーゼ (caspase)"にシグナルが伝わる。この活性化カスパーゼによる段階的なカス パーゼの活性化を経て細胞内のタンパク質が切断され、細胞死に至る 1-3。

哺乳類の細胞では、2種類のアポトーシスのシグナル伝達経路が知られている (Fig. 1) 4。 TNFaやFas リガンドなどのサイトカインがその受容体 (デスレセプター) と結合して起こ る"外因性の経路"と、DNA 損傷などによりミトコンドリアからシトクロム C が流出して 起こる"内因性の経路"である。どちらの経路においても、複数のカスパーゼが実行因子 として働いている。ヒトでは 12 種類のカスパーゼが同定されており、アポトーシスあるい は炎症反応に関与している。そのうちアポトーシスに関わるカスパーゼは、機能の違いか らイニシエーターカスパーゼとエフェクターカスパーゼに分類される。イニシエーターカ スパーゼとして、caspase-2、caspase-8、caspase-9、そして caspase-10 が同定され、エフ ェクターカスパーゼとして、caspase-3、caspase-6、そして caspase-10 が同定され、エフ エクターカスパーゼとして、caspase-3、caspase-6、そして caspase-7 が見つかっている⁵。 カスパーゼは、正常な細胞では非活性型 (pro-caspase) として存在するが、一度アポトー シスのシグナルが細胞に入るとイニシエーターカスパーゼが自己活性化し、さらにエフェ クターカスパーゼを切断・活性化する。活性化されたエフェクターカスパーゼによって 400 種類を超える基質となるタンパク質が切断されて、その結果細胞死が起こる。このように、 アポトーシス時にはイニシエーターとエフェクターの複数のカスパーゼが連動して活性化 する"カスパーゼカスケード"が存在する。



Figure 1 Apototic signaling pathway

デスレセプターの一種、Fas を介する外因性のアポトーシス誘導シグナルでは、細胞の 種類に依存してシグナル伝達経路が2つに分岐する6%。一つは、イニシエーターカスパー ゼの caspase-8 が直接エフェクターカスパーゼの caspase-3 を活性化する Type 1 と呼ばれ る経路であり、他方は caspase-8 が Bcl-2 ファミリー分子の Bid を切断することで、内因性 の経路が活性化する Type 2 の経路である %。リンパ球やリンパ球系の培養細胞では Type 1 の経路が使われ、肝細胞や HeLa 細胞株では Type 2 の経路が活性化すると云われている。 デスレセプターの発現量が少ない Type 2 の細胞では、アポトーシスの初期シグナルが微弱 であるために、シグナルを増幅するために内因性の経路が活性化すると考えられている。 薬剤に対する感受性が Type 1 と Type 2 の細胞では異なるという報告もある¹⁰。また、カ スパーゼカスケードを通して活性化した caspase-3 と caspase-6 によって、caspase-8 が切 断され活性化するポジティブ-フィードバックの存在を主張する報告^{11,12}と、それに対し否 定的な見解を示す報告¹³があり、説が二分している。



Figure 2 Extrinsic Type 1 / Type 2 pathway

カスパーゼの生理的役割を理解するために、遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス) が作製され、その表現型が調べられた。興味深いことに、カスパーゼを欠くことで胚発生 にも影響が見られる。デスレセプターの細胞内領域で DISC という複合体を形成する分子 Caspase-8、アダプター分子 FADD、c-FLIP のノックアウトマウスは、胚発生の 10 日目か ら 11 日目頃に心臓の出血により死に至る¹⁴⁻¹⁷。また caspase-9、アダプター分子 Apaf-1、 caspase-3 ノックアウトマウスは、中枢神経系異常のため周産期ないしは生後 1~3 週間に死 亡する¹⁸⁻²⁰。アポトーシスの定義は、カスパーゼが関わる細胞死である。カスパーゼの関 与は特定されていないものの、発生時には様々な臓器や器官あるいは発生段階でアポトー シスが観察されている²¹⁻²³。

両生類では、変態時期に見られる尾の退行は細胞死を伴うことは以前より知られている 24-26。加えて、アフリカツメガエル(Xenopus laevis)の初期発生の過程においてアポトー シスが起きることも報告されている²⁷⁻²⁹。このような細胞死やアポトーシスは、哺乳類と 同じくアポトーシス実行因子のカスパーゼや Bcl-2 ファミリー分子が関与している可能性 が考えられる。既にアフリカツメガエルでは、caspase-3 を含む幾つかのカスパーゼが同定 されており^{30,31}、その中で caspase-3 と caspase-9 が変態期の退行している組織においてそ の発現が認められることも報告されている^{32,33}。

本研究によってアポトーシス実行因子であるカスパーゼの分子機序を明らかにし、また 胚発生におけるカスパーゼの生理的役割を理解するために、第一章では、caspase-8の活性 化とその下流のカスケードを 1 細胞で可視化できるシステムを開発し、このシステムを用 いての caspase-8 の活性の詳細を検討した。第二章では、カスパーゼカスケードを人為的に 操作し caspase-8 とその下流の caspase-3 の活性を制御することで、外因性アポトーシス経 路を通るシグナルの流れを明確にした。また、実反応に則した数理モデルを作成し実測デ ータと照合することによって、アポトーシスを実行するために必要な caspase-8 や caspase-3 の活性化量を算定することを試みた。第三章では、アフリカツメガエルから Bid および xCaspase-8 のパラログである xCaspase-108 を単離し、その機能を解析した。また、 caspase-3 のモニター分子 SCAT3 を発現するトランスジェニック (Tg) カエルを作製し、 その有用性について検討した。

本論

第一章 外因性アポトーシスシグナル伝達における caspase-8 の活性化機構の解明

アポトーシスのシグナル伝達に関する研究については、これまでは細胞集団からタンパ ク質を抽出したり特定したりする生化学的な解析が主流であった。この手法は、シグナル の伝播を経時的に追跡することに限界があり、加えて細胞内で起きるシグナルの空間的な 変移を見定めることはできなかった。近年、蛍光タンパク質を使った 1 細胞レベルでの解 析が進み、時系列的あるいは空間的な解析が可能となりつつある。これまでに FRET (Fluorescence resonance energy transfer、蛍光共鳴エネルギー移動)の原理を利用した 様々な蛍光タンパク質からなるモニター分子が作製され、細胞増殖や生体反応などにおけ る分子間の相互作用の理解に貢献している。細胞死の研究分野においても、FRET の原理 を応用したモニター分子が既に幾つも開発されている34。本研究では、2種類の蛍光タンパ ク質を繋ぎ合わせたカスパーゼ活性モニター分子 SCAT、さらに3種類の蛍光タンパク質を 繋ぎ合わせた caspase-8 + caspase-3 活性モニター分子 CYR83 を作製し、アポトーシスの 際に活性化するカスパーゼの挙動を 1 細胞のレベルで可視化することを試みた。また、 CYR83 を用いた caspase-8 の活性化とその下流のカスケードを1 細胞でモニターできるシ ステムを開発し、アポトーシスシグナル伝達の過程を時系列的に提示することに取り組ん だ。さらに、caspase-8の再活性化を伴うポジティブフィードバックの存在についても検証 した。

【方法】

遺伝子発現用プラスミドの作製

2 つの蛍光タンパク質が連結したタンパク質の SCAT8 は、seCFP (Cyan Fluorescent Protein の改良体)、IETD 配列を持つリンカー、Venus (Yellow Fluorescent Protein の改良 体) ³⁵ の配置で DNA フラグメントを pcDNA4/HisMax (Invitrogen 社) に導入した。SCAT3 は seCFP、DEVD 配列を持つリンカー、Venus の順で DNA フラグメントを並べ、 pcDNA4/HisMax に導入した ³⁶。CYR83 は、seCFP、Venus、mRFP1 (monomeric red fluorescent protein 1; RFP の改良体) ³⁷ の 3 種類の蛍光タンパク質と 2 つのカスパーゼ認 識配列 IETD、DEVD を持つリンカーを seCFP-IETD リンカー – Venus – DEVD リンカ – mRFP1 の順で pCAGGS³⁸ に導入した。二つのリンカー配列は、 SSSELSG<u>IETD</u>GTSGSEF、SSSELSG<u>DEVD</u>GTSGSEF のアミノ酸配列をそれぞれコード する。2 つの CYR 変異体、CYR83 (IETA) と CYR83 (DEVA) は、CYR83 で用いたリン カーのアミノ酸配列 IET<u>D</u>および DEV<u>D</u>のアスパラギン酸をアラニンに置換したリンカー

を導入した。大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の作製にはSCAT8、SCAT3、seCFP、 Venus、mRFP1 の DNA フラグメントを pRSET (Invitrogen 社) に導入した。無細胞系タ ンパク質合成システムを用いたタンパク質合成のために、カスパーゼ前駆体 (pro-caspase)、 あるいは FK506-binding protein 12 variant (FKBP) と caspase-8 の融合タンパク質であ る FKBP-caspase8 の各 cDNA を pEU に挿入した ³⁹。FKBP-caspase8 cDNA は、 pSH1/HA-Fvls-caspase8を Baylor College of Medicine の J. Wang 博士より供与された。 Caspase-3 のプロテアーゼ活性欠失型の変異体は、PCR 法で caspase-3 のプロテアーゼ活 性中心である QACRG のシステイン残基をセリンに変更し、pEU に挿入した。ヒト ARK5 発現プラスミドは、ARK5 cDNA を pIREShyg2 (BD·Clontech 社) に挿入した。ARK5 の キナーゼ変異体 ARK5(S600A)は、キナーゼドメイン内にある N 末端より 600 番目のセリ ン残基をアラニンに置換し、pIREShyg2に導入した。細胞で強制発現するために、caspase-6 および2つの変異体 caspase-6CS、caspase-6SE は pIREShyg2 に挿入した。Caspase-6CS は活性失活型とするために、プロテアーゼ活性残基である 163 番目のアミノ酸のシステイ ン残基をセリンに置換し、caspase-6SE は恒常的に抑制された状態を作るために、リン酸 化される部位である 257 番目のセリン残基をグルタミン酸に PCR 法を用いて置換した後、 導入した。

細胞培養および遺伝子導入

ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞は Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)に 10% fetal calf serum (FCS)を添加した培地を用いて培養した。HeLa 細胞への 遺伝子導入には LipofectAMINE 2000 (Invitrogen 社)を用いた。ヒト caspase-6 siRNA の 細胞内導入は、TransFectin[™] Lipid Reagent (Bio-Rad Laboratories 社)を用いた。

リアルタイムイメージング

 φ 35mm のガラスボトムディッシュ (旭テクノグラス社)を、1型コラーゲン (高研社) でコーティングし、その上に HeLa 細胞を播種した。翌日遺伝子を導入しさらに 1~2 日間 培養した。この細胞を PBS で一度洗浄後、1 mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂、10% FCS を含 む PBS 溶液に置換した。アポトーシス誘導には、200 ng/mL 抗 Fas 抗体 (CH11、MBL 社) と 5 µg/ml cycloheximide (CHX; Sigmaaldrich 社) を用いた。また、UV 刺激によるアポト ーシス誘導時には、UV linker (FS800, Funakoshi 社) を用いて 200 J/m² 照射した。アポ トーシスを誘導した細胞は、蛍光顕微鏡 (DMIRE2, Leica Mycrosystems 社) 上で加温チャ ンバー (MI-IBC, オリンパス社) 内で 37 °C で保温しながら顕微鏡観察した。

FRET のタイムラプスイメージングは、蛍光顕微鏡、CCD カメラ (CoolSnalHQ, Roper Scientific 社)、フィルターチェンジャー (MAC5000, Ludl Electronic Products 社) および ソフトウェアに MetaFluor / MetaMorph (Universal Imaging 社) を用いた。蛍光を取得す るフィルターは、D425/40x、HQ500/20x、HQ545/30x の 3 種類を励起 (excitation) 用フ

ィルターとして、D480/40m、HQ535/30m、HQ620/60m の3 種類を蛍光取得 (emission)用 フィルターとして使った (全てのフィルターは、Chroma Technology 社より購入)。ダイク ロイックミラーには反射効率 4%のガラスを用いた。SCAT モニター分子を計測する場合、 細胞を 15 秒に一度の間隔で D425/40x のフィルターを通して seCFP を励起し、seCFP か ら発する蛍光を D480/40m で、Venus から発する蛍光を HQ535/30m で取得した。Venus の蛍光強度と seCFP の蛍光強度の比から FRET の変動を求め、さらにその蛍光比を疑似カ ラーで表示した。解析には MetaFluor あるいは MetaMorph を用いた。CYR83 の場合、1 回分の撮影を 4 つのチャンネル (2 つの蛍光タンパク質と 2 つの FRET 蛍光): (1) seCFP を D425/40x と D480/40m のフィルター、(2) Venus を HQ535/30m のフィ ルター、(3) seCFP → Venus の FRET を D425/40x と HQ535/30m のフィルター、(4) Venus → mRFP1 FRET を HQ500/20 と HQ620/60m のフィルター、の4 通りの組み合わせで行 った。

無細胞系タンパク質合成システムを用いたリコンビナントカスパーゼの作製

カスパーゼに関するリコンビナントタンパク質、変異体、融合タンパク質は無細胞系タ ンパク合成システムを用いた³⁹。Caspase-3、caspase-6、FKBP-caspase8、および caspase-3 の変異体のリコンビナントは、pEU ベクターに備わった SP6 プロモーターを用いて遺伝子 から転写産物を作製し、小麦胚芽抽出物(WEPRO-1240, CellFree Sciences 社)を用いて 転写産物からタンパク質に翻訳した。作製したリコンビナントカスパーゼは、SDS-PAGE と各々の抗体を用いたウエスタンブロッティングにより精製度を確認した。

カスパーゼカスケードの in vitro 再構成

In vitro でのカスパーゼカスケード再構成の成否は、SCAT3 あるいは SCAT8 モニター 分子の切断の有無によって判定した。複数のカスパーゼと SCAT3 ないしは SCAT8 を加え て 37 °C、2 時間インキュベートした後、SDS-PAGE 用 sample buffer を添加して酵素反応 を停止し、熱変性せずに SDS-PAGE に供した。電気泳動した SCAT タンパク質は、イメー ジアナライザー (Typhoon 9410, GE Healthcare 社)を用いて直接アクリルアミドゲルを 撮影することで蛍光を取得し、その蛍光パターンを ImageQuant で最終的に画像化した。 アポトーシスを誘導した HeLa 細胞での CYR83 の切断の解析にも同様の手法を用いた。蛍 光タンパク質を励起するレーザーは 457 nm、532 nm、633 nm を用い、蛍光取得には 526SP、 555BP20、そして 610BP30 の 3 種類の放射フィルターを用いた。

<u>イムノブロッティング</u>

In vitro 再構成系で切断されたカスパーゼの検出は、反応液を SDS-PAGE で分離、PVDF 膜に転写後、抗 caspase-3 抗体、抗 caspase-6 抗体、抗 caspase-8 抗体 (Cell Signaling Technology 社)でそれぞれイムノブロッティングし、二次抗体に HRP 標識した抗マウス、

あるいは抗ウサギ IgG 抗体(Cell Signaling Technology 社)を使用し、Western Lightning (PerkinElmer Life Sciences 社)を用いて発色し、最後にイメージアナライザー (LAS-3000, FUJIFILM 社)でタンパク質を検出した。

遺伝子導入した HeLa 細胞からのカスパーゼの検出は、細胞を lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100, 0.5% sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktai]に溶解し、可溶化したサンプルを SDS-PAGE に て分離し、抗 caspase-8 抗体、抗 caspase-6 抗体、抗 caspase-3 抗体、抗 PARP 抗体 (Cell Signaling Technology 社)、 あるいは抗アクチン抗体 (MAB1501R, Chemicon International 社)でイムノブロッティングした。

【結果】

<u>モニター分子 SCAT を用いた細胞内 caspase-8 活性と caspase-3 活性の可視化</u>

細胞内のカスパーゼの活性を可視化するために、caspase-8 の活性を捕捉するモニター 分子 SCAT8、caspase-3 の活性を捕捉するモニター分子 SCAT3 をそれぞれ作製した。これ ら分子の模式図を Fig. 3 に示す。SCAT8 は、seCFP と Venus を caspase-8 認識配列を含 むリンカーSSSELSG<u>IETD</u>GTSGSEF で接続して作製した。SCAT3 は、seCFP と Venus の間に caspase-3 認識配列を含むリンカーSSSELSG<u>DEVD</u>GTSGSEF を挿入した。下線の 配列は各々カスパーゼ認識配列を示す。



Figure 3 The structure of FRET-based biosensors, SCAT8 and SCAT3.

SCAT8 consists of two fluorescent proteins, the seCFP and Venus, and contains the caspase-8 recognition sequence, IETD, in the linker portion. SCAT3 contains the caspase-3 recognition sequence, DEVD, in the linker portion.

SCAT8 あるいは SCAT3 をコードする DNA を HeLa 細胞に導入し、遺伝子導入細胞を 抗 Fas 抗体 CH11 で刺激した後顕微鏡観察した。蛍光陽性の細胞を seCFP 励起用 D425/40x

フィルターで励起し、Venus の蛍光を取得するフィルターHQ535/30m (FRET 用チャネル)、 あるいは seCFP の蛍光を取得する D480/40m (CFP 用チャネル) のフィルターで 100 ミリ 秒ないしは 200 ミリ秒の間取得した。細胞の画像取得は 15 秒おきに行った。取得した画像 は、MetaFluor にて FRET チャネル/ CFP チャネルの ratio を算出し、FRET チャネルの 蛍光強度画像に ratio の疑似カラーを重ね合わせた。下記 Fig. 4A で示すように、caspase-8 の活性を認め始めた 4 分後に細胞が収縮しはじめ、その後も ratio の変化(擬似カラーの緑 色より青色までの変化)が起こるが、下記 Fig. 4B の caspase-3 の活性はわずか 2 分間で大 きく ratio 値が変化(橙色から青色まで)し、一気に FRET が観察できない領域まで低下す ることが分かった。これは基質となる SCAT8 は細胞収縮時までは一部が切断されるのに対 し、SCAT3 の場合は細胞収縮直前に一気に切断されると考えられた。このように 2 種類の モニター分子を使うことにより、caspase-8 と caspase-3 の活性化様式に違いがあることを 示すことができた。



В



Figure 4 Imaging profiles of CASP8 and CASP3 activation associated with apoptosis.

(A, B) Serial fluorescence ratio images of dying HeLa cells were generated by monitoring SCAT8 (A) and SCAT3 (B) through filters as described in the Materials and methods. Numbers indicate time after taking the first image.

<u>Dual-FRET system;1 細胞で2つのカスパーゼ活性の同時検出</u>

上記のように、SCAT8 あるいは SCAT3 を使うことにより、個々の細胞において

caspase-8 と caspase-3 の活性を可視化することができた。しかしながら、両カスパーゼの 活性を 1 細胞中で比較することはできない。そこでアポトーシス誘導時の 1 細胞でイニシ エーターカスパーゼとエフェクターカスパーゼの活性を同時に検出するために、 dual-FRET システムを開発した。このシステムのために、3 つの蛍光タンパク質 seCFP (super enhanced CFP)、Venus、mRFP1 (monomeric RFP 1)が連結した融合タンパク質 CYR83 を考案した。CYR83 は、蛍光タンパク質間のリンカー領域に 2 つのカスパーゼ認 識配列 IETD および DEVD がそれぞれ挿入されており (Fig. 5)、FRET による caspase-8 と caspase-3 の活性を同時に検出するモニター分子として機能することが期待された。また、 IETD を IETA に置換したバリアントの CYR83(IETA)と、DEVD を DEVA に置換した CYR83(DEVA)の 2 種類も作製した (Fig. 7A)。これらバリアントを使うことによって、カ スパーゼ認識配列がそれぞれ caspase-8 あるいは caspase-3 によって特異的に切断されてい ることを検証した。



SSSELSGIETDGTSGSEF SSSELSGDEVDGTSGSEF

Figure 5 Characterization of the dual-FRET biosensor, CYR83.

A schematic structure of a FRET-based biosensor, CYR83. CYR83 consists of three fluorescent proteins, seCFP (CFP), Venus, and mRFP1 (RFP); the linker portion contains two distinct caspase cleavage sequences, IETD and DEVD.

CYR83 を用いた1細胞での caspase-8, caspase-3の同時活性検出

考案した Dual-FRET システムの実用性を蛍光顕微鏡観察によって検討した。HeLa 細胞に CYR83 を発現するプラスミド DNA を導入し、アポトーシス誘導時の蛍光画像を解析した。方法に記載した4つのチャンネルを用いた方法により、2つの蛍光タンパク質による画像、2 つの FRET 画像を取得した。アポトーシスの形態的特徴の一つである細胞収縮により、細胞の端に測定領域を設けると、ある時点で蛍光強度が消失する。時系列を合わせるために、細胞端の蛍光が消失した時間、すなわち細胞収縮が起きた時間をt=0と設定した。この操作により、個々の細胞での時間を標準化することができ、各条件下でのカスパーゼ活性を比較することが可能になった。

抗 Fas 抗体刺激時の CYR83 発現細胞の蛍光をタイムラプスで観察し、FRET の蛍光比 ratio を疑似カラー表示した。時間経過による連続画像 (Fig. 6) をさらに細胞内の ratio の 変化をグラフ (Fig. 7) で表した。Ratio の変動は基質の切断の程度を示唆しており、Ratio 値の低下はカスパーゼの活性上昇を意味する。Fig. 6 による連続画像を見ると、

Venus/seCFPとmRFP1/VenusのFRETの変化は両者で明らかに異なり、グラフに描画するとより顕著に違いが認められた。Caspase-8の活性化は段階的であり、1段階目は細胞収縮の数十分前より始まり、2段階目は caspase-3の活性化後に起こりかつ停滞期 (plateau)まで達した (Fig. 7B, shown by red lines)。段階的な caspase-8 活性化がアポトーシスの外因性経路に特徴的であることを調べるため、内因性経路を誘発する UV 刺激によりアポトーシスを誘導し、CYR83によるカスパーゼ活性を比較検討した。UV 刺激時には caspase-8の2段階目の反応のみ観察された (Fig. 7C, shown by red lines)。このことより、抗Fas抗体処理でみられた caspase-8の1段階目の活性は外因性経路に特異的な反応であることが分かった。

また、dual-FRET システムは、1 細胞レベルにおいてカスパーゼカスケード内で活性化 する複数のカスパーゼを時系列的に表示することが出来た。Caspase-8 と caspase-3 の活性 パターンを比較すると、外因性経路、内因性経路のいずれにおいても caspase-3 の活性化は caspase-8の2段階目の活性化前に起こり、指数関数的な反応であった(Fig. 7B,C, shown by blue lines)。また、caspase-8の活性を詳しく見ると、1段階目と2段階目の活性化の間 にリバウンドが認められ (Fig. 7B, shown by arrows)、この現象は活性化した caspase-3 に よる CYR83 の切断の結果であると考えられる。つまり、seCFP を照射すると、エネルギ ーが seCFP \rightarrow Venus \rightarrow mRFP1 へと移動していたのが、caspase-3 によって Venus と mRFP1の間が切断されるとエネルギー移動がなくなり、その結果、移動していた分のエネ ルギーがそのまま Venus の蛍光として増加するためであると推測される。そのことを検証 するため、カスパーゼ認識配列に変異を入れた CYR83 (IETA) と CYR83 (DEVA)を使って 調べた(Fig. 7A)。CYR83 (IETA)は、caspase 8 認識配列 IETD を IETA に変更したため、 caspase-8 による seCFP と Venus 間の切断は起こらないことから、CYR83 (IETA)が caspase-3 によって Venus - mRFP1 間で切断されたならば、seCFP を照射するかぎり Venus/seCFP の蛍光比が増加し維持されることが予想された。この予想は、実際の測定デ ータで Venus/seCFP の ratio が増加していることによって証明された (Fig. 7D)。明らか に、CYR83 でみられる Venus/seCFP ratio のリバウンドは mRFP1 の切断によることを示 唆した。一方、caspase-3 認識配列 DEVD を DEVA に変更した CYR83 (DEVA)は、caspase-8 の活性を見る Venus/seCFP の ratio 変化は CYR83 と同様のパターンであるが、リバウン ドは起こらなかった (Fig. 7E)。また caspase-3の活性を示すはずの mRFP1/Venus の ratio に変化が認めらなかった (Fig. 7E)。

タイムラプスイメージングの結果がモニター分子の切断を反映していることを確認する ために、CYR83 およびバリアントの CYR83 (IETA)と CYR83 (DEVA)の切断パターンを、 外因性および内因性アポトーシス経路を活性化した HeLa 細胞を用いて、生化学的に調べ た (Fig. 7F,G)。抗 Fas 抗体刺激 4 時間後に、CYR83 発現細胞の抽出物を解析すると、切 断された seCFP、Venus、mRFP1 がいずれも確認された。しかし、CYR83 (IETA)発現細 胞では、切断された seCFP と Venus は検出されず、mRFP1 のみが切断されて検出された (Fig. 7F)。このことは、seCFP – Venus 間では切断が起きなかったことを示す。また CYR83 (DEVA)発現細胞の場合、同様な刺激では切断された Venus と mRFP1 が検出されず、seCFP のみが切断されて検出され(Fig. 7F)、すなわち Venus – mRFP1 間で切断が起きなかった。 一方、CYR83、CYR83 (IETA)、CYR83 (DEVA)を発現する細胞において、caspase-3 で切 断される内在性タンパク質はいずれの CYR83 を導入した細胞でも同様な切断が認められ ており、かつアポトーシスの進行には差がなかった。UV 照射後の CYR83 および CYR83 (IETA)の切断も確認したが、抗 Fas 抗体と同様に CYR83 導入細胞では seCFP、Venus、 mRFP1 が時間依存的に確認されたが CYR83 (IETA) 発現細胞では mRFP1 のみ検出され た (Fig. 7G)。これらの結果より、FRET の ratio 変化はモニター分子の切断により起こる ことが証明された。

以上のことより、本研究によって1細胞でイニシエーターカスパーゼおよびエフェクタ ーカスパーゼの両方の活性を同時にモニターし、アポトーシス時に起こる細胞内事象を観 察するシステムを確立した。このシステムを用いて caspase-8 と caspase-3 の異なった活性 パターンを示すことが出来た。









Figure 6 Imaging profiles of caspase-8 and caspase-3 activation associated with apoptosis.

(A, B) Serial fluorescence ratio images of dying HeLa cells using a FRET-based CYR83. For the detection of caspase-8 (A) and caspase-3 (B) activation, three cells in the same field were monitored through filters. Numbers indicate time after taking the first image.



Figure 7 Monitoring of caspase activation with the CYR83 in single cells.(A) A schematic structure of CYR83 and its variants. In CYR83(IETA) variant, the

IETD sequence was replaced by IETA; in the CYR83(DEVA) variant, DEVD was replaced by DEVA. (B) The graphic pattern of the emission ratio based on the fluorescence intensity of the CYR83 in single cells undergoing apoptosis. The CYR83-expressing HeLa cells were induced to undergo apoptosis with an agonistic anti-Fas antibody and monitored by dual-FRET. Time course was set up before and after 1 h of cell shrinkage. The temporal fluctuations of the emission ratio on Venus/seCFP and mRFP1/Venus in single cells are plotted as red and blue lines, respectively. The IETDase and DEVDase activities are inversely proportional to graphic data. The arrow indicates a rebound detected by monitoring the fluorescence. (C) The CYR83-expressing HeLa cells were induced to undergo apoptosis by UV-irradiation and monitored by dual-FRET. A time course of the emission ratio is indicated. (D, E) HeLa cells expressing CYR83 variants were monitored for fluorescence. Transfected cells expressing CYR83(IETA) (D) or CYR83(DEVA) (E) were treated with an anti-Fas antibody and monitored for fluorescence. (\mathbf{F}, \mathbf{G}) Fluorescence image analyses on the proteolytic processing profiles of CYR83 and its variants. HeLa cells expressing CYR83 or its variants were subjected to extrinsic (F) and intrinsic (G) apoptotic stimuli at indicated times. Cell extracts prepared from those cells were resolved by SDS-PAGE and scanned for fluorescence in the gel using the imaging analyzer.

カスパーゼカスケードの in vitro 再構成

Dual-FRETシステムを用いて外因性経路におけるcaspase-8の2段階の活性、およびその 1段階目はレセプター刺激による初期活性化であることを示した。Caspase-8はcaspase-3を 介したcaspase-6によって切断されるという報告があり、2段階目の活性はアポトーシスシ グナル伝達のポジティブフィードバックによるものだと考えられたため、リコンビナント カスパーゼとSCAT8、SCAT3を用いた*in vitro*でのカスパーゼカスケードの再構成を試みた。 大腸菌を用いてcaspase-3やcaspase-6のリコンビナントタンパク質の合成と精製を試みた が、カスパーゼが自己活性化してしまうために非活性型の前駆体を調製できなかった(data not shown)。従って、前駆体のリコンビナントpro-caspase-3、pro-caspase-6、および FKBP-caspase-8の調製は、無細胞系タンパク質合成システムを活用した³⁹。

FKBP-caspase-8は、FK506結合タンパク質(FK506 binding protein: FKBP)とcaspase-8のプロテアーゼドメインの融合タンパク質である⁴⁰。FKBP-caspase-8の活性化は、二量体を促進するFKBPリガンドの添加でのみ可能であり、caspase-8が二量体化することで自己切断が生じて活性化するとの報告がある。FKBP-caspase-8を使うならば、自然的に起きるcaspase-8の自己活性化が防げる。そこでカスパーゼカスケードの*in vitro*再構成にはpro-caspase-8の代わりとしてFKBP-caspase-8を用いることにした。また、シグナルの入力用因子として市販の活性化型caspase-8を選び、カスケードの進行はSCAT3およびSCAT8

の切断で評価した (Fig. 8B, lanes 1–14 and lanes 15–26)。再構成の系において、カスケー ドの惹起用に使った活性化型caspase-8は約6.2 unitsであったが、この量はSCAT3, SCAT8 を3時間一緒にインキュベーションしても直接切断しなかった (Fig. 8B, lanes 2 and 16)。 活性化型caspase-8と前駆体のpro-caspase-3を混ぜ合わすことにより、SCAT3の切断が見 られた。このことは、pro-caspase-3が活性化型に変換して基質を切断したことを示唆する (Fig. 8B, lanes 3 and 11)。イムノブロットにより、pro-caspase-3が切断されていることを 確かめた (Fig. 8C, lanes 1 and 9)。プロテアーゼ活性欠損型のpro-caspase-3を用いた場合、 活性化型のcaspase-8を添加してもSCAT3の切断は見られなかった(Fig. 8B, lanes 4 and 12)。活性化型caspase-8とpro-caspase-3の他に、pro-caspase-6やFKBP-caspase8を添加し てもSCAT3の切断は大きく変わらなかった (Fig. 8B, lanes 5–10, 13, 14)。一方、SCAT8 の切断については、活性化型caspase-8、pro-caspase-3、FKBP-caspase-8を加えると、 SCAT8で一部切断が見られた (Fig. 8B, lane 18)。さらにpro-caspase-6を活性化型 caspase-8、pro-caspase-3、FKBP-caspase8の混合液に追加すると、非添加の場合よりも SCAT8の切断が2.5倍以上多くなった (Fig. 8B, lane 21)。Pro-caspase-6はpro-caspase-3 が活性化した時に切断されたので (Fig. 8C, lanes 3, 4, 12 and 13)、SCAT8の切断には caspase-3と共同したcaspase-6の活性化が重要だと推測された。FKBP-caspase-8は、単独 ないしは活性化caspase-8の添加ではプロテアーゼ活性がなく(Fig. 8B, lanes 17 and 23)、 他のカスパーゼにより活性化されて(Fig. 8C, lanes 18–24)、SCAT8を切断したと考えられ、 段階的なプロテアーゼ経路によるcaspase-8の再活性がSCAT8の切断に欠かせないことを 示した。このように、カスパーゼカスケードをin vitroで再構成し、caspase-8のポジティブ フィードバックによる活性化を確認した。





(A) A schematic structure of FRET-based probes SCAT3.1 and SCAT8.1. Both SCAT3.1 and SCAT8.1 are fusion molecules consisting of seCFP and Venus and containing either the caspase-3 recognition sequence (DEVD) or the caspase-8 recognition sequence (IETD) in the linker portion. (B) *In vitro* cleavage assay of the FRET-based probes with recombinant proteins. Various reaction mixtures containing either SCAT3.1 or SCAT8.1 combined with several caspases were incubated at 37°C for 2 h, and the cleaved products were analyzed by SDS-PAGE followed by scanning of the fluorescence in the gel. The arrow and arrowheads indicate the full-length and cleaved form of the probes, respectively. (C) Immunoblot analyses for monitoring the processing profile of pro-caspases in the reaction mixtures. After incubation for 2 h, the processing

pattern of pro-caspases in the mixture was analyzed by SDS-PAGE following immunoblotting with antibodies against caspase-3, caspase-6, or caspase-8. The arrow indicates the full-length procaspase and the white and black arrowheads indicate the completely and partially cleaved fragments, respectively. The star indicates active caspase-8 included in the mixture in advance and the asterisk shows a non-specific reaction. Abbreviations: W, wild-type pro-caspase-3; M, the protease-defect pro-caspase-3 mutant.

<u>ARK5 による caspase-6 の活性抑制を通じた caspase-8 の活性化</u>

ARK5 は、AMPK ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、caspase-6 をリン酸化することでそのプロテアーゼ活性を抑制する ⁴¹。そこで ARK5 を過剰発現すれ ば、ポジティブフィードバックループを介した caspase-8 の活性化に影響を与え、その結果 モニター分子の FRET の ratio にも変化をもたらすことが期待された。そのため HeLa 細 胞に SCAT8 と ARK5、あるいはキナーゼ欠損変異体の ARK5 (S600A)を共発現し、 caspase-8 の活性を観察した(Fig. 9B–D)。この実験に使用した SCAT8.2 (Fig. 9A) は、 seCFP と Venus の配置を置き換えて、SCAT3.1 と同じ型にしたことによって FRET 効率 が高まったことを予備実験にて確認した。ARK5を導入した細胞では、caspase-8 の 2 段階 目の活性延長が見られた (Fig. 9C)。一方で ARK5 (S600A)を導入した細胞の caspase-8 の 活性は、親株細胞と同じであった (Fig. 9B,D)。この結果より、caspase-6 はフィードバッ クループを通じた caspase-8 の活性化に必須であることが示唆された。





(A) The protein structure of the 2nd version of SCAT8. The improved construct SCAT8.2 was generated by exchanging the linker sequence DEVD in SCAT3.1 with IETD. (**B**–**D**) The graphical patterns of caspase-8 activation monitored with SCAT8.2 in single cells undergoing apoptosis. HeLa cells were transfected with either empty vector

(B), plasmid carrying ARK5 cDNA (C) or kinase-deficient mutant cDNA (D) in combination with the SCAT8.2 gene, and incubated for 1 day. Transfected cells were treated with 200 ng/ml of anti-Fas antibody and 5 µg/ml of CHX; the emission ratio of SCAT8.2 was monitored. Graphic data were adjusted by aligning a time schedule of morphological change, and representative data from two independent experiments was shown in each graph.

<u>Caspase-6 量の変動に対する caspase-8 の活性変動</u>

Caspase-8の活性化における caspase-6の関与をさらに裏付けるため、caspase-6を過剰 発現ないしは RNAi により減少させて caspase-8の活性に及ぼす影響を調べた。まず、 siRNA の細胞導入による caspase-6の発現抑制効果について検討した。Caspase-6 に対す る siRNA を導入した HeLa 細胞は、導入 3 日後には caspase-6 量が減少した (Fig. 10A)。 この細胞を用いて抗 Fas 抗体処理による caspase-8 および caspase-3の活性の変化を検討 した(Fig. 10B-E)。Caspase-8の活性についてグラフを比較すると、FRET の減少開始から 細胞収縮点 (t = 0) までの時間、ならびに SCAT8 の完全な切断までの時間が caspase-6 抑 制細胞では遅くなっており、明らかに caspase-8 の活性化が遅れていることが判明した (Fig. 10B, C)。一方、caspase-3の活性について SCAT3 の変動を調べると、SCAT3 の切断 は siRNA 導入の有無で変化がなかった (Fig. 10D, E)。但し、細胞収縮が遅くなることが認 められた (Fig. 10F)。なお、コントロール siRNA を用いた試験により、siRNA 導入に対す る caspase-8 および caspase-3 の活性に影響がないことを確認した (未発表)。これらの結 果より、caspase-6 の抑制は caspase-8 の活性化ならびに細胞収縮に影響を与えるが、 caspase-3 の活性およびアポトーシスの進行には影響しないことが確認された。

次に、caspase-6の過剰発現による影響を調べた。caspase-6および2つの caspase-6変 異体を発現するプラスミドをそれぞれ作製し (Fig. 10G)、HeLa 細胞に遺伝子導入した。抗 Fas 抗体刺激でアポトーシスを誘導した際、caspase-6を過剰発現すると caspase-8の切断 が進行することが分かった (Fig. 10H)。プロテアーゼ欠損型変異体である caspase-6CS を 過剰発現した場合、caspase-8の切断促進は起こらなかった (Fig. 10H)。また、恒常的リン 酸化変異体である caspase-6SE を過剰発現しても、caspase-8の切断促進は見られなかった (Fig. 10G,H)。Caspase-6の257番目のセリン残基が ARK5 によってリン酸化されると、 そのプロテアーゼ活性が抑制されることから ^{42,43}、今回のリン酸化変異体 caspase-6SE の 結果はそのことを支持している。以上の結果より、caspase-6は、アポトーシスの実行には 必ずしも必要でないが、ポジティブフィードバックによる caspase-8 の活性化には関与して いることが明らかとなった。 Α



Figure 10 Effects of the downregulation of caspase-6 on caspase-8 cleavage.

(A) Immunoblot analysis of the downregulation of caspase 6 by RNA interference. HeLa cells were transfected with either siRNA or Cy3-conjugated siRNA for caspase-6 and incubated for 1-3 days. Cell lysates were prepared at the indicated times and analyzed by SDS-PAGE and following immunoblotting with an anti- caspase-6 antibody. (**B**, **C**) The graphical patterns of caspase-8 activation in single cells monitored with SCAT8.2. (D, E) The graphical patterns of the caspase-3 activation monitored with SCAT3.1. Cy3-positive cells (C, E) and parental cells (B, D) were treated with 200 ng/ml of anti-Fas antibody and 5 µg/ml of CHX; the emission ratios of FRET-based biosensors were monitored. Representative data from two cells in four independent experiments are shown in graphs (B–E). (F) The overlay of graphic data shown in (D) and (E), indicating the time series around cell shrinkage. After vertical extension of the scale, graph D (red) was overlaid on graph E (blue). (G) A schematic diagram of constructs. caspase-6CS is a mutant replaced the cysteine residue with serine in the active site of the protease domain. caspase-6SE is a mutant replaced the serine residue with glutamic acid. (H) Immunoblot analyses of HeLa cells expressing caspase-6 derivatives. HeLa cells were transiently transfected either with plasmids carrying caspase-6 (lanes 4–6), caspase-6CS (lanes 7–9), caspase-6SE (lanes 10–12), or control vector (lanes 1–3) and treated with anti-Fas antibody and CHX at indicated times. Endogenous caspase-8, caspase-3, PARP and actin and exogenous caspase-6 derivatives were examined by immunoblotting with suitable specific antibodies. The numbers indicate the ratio of full-length caspase-8 in each transfectant by calculating the measurements of caspase-8 and actin using an image analyzer. Arrows indicate intact proteins while white arrowheads identify the cleaved fragments.

【考察】

第一章では、FRETの原理を応用したカスパーゼの活性測定用モニター分子を作製し、 並びにリアルタイムイメージングの技術を開発することで、1個の細胞中で起こるカスパー ゼの活性を経時的に可視化することを試みた。その結果、caspase-8の活性状態を1細胞で 提示することに成功した。さらに dual-FRET の系を構築することにより、複数のカスパー ゼが関わるカスケードの時系列的な変化を調べることが可能となり、caspase-8の増大され た活性が caspase-3 活性後に起こることを見出し、ポジティブフィードバックループの存在 を特定することができた。

FRET の原理を応用したモニター分子は、生きた細胞内で分子と分子の相互作用を観察

するために有用である⁴⁴。本研究で用いた SCAT 分子と同じく、カスパーゼの活性を可視 化するために FRET を利用した様々なモニター分子が作られている³⁴。Caspase-8 の活性 を調べるためのモニター分子も既に多種類作られている⁴⁵⁻⁴⁸。同時に複数のカスパーゼの 活性を測定するモニター分子としては、caspase-3 と caspase-6 の活性を測定するために作 られたモニター分子の報告が唯一であり⁴⁹、CYR83 のようにイニシエーターカスパーゼと エフェクターカスパーゼの両者を同時に測定できるモニター分子はこれまでに報告がなか った。CYR83 を扱うことで予想外であったのは Fig. 7B に示したリバウンドであり、Fig.7D で見られた ratio 値の逆シフトである。これらは、seCFP を励起した際にエネルギーが Venus を通過して mRFP1 まで達していたのが、caspase-3 の活性化により mRFP1 が解離 することによって現れた現象である。生体内でこのようなエネルギーの転移を観察できる のは非常に珍しいといえる。

今回用いた FRET モニター分子は、FRET 効率の向上を目的として CFP と YFP の 2 分 子間の距離の至適化を行い、SCAT3.1³⁶, 8.1, 8.2 を作製した。至適化の際に CFP と YFP 間のリンカー長について検討したが、リンカー長は多少距離があるもののほうが FRET 効 率が良かった。また CFP と YFP の順番により至適リンカー長が異なった。そのため蛍光 タンパク質の FRET には蛍光団の距離以外のファクターが関与すると考えられる。蛍光は 発する蛍光の向きがあるが、GFP のような蛍光タンパク質の場合、FRET 効率には 2 分子 間の距離のみならず、ドナー側の蛍光の向きをアクセプター側のそれと同調させることも 重要だと考えられた。

カスパーゼカスケードの *in vitro* 再構成は、これまでヒト Jurkat 細胞の抽出液を用いる か、あるいは酵母にヒトのカスパーゼを発現させるかのいずれかしか行われておらず ^{50,51}、 リコンビナントタンパク質のみを用いて4段階の反応を進めるのは本研究が初めてである。 この系では、極少量の活性型 caspase-8 を加えるだけで、caspase-3 のほとんどを活性型に 変換させることができた (Fig. 8C)。*In vitro* の系において、活性型のリコンビナント caspase-3 を調製することは容易ではないが、活性型 caspase-8 を触媒として加えさえすれ ば、簡単に活性型へと反応が進むことが本研究において明らかとなった。

Caspase-8のフィードバックループによる活性化に関して、これまでに活性化した caspase-3とcaspase-6によってcaspase-8が切断されて活性化するポジティブフィードバッ クの存在を主張する報告^{11,12}と、それに対しポジティブフィードバックの存在に否定的な見 解を示す報告¹³があり、説が二分している。論点となるのは、caspase-3とcaspase-6によっ て切断されたcaspase-8が酵素活性を持っているかであり、Oberstらは、切断された caspase-8は活性能を有しないと主張している¹³。彼らは、FKBP-caspase-8を発現させて二 量体化を促進すればcaspase-8は活性化するが、単体として存在していたcaspase-8が切断さ

重体化を促進すればcaspase-8は活性化するか、単体として存在していたcaspase-8か切倒されただけでは活性化しないと説明している。この点については、第二章のFig. 15Gの実験結果からも、FvCasp8の切断は起こるが活性化しないことは確認している。しかし、第一章に関連した研究によって、caspase-8が細胞質中では単体として存在するのではなく、何ら

かの分子と複合体を形成していることを強く示唆するデータが得られている⁵²。またFig. 7Bに示すように、抗Fas抗体でアポトーシスを誘導した場合、CYR83の切断パターンから 判断すると、先ず"IETDase"が活性化し、次に"DEVDase"、そして"IETDase"が再 活性化する結果が得られている。Caspase-3は、"DEVDase"として働いており、"IETDase" ではない。"IETDase"として可能性のあるcaspase-9も、モニター分子のCYR83に対して は親和性が低いことが明らかとなっている(Fig. 7B,C)。Caspase-6の発現がなくても、

"IETDase"の活性は認められる (Fig. 10A, C)。これらの結果を踏まえて総合的に解釈すると、少なくともHeLa細胞においてはポジティブフィードバック経路が存在し、それによってcaspase-8が再度活性化するといえる。

ではポジティブフィードバックによって活性化したcaspase-8の生理的役割は何である のか?Sakamakiらは、4回膜貫通型のカリウムイオンチャネルであるTHIK-1に着目した。 このタンパク質の細胞内領域に"IETD"配列が存在し、アポトーシス時にcaspase-8によ って切断された⁵³。アポトーシスの形態的指標である細胞収縮はカリウムイオンと塩素イオ ンの細胞外放出に起因するが、THIK-1が切断されるとカリウムイオンの放出が高まった⁵³。 また、THIK-1の両端にそれぞれseCFPとVenusをつなげた融合タンパク質を発現させると、 正常な細胞の細胞膜上でFRETを観察することができるが、アポトーシスが誘導されると THIK-1の構造が変化してFRETのratioが低下し、その低下のパターンはSCAT8のratio低 下のパターンと経時的に合致した。従ってフィードバックループによるcaspase-8の再活性 化 → THIK-1の切断 → カリウムイオンの放出増大→ 細胞収縮へと連動している可能性 が考えられた。

がんに対する分子治療薬として、デスレセプターのTRAIL-R1に対するアゴニスティッ クな抗体のMapatumumab⁵⁴やTRAIL-R2に対する抗体Lexatumumab⁵⁴が使われているが、 効果が認められない事例がある。この原因は、デスレセプターが活性化しても、細胞内の アポトーシスのシグナル伝達分子が不活化状態にあると考えられ、例えばcaspase-8の活性 を抑制するc-FLIPの発現が高ければ抗体の効きめがない⁵⁵。本研究で確立したモニター分子 を用いることにより、シグナル伝達経路のどのポイントで活性化が抑制化されているかを 推測可能となり、がん細胞を消滅するためにどのような治療薬を併用すれば効果的かを把 握することにつながるものと考えられる。

24

第二章 数理モデルによる caspase-8, caspase-3 の活性化量の検討

前章では、FRETの原理を応用したモニター分子を用いることで、1細胞中のカスパー ゼの活性に関して経時的な変化を検出する系を確立した。その結果、caspase-8の段階的な 活性化機序、並びに1段階目のレセプター刺激による初期活性と細胞収縮後に起こる活性 との量的な違いを見分けることが可能となった。この段階的な caspase-8の活性化は、デス レセプターを介するアポトーシスのシグナル伝達経路において顕著に認められた。実験に 用いた HeLa 細胞は、caspase-8 が Bid を切断してミトコンドリアを介した内因性の経路を 活性化する Type 2の細胞といわれている。Type 1細胞と Type 2細胞の違いは、Fas など のデスレセプター刺激下における caspase-8 の活性化量の違いではないかとの仮説が成り 立つ。これまでの技術では caspase-8 の初期活性のみを特定することができなかったが、本 研究によって確立したイメージングの手法を用いれば測定可能になると考えられた。本章 では、さらに Fas 刺激で活性化されるカスパーゼの量的変化を検討するため、新たに数理 モデルを構築し併用することによって、カスパーゼの活性化量を算定することを試みた。

【方法】

試薬

抗 caspase-3 抗体、抗 caspase-9 抗体、抗 Bid 抗体は Cell Signaling Technology 社より、 抗 caspase-6 抗体 (3E8)、抗 caspase-8 抗体 (5F7)、抗 caspase-10 抗体 (4C1)、抗 Fas 抗 体 (CH11)は MBL 社より、抗 actin 抗体 (MAB1501R)は Chemicon International 社よ り購入した。Carbobenzoyl – IETD - fluoromethylketone (z-IETD-fmk) は Peptide Institute 社より購入した。ヒト Bid に特異的な Cy3 結合あるいは未標識の siRNA カクテ ル (GAAGACAUCAUCCGGAAUA, ACGAUGAGCUGCAGACUGA, GCACCUACGUGAGGAGCUU, CUCCAAAGCUGUUCUGACA) は、Dharmacon 社 (catalog number: M-004387-00)より、ヒト caspase-6 に特異的な Cy3 結合あるいは未標識 の siRNA カクテル (CAGAGAAGUUGGACACCAA, UGUGUGAGAUGUUGGGAAA, and GGUUUGAUAUGGAGAAACA) は、B-Bridge International 社より購入した。プロ テアーゼ阻害カクテルは、ナカライテスク社より購入した。

遺伝子発現用プラスミドの構築

FRET の原理を応用したモニター分子 SCAT8.1、SCAT8.2 および SCAT3.1 は、DNA フラグメントを pCAGGS に導入した。細胞膜局在型および核膜移行型の蛍光タンパク質を 発現させるためのプラスミドコンストラクト pCS2-mRFP1-Mem は基礎生物研究所上野博 士より、pLBR[™]-EGFP は The European Molecular Biology Laboratory (EMBL)の Jan Ellenberg 博士より供与された。

細胞培養および遺伝子導入

ヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞株は、10% fetal calf serum (FCS)を添加した Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)で培養した。プラスミド DNA の遺伝子導入 には LipofectAMINE 2000 (Invitrogen 社)を用いた。ヒト Bid siRNA の遺伝子導入は、 TransFectin[™] Lipid Reagent (Bio-Rad Laboratories 社)を用いた。

リコンビナントタンパク質の合成

タンパク質定量の指標にするため、ヒト caspase-3、caspase-6、caspase-8、caspase-9、 caspase-10、および Bid の各リコンビナントタンパク質を無細胞系タンパク合成システム にて作製した。プロテアーゼの活性基であるシステイン残基をセリンに変更した CS 変異体 をコードする caspase-3、caspase-6、caspase-8、caspase-9、caspase-10 の各 cDNA を pEU プラスミドに導入した。これらと Bid cDNA を pEU プラスミドに導入した計 6 種類のコン ストラクトを RNA 合成の鋳型として用いた。合成された RNA は、小麦胚芽抽出物 (WEPRO-1240, CellFree Sciences 社)を用いてタンパク質合成を行った。合成されたリコ ンビナントタンパク質の評価は SDS-PAGE 後 Coomassie Brilliant Blue 染色で確認した。 リコンビナントタンパク質の濃度は、DC Protein Assay kit (Bio-Rad Japan 社)、および albumin standard solution (PIERCE 社)にて同定した。

<u>イムノブロッティング</u>

全長あるいは切断された caspase-8 の検出や、siRNA 処理による Bid のノックダウン効 果を確認するために、遺伝子導入した細胞をアポトーシス刺激処置前後に lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100, 0.5% sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktailに溶解した。可溶化したサンプルは、SDS-PAGE にて分離し、抗 caspase-8 抗体、抗 caspase-6 抗体、抗 Bid 抗体、あるいは抗 actin 抗体で イムノブロッティングした。また、細胞内の caspase-3、caspase-6、caspase-8、caspase-9、 caspase-10、および Bid のタンパク質量を定量するために、HeLa 細胞の細胞数を計測後に lysis buffer で溶解し、段階的に希釈した。サンプルは、標準のリコンビナントタンパク質 と共に SDS-PAGE で分離後、各々のタンパク質に対する抗体でイムノブロッティングを行 った。二次抗体に HRP 標識した抗マウス、あるいは抗ウサギ IgG 抗体(Cell Signaling Technology 社)を使用し、Western Lightning (PerkinElmer Life Sciences 社)を用いてタン パク質を検出した。

ペプチド阻害剤を使用した caspase-8 の活性阻害

Caspase-8 の活性に対するペプチド阻害剤の効果を確かめるために、抗 Fas 抗体で刺激 する 60 分前に z-IETD-fmk を 1 µM の濃度で培地に添加し、抗体投与後にタイムラプスに より SCAT モニター分子を発現する細胞の蛍光画像を取得した。

数理モデルの構築

アポトーシスのシグナル伝達に対する数理モデルは、Fig. 11 に示すフローチャートに基づいて、アポトーシスシグナル伝達経路を Table 1 に記載した化学反応式で表した。





The schematic diagram on apoptotic signaling pathways associated with CASP8activation. The apoptotic reaction starts when natural death ligand or agonistic antibody against death receptor binds to and induces the oligomerization of receptors. An adaptor molecule, FADD and caspase-8 (C8) are recruited to form a DISC complex. In the DISC complex, active caspase-8 (C8*) arises by autoprocessing and is released from the complex to cleave downstream molecules, caspase-3 (C3) and Bid. A truncated form of Bid (tBid*) processed by active caspase-8 translocates into the mitochondria and triggers the intrinsic apoptotic pathway, following the change of caspase-9 (C9) to active form (C9*). caspase-3 (C3) is activated after cleavage by apical active caspases C8* and C9*. In caspase-6, pro-form (C6) is converted into the active form (C6*) by the cleavage with active caspase-3 (C3*). The inhibitor such as CARP1 regulates the activation of caspase-8. SCAT8 and SCAT3 were cited as a substrate recognized by either active caspase-8 or caspase-3.

1	$C_8 + DISC \stackrel{k_1}{\underset{k_2}{\leftrightarrow}} C_8 DISC$	Interaction between CASP8 and DISC
2	$C_8 DISC \xrightarrow{k_3} C_8 L + C_8 S$	Cleavage of CASP8 in the DISC complex
3	$2C_8L + 2C_8S \xrightarrow{k_4} C_8^*$	Formation of an active form of CASP8
4	$C_8^* + C_3 \underset{k_6}{\overset{k_5}{\longleftrightarrow}} C_8^* C_3$	Interaction between active CASP8 and CASP3
5	$C_8^*C_3 \xrightarrow{k_7} C_3S + C_3L + C_8^*$	Cleavage of CASP3
6	$C_8^* + Bid \underset{k_9}{\overset{k_8}{\longleftrightarrow}} C_8^* Bid$	Interaction between active CASP8 and Bid
7	$C_8^*Bid \xrightarrow{k_{10}} tBid + C_8^*$	Truncation of Bid by active CASP8
8	$C_8^* + SCAT8 \underset{k_{12}}{\overset{k_{11}}{\leftrightarrow}} C_8^* SCAT8$	Interaction between active CASP8 and SCAT8
9	$C_8^*SCAT8 \xrightarrow{k_{13}} CFP + YFP + C_8^*$	Cleavage of SCAT8 by active CASP8
10	$C_8^* + CARP \underset{k_{15}}{\longleftrightarrow} C_8^* CARP$	Inhibition of active CASP8 by CARP
11	$C_9^* + C_3 \underset{k_{17}}{\overset{k_{16}}{\longleftrightarrow}} C_9^* C_3$	Interaction between active CASP9 and CASP3
12	$\mathbf{C}_{9}^{*}\mathbf{C}_{3} \xrightarrow{k_{18}} \mathbf{C}_{3}L + \mathbf{C}_{3}S + \mathbf{C}_{9}^{*}$	Cleavage of CASP3 by active CASP9
13	$2C_3L + 2C_3S \xrightarrow{k_{19}} C_3^*$	Formation of an active form of CASP3
14	$C_3^* + SCAT3 \underset{k_{21}}{\longleftrightarrow} C_3^*SCAT3$	Interaction between active CASP3 and SCAT3
15	$C_3^*SCAT3 \xrightarrow{k_{22}} CFP + YFP + C_3^*$	Cleavage of SCAT3 by active CASP3
16	$C_3^* + C_6 \underset{k_{24}}{\overset{k_{23}}{\longleftrightarrow}} C_3^* C_6$	Interaction between active CASP3 and CASP6
17	$\mathbf{C}_{3}^{*}\mathbf{C}_{6} \xrightarrow{k_{25}} \mathbf{C}_{6}L + \mathbf{C}_{6}S + \mathbf{C}_{3}^{*}$	Cleavage of CASP6 by active CASP3

Table 1Chemical reaction equations and categorization.

18	$2C_6L + 2C_6S \xrightarrow{k_{26}} C_6^*$	Formation of an active form of CASP6
19	$C_3^* + CARP \underset{k_{28}}{\longleftrightarrow} C_3^* CARP$	Interaction between active CASP3 and CARP
20	$C_3^*CARP \xrightarrow{k_{29}} degradedCARP + C_3^*$	Cleavage of CARP by active CASP3
21	$C_9 + tBid \xrightarrow{k_{30}} C_9^* + tBid$	Activation of CASP9
22	$C_6^* + C_8 \underset{k_{32}}{\overset{k_{31}}{\longleftrightarrow}} C_6^* C_8$	Interaction between active CASP6 and CASP8
23	$C_6^*C_8 \xrightarrow{k_{33}} C_8L + C_8S + C_6^*$	Cleavage of CASP8 by active CASP6

Lexicons: DISC, Ligand + Receptor + FADD complex; Cn, inactive procaspase-n; Cn*, active form of caspase-n; tBid, truncated form of Bid; CARP, negative regulator; CASP3, caspase-3; CASP6, caspase-6; CASP8, caspase-8; CASP9, caspase-9; L, large subunit; S, small subunit; k, reaction rate constant.

Table 1 で表示した化学反応を 6 つのカテゴリーに分け、下記に示す反応式で表し、 これらを構築することで数理モデルを作製した。なお、カスパーゼのプロテアーゼドメ インの構造はよく保存されているため、各カスパーゼと基質との反応定数は同程度であ り、カスパーゼと基質の結合・解離定数および酵素反応の定数を下記の値で一定と仮定 した。

結合定数 = 0.5 /nmol sec,

解離定数 = 0.01 /sec,

反応速度定数 = 15.0 /sec

<u>1. caspase-8 の活性化、基質ないしはインヒビターCARP との相互作用</u>

d[C8]/dt = -k1[C8][DISC] + k2[C8DISC] - k27[C8][C6*] + k28[C8C6*] d[DISC]/dt = - k1[C8][DISC] + (k2 + k3)[C8DISC] d[C8DISC]/dt = k1[C8][DISC] - (k2 + k3)[C8DISC] d[C8C6*]/dt = k27[C8][C6*] - (k28 + k29)[C8C6*] d[C8L]/dt = d[C8S]/dt = k3[C8DISC] + k29[C8C6*] - 4k4[C8L]4 d[C8*]/dt = k4[C8L]4 - k5[C8*][C3] + (k6 + k7)[C8*C3] - k8[C8*][Bid] + (k9 + k10)[C8*Bid] - k11[C8*][SCAT8] + (k12 + k13)[C8*SCAT8] - k14[C8*][CARP] + k15[C8*CARP] <u>2. caspase 3 の活性化および基質との結合</u>

d[C3]/dt = -k5[C8*][C3] + k6[C8*C3] - k16[C9*][C3] + k17[C9*C3]

```
d[C8*C3]/dt = k5[C8*][C3] - (k6 + k7)[C8*C3]
 d[C3L]/dt = k7[C8*C3] + k18[C9*C3] - 4k19[C3L]4
 d[C3^*]/dt = k19[C3L]4 - k20[C3^*][SCAT3] + (k21 + k22)[C3^*SCAT3]
         -k22[C3^*][C6] + (k24 + k25)[C3^*C6] - k27[C3^*][CARP]
         + (k28 + k29)[C3*CARP]
3. 外因性経路からミトコンドリア経路への移行
 d[Bid]/dt = -k8[C8^*][Bid] + k9[C8^*Bid]
 d[C8*Bid]/dt = k8[C8*][Bid] - (k9 + k10)[C8*Bid]
 d[tBid]/dt = k10[C8*Bid]
 d[C9]/dt = -k30[tBid]h[C9]/(kx + [tBid]h)
 d[C9^*]/dt = k30[tBid]h[C9]/(kx + [tBid]h) - k16[C9^*][C3] + (k17 + k18)[C9^*C3]
 d[C9*C3]/dt = k16[C9*][C3] - (k17 + k18)[C9*C3]
4. ポジティブフィードバックループによる caspase-8 活性化
 d[C6]/dt = -k23[C3^*][C6] + k24[C3^*C6]
 d[C3*C6]/dt = k23[C3*][C6] - (k24 + k25)[C3*C6]
 d[C6L]/dt = k25[C3*C6] - 4k26[C6L]4
 d[C6^*]/dt = k26[C6L]4 - k31[C6^*][C8] + (k32 + k33)[C6^*C8]
5. caspase-8 に対する CARP の阻害
 d[CARP]/dt = -k14[C8^*][CARP] + k15[C8^*CARP] - k27[C3^*][CARP]
         + k28[C3*CARP]
 d[C8*CARP]/dt = k14[C8*][CARP] - k15[C8*CARP]
 d[C3*CARP]/dt = k27[C3*][CARP] \cdot (k28 + k29)[C3*CARP]
6. カスパーゼによる SCAT の切断
 d[SCAT8]/dt = -k11[C8*][SCAT8] + k12[C8*SCAT8]
 d[C8*SCAT8]/dt = k11[C8*][SCAT8] - (k12 + k13)[C8*SCAT8]
 d[YFP]/dt = k13[C8*SCAT8] + k22[C3*SCAT3]
 d[SCAT3]/dt = -k20[C3*][SCAT3] + k21[C3*SCAT3]
 d[C3*SCAT3]/dt = k20[C3*][SCAT3] - (k21 + k22)[C3*SCAT3]
 d[CFP]/dt = k13[C8*SCAT8] + k22[C3*SCAT3]
```

【結果】

アポトーシスシグナル伝達の数理モデルの構築

第一章で示したように、FRET の原理を応用したモニター分子を用いることにより、細胞死に伴うイニシエーターカスパーゼの caspase-8 およびエフェクターカスパーゼの

caspase-3の活性化を数値化することが可能となった。第二章では、caspase-8と caspase-3のそれぞれの活性を特異的に捕捉できるモニター分子を使って、両分子のFRETの変動から caspase-8と caspase-3の酵素活性を求め、それらを数理モデルで表記することを試みた。

カスパーゼの僅かな活性を検出できるように、第一章で用いたモニター分子 SCAT8 と SCAT3 を改良した。FRET の ratio の変動幅が拡大するように、リンカー部位のアミノ酸 配列を工夫した。その結果、改良型 SCAT8.1 の場合は Venus タンパク質の C 末端側 9 ア ミノ酸を除くことにより、変動幅が大きくなった (Fig. 12B)。また改良型 SCAT3.1 は、C 末端側 7 アミノ酸を欠如することで効率が上がった (Fig. 12C)。実際に、HeLa 細胞に導入 して FRET の ratio の変動幅を調べたところ、平均すると SCAT8.1 は ratio 値が 2.5 から 1 まで変動し、SCAT3.1 は 5 から 0.8 まで変わっていた (Fig. 12B,C)。これら改良型モニタ ー分子は期待通りの結果を示すことが判明したため、以下の研究に用いた。



Figure 12 Generation and monitoring of FRET-based biosensors, SCAT8.1 and SCAT3.1.

(A) The structure of FRET-based biosensors, SCAT8.1 and SCAT3.1. SCAT8.1 consists of two fluorescent proteins, the truncated Venus and full-length seCFP, and contains the caspase-8 recognition sequence, IETD, in the linker portion. SCAT3.1 consists of the truncated seCFP and full-length Venus and contains the caspase-3 recognition sequence, DEVD, in the linker portion. (**B**, **C**) The dynamics of caspase-8 and caspase-3 activation monitored with either SCAT8.1 or SCAT3.1 in human cell lines. HeLa cells expressing SCAT8.1 or SCAT3.1 were treated with 200 ng/ml of anti-Fas antibody in the presence of 5 μ g/ml CHX and monitored by FRET during apoptosis.

Each line in the graph indicates the emission ratio based on the fluorescent intensity of the biosensors detected through the D480/40m (for seCFP) and HQ535/30m (for Venus) emission filters in single cells, and is inversely proportional to the caspase-8 or caspase-3 activity. (n) indicates the number of cells examined. Time zero indicates the moment when apoptotic stimulants were added. The right panels (B and C) indicate the adjusted profiles by converting the moment within an hour based on time courses from single cells (gray lines) and their average (a blue line).

アポトーシスを起こしている細胞中のcaspase-8とcaspase-3の活性状態を推定するため、 カスパーゼカスケードを構成しているcaspase-8、caspase-3、caspase9、そしてBidおよび カスパーゼの基質として設定したSCAT8あるいはSCAT3について、それらが関わる反応を 全て計算式に組み込み、数理モデルを作成した。このモデルを使って、caspase-8とcaspase-3 に関して、活性化された分子のモル比を検討した。カスパーゼによるプロテアーゼ活性は 非可逆的であるため、SCAT分子や内在の基質タンパク質は、細胞死のシグナルが誘導され 充分な時間が経過すると完全に切断される。それゆえSCATの切断は、各活性型カスパーゼ の量によって大きく影響を受ける。Caspase-8とcaspase-3の両者が同程度に活性化される と仮定すると、FRETのratio変化はほぼ同時に起こっていた(Fig. 13A)。次に、活性化し たcaspase-8をcaspase-3の1/5量と設定した場合、数理モデルでは緩やかながらSCAT8の変 化が先に起こり、それに続いてSCAT3が急激に変化した(Fig. 13B)。逆に活性化caspase-8 がcaspase-3より多いと仮定すると、SCAT8のratio変化は先に起きたものの、極端な変化で あった (Fig. 13C)。Fig. 13Aと13Cで示したデータは、実験で得られた実測データ (Fig. 12B, C) と明らかに異なっているのに対し、Fig. 12Bで示したデータは近似している。このよう に、数理モデルのデータと実験的に得られたデータを比較することにより、実在の細胞中 ではcaspase-8の活性化量はcaspase-3よりも少ないと推察された。これは、細胞で生成され た量がcaspase-8の方がcaspase-3よりも少ないか、あるいはカスパーゼカスケードの上位に 位置するcaspase-8が一部でも活性化されればシグナルが増幅されるかの、いずれかの可能 性が考えられた。

また、caspase-8の活性化に続くcaspase-3の活性化について、ミトコンドリア経路の影響についてモデルで検討した。本研究において作成した数理モデルでは、Type 2 細胞で順に起きる caspase-8 \rightarrow Bid \rightarrow caspase-9 \rightarrow caspase-3のシグナル伝達のうち、Bidの地点でシグナルを遮断してもcaspase-3の活性が遅れて起きることを示した(Fig. 13D)。これまでの実験をもとにした報告と異なるが、この点については実験的に実証した(後述)。

以上のように、様々なパラメーターを設定して作成した数理モデルは、カスパーゼが活 性化するパターンを実測値に近い状態で表記することが可能であることが判明した。



Figure 13 Mathematical models of caspase-8 (CASP8) and caspase-3 (CASP3) activation.

(A–C) The graphical patterns of CASP8 and CASP3 activation proposed by a model. The numbers of moles of CASP8 and CASP3 in the model are 100 nM CASP8 and CASP3 (A), 20 nM CASP8 and 100 nM CASP3 (B) and 300 nM CASP8 and 30 nM CASP3 (C), respectively. (D) In the case of no intrinsic apoptotic signaling pathway. Except that there is no linkage through Bid to the mitochondrial pathway, the parameters were set up as indicated in (B). Red and blue lines in each graph indicate the virtual emission ratio of the FRET-based biosensors after apoptotic stimuli, inversely correlating with a time course on CASP8 and CASP3 activities, respectively.

<u>数理モデルの評価:内因性経路を阻害した時のカスパーゼの活性化様式</u>

Bcl-2 ファミリー分子の Bid は、caspase-8 によって切断されると、その切断産物 tBid (truncated Bid)がミトコンドリアへ移行し、ミトコンドリア経路を活性化する 56。本研究 では、実験的にミトコンドリア経路を抑制する目的で、RNAi 干渉法により Bid タンパク質 の合成を抑制した。そして、ミトコンドリア経路が活性化しない状態でアポトーシスを誘 導し、その時の SCAT モニター分子の ratio 変化を測定した。Fig. 14A に示すように、Bid 特異的 siRNA をトランスフェクションした細胞では、導入 3 日後に Bid タンパク質が消失 した。この細胞を抗 Fas 抗体で処理してアポトーシスを誘導し、caspase-8 および caspase-3 の活性をモニターした。その結果、caspase-8 の活性には変化がないが (Fig. 14B,C)、 caspase-3 の活性はコントロールに比べ大きく変化した (Fig. 14D, E)。Bid が無いことによ って caspase-3の活性はかなり抑制されていたが、それでも一部の caspase-3 は活性化して おり、その結果細胞死が誘導された。興味深いことに、Fig. 14E のグラフで示すパターン は、数理モデルによって描画したパターン (Fig. 13D)に相似していた。これらの解析結果 は、Type 2 細胞とされている HeLa 細胞において、ミトコンドリアを介するアポトーシス のシグナル伝達経路だけでなく、Type 1細胞のように直接 caspase-8 が caspase-3 を活性 化する経路も稼働している可能性を強く示唆した。加えて、数理モデルで提示した Fig. 13D のパターンの信頼性を支持する結果となった。

Α





(A) Immunoblot analysis of the downregulation of Bid by RNA interference. HeLa cells were transfected with either siRNA or Cy3-conjugated siRNA for Bid and incubated for 1–3 days. Cell lysates were prepared at the indicated time and analyzed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with an anti-Bid antibody. (B, C) The graphical patterns of the caspase-8 activation in single cells monitored with SCAT8.1. (D, E) The graphical patterns of the caspase-3 activation in the single cells monitored with SCAT3.1. Cy3-positive cells (C, E) and parental cells (B, D), co-expressing either SCAT8.1 or SCAT3.1, were treated with 200 ng/ml of anti-Fas antibody and 5 µg/ml of CHX; the emission ratio was monitored. The graphical data were adjusted by converting the moment when cells went away from a scanning spot to time zero. Representative data from five independent experiments is shown in each graph.

Caspase-8 の発現増加に伴うアポトーシスシグナルの促進化

数理モデルのシミュレーションでは、アポトーシス誘導時の活性化 caspase-8 量が著し く増加すると、caspase-3の切断・活性化が早くなり、アポトーシスが急激に起こると推測

された (Fig. 13C)。この in silico での解析結果を実験的に実証するため、FK506 結合タン パク質と caspase-8 のキメラタンパク質 FvCasp8 を発現するプラスミドを作製した (Fig. 15A)。FvCasp8は、AP20187を介して二量体化が進み、その複合体の中で caspase-8 が活 性化する。HeLa 細胞にこの FvCasp8 を導入した後、AP20187 を培地に加えてアポトーシ スを誘導した。AP20187 添加によるアポトーシスの誘導は、抗 Fas 抗体添加によるアポト ーシス誘導に比べて早く起き、添加後1時間以内にはアポトーシスを誘導した (Fig. 15B)。 また、AP20187 添加によるアポトーシス誘導時には、caspase-8 の基質である SCAT8.1 の 切断が抗 Fas 抗体誘導アポトーシスに比べ急激に、かつ指数関数的に起こった (Fig. 15C,D)。一方、caspase-3の活性には影響がなかった(Fig. 15E,F)。この実験結果は、上記 数理モデルのシミュレーション (Fig. 13A)と類似している。HeLa 細胞内の FvCasp8 と内 在 caspase-8 の発現と切断様式をイムノブロッティングで調べたところ、実験に用いた細胞 ではFvCasp8が内在 caspase-8の3.6倍多く存在していたことから (Fig. 15G, lanes 1,2)、 総和は親株に比べほぼ5倍の多さであった。また AP20187 添加によって、切断された活性 型の FvCasp8 が検出された (Fig. 15G, lane 8)。一方で親株の HeLa 細胞、あるいは AP20187 で二量体化が誘導されない FKBP rapamycin 結合 (FRB) ドメインが caspase-8 に融合した FRB-Casp8 (Fig. 15A)を導入した細胞では、AP20187 を添加しても切断された 活性化 caspase-8 は検出されず、アポトーシスが誘導されていなかった(Fig. 5G, lanes 7,9)。 このことより、FvCasp8の活性に依存したアポトーシス誘導であることが分かった。また、 融合タンパク質を発現する細胞を抗 Fas 抗体により処理すると、内在の caspase-8 のみな らず外来の FvCasp8、FRB-Casp8 ともに切断されていた (Fig. 15G, lanes 5,6)。しかし、 SCAT8.1の ratio の変動パターンから推測すると、モノマーのまま切断された FvCasp8 は 活性化型ではないと考えられた。


Figure 15 Enhanced caspase-8 (CASP8) activation caused the promotion of apoptosis.

(A) The structure of chimeric Fv-CASP8 and FRB-CASP8 consisting of the artificial dimerization domain, Fv or FRB ⁵⁷ and the protease domain of CASP8. Fv-CASP8, but not FRB-CASP8, is able to dimerize in the presence of the dimerization compound, AP20187. DED, death effector domain. (B) The graphical patterns of caspase-8 activation monitored with SCAT8.1. HeLa cells were transfected with either empty vector or plasmid carrying Fv-CASP8 in combination with the SCAT8.1 gene, incubated

for 1 day. Eight single cells expressing Fv-CASP8 were treated with 100 nM AP20187 and six cells carrying empty vector were treated with 200 ng/ml of anti-Fas antibody and 5 µg/ml of CHX; their emission ratios are each indicated by lines. Time zero indicates the moment when apoptotic stimulants are added. (\mathbf{C}, \mathbf{D}) The graphical patterns of the caspase-8 activation in single cells monitored with SCAT8.1. (E, F) The graphical patterns of the caspase-3 activation in single cells monitored with SCAT3.1. HeLa cells expressing Fv-CASP8 were treated with AP20187 (D, F) and HeLa cells carrying empty vector were treated with anti-Fas antibody and CHX (C, E). Graphic data (C-F) were adjusted by aligning a time schedule of morphological change, and representative data from four or two independent experiments was shown in each graph. (G) Immunoblot analysis of caspase-8 derivative-expressing cells. HeLa cells were transfected either with plasmids carrying Fv-CASP8 (lanes 2, 5 and 8), FRB-CASP8 (lanes 3, 6 and 9), or control vector (lanes 1, 4 and 7) and treated with either anti-Fas antibody and CHX for 6 h (lanes 4–6) or AP20187 for 6 h (lanes 7–9). The full-length and processed fragments of endogenous caspase-8 and exogenous derivatives were detected by immunoblotting with an anti-caspase-8 antibody.

Caspase-8の活性を抑制した場合のカスパーゼカスケードの解析

Carbobenzoyl - IETD - fluoromethylketone (z-IETD-fmk)は、caspase-8 に特異的な阻害剤である。低濃度でz-IETD-fmk処理すれば、アポトーシスを抑制することなく caspase-8 の活性を部分的に阻害するのではないかと考え、z-IETD-fmk を前処理した後、抗 Fas 抗体刺激でアポトーシスを誘導した HeLa 細胞の caspase-8 の活性を調べた。様々な濃度で試したところ、1 μ M の濃度が最も効果的であることが分かった。z-IETD-fmk の前処理により、2 段階目の caspase-8 の活性について影響が認められ、部分的に抑制された (Fig. 16A,B)。一方で、低濃度の z-IETD-fmk の添加では caspse-3 の活性に変化はなく(Fig. 16C,D)、アポトーシスも抑制しなかった。これらの結果は、1 段階目の caspase-8 活性化量は少量でも caspase-3 の活性化には十分であることが推測された。第一章の Fig. 8 に示したように、*in vitro* におけるカスパーゼカスケード再構築において、caspase-3 の活性化には少量の caspase-8 で十分であることを確認している。

この現象を数理モデルで再現するために、caspase-8 の活性を抑制することが判明して いる内在性阻害分子の CARP ⁵⁸を数理モデルに導入した(Fig. 16E)。阻害分子存在下では、 その濃度依存的に SCAT8 の蛍光比の低下が遅くなることを示し、これは実験で得られたデ ータと一致した(Fig. 16E, left panel)。一方、SCAT3 の蛍光比変化は、CARP の存在の有 無にかかわらず変化がなかった(Fig. 16E, right panel)。このように、数理モデルは caspase-8 活性阻害タンパク質の存在下で caspase-8 の活性が変動するが、caspase-3 の活 性には影響しないことが予測可能となった。





(A, B) The graphical patterns of caspase-8 activation monitored with SCAT8.1. (C, D). The graphical patterns of caspase-3 activation monitored with SCAT3.1. Cells expressing SCAT8.1 (A, B) or SCAT3.1 (C, D) were treated with 200 ng/ml of anti-Fas antibody and 5 µg/ml of CHX in the absence (A, C) or presence of 1 µM z-IETD-fmk (B, D) in the medium. Representative data from four independent experiments was shown in each graph. (E) The graphical patterns of caspase-8 and caspase-3 activation proposed by a model. A negative regulator, CARP partially inactivates caspase-8 (left panel) but not caspase-3 (right panel). Red and blue lines in each graph indicate the virtual emission ratio of the FRET-based biosensors after apoptotic stimuli.

数理モデルから算出した初期活性化カスパーゼ濃度

このように作成した数理モデルは、実験的に得られたデータを正確に反映していること

を示した。次に、外因性アポトーシスの刺激による caspase-8 と caspase-3 の初期活性の量 を数理モデルから求めた。既報 ⁵⁹に基づき、30回の計算、SCAT8 と SCAT3 の 2 つの実験 結果、5000 の粒子フィルターを通じて評価し、最尤度を決定した。すべての対数尤度 (log-likelihood)の密度プロットによって、対数尤度が caspase-8 は 110 nM、caspase-3 は 190 nM の時に最大化した。この数値を当てはめてグラフを作成し、実測データを描いたグ ラフと重ね合わせたところ、SCAT8 および SCAT3 の分解の動力学は実験データと完全に 一致した (Fig. 17)。このように、実験データと比較しながら作成した数理モデルはシグナ ル伝達の理解に役立ち、かつ 1 細胞におけるアポトーシスシグナル伝達における分子量の 推定まで可能にした。





The comparison between the results obtained from a deterministic model and the experimental data. The fluorescence indicated by SCAT8 and SCAT3 is plotted as a function of time. Filled rectangles (\blacksquare) and circles (\bullet) show the numerical results of our deterministic model when caspase-8 = 110 nM and caspase-3 = 190 nM, by maximizing log-likelihood. On the other hand, open rectangles (\Box) and circles (\bullet) show the live imaging data of the fluorescence indicated by SCAT8 and SCAT3, respectively. The fluorescence of SCAT biosensors obtained from our model is close to the experimental data at these levels of caspase-8 and caspase-3 expression.

アポトーシスを実行するために必要な caspase-8 と caspase-3 の初期活性量の定量

これまでの研究では、アポトーシスの実行に必要なプロアポトーシス関連因子の分子数 にまで言及されていなかった。しかし、細胞内のアポトーシス実行因子のうち、どれだけ の分子がシグナル伝達に関与しているかを調べることは、数理モデルを完成するためには 不可欠である。従って、HeLa 細胞中の caspase-3、caspase-6、caspase-8、caspase-9、 caspase-10、そして Bid の各分子の濃度を定量することにした。これらアポトーシス関連 因子の分子量の同定には、無細胞系で合成したリコンビナントタンパク質 39 を標準として 用いた。リコンビナントタンパク質を使って検量線を定め、イムノブロット解析によって 1 細胞当たりのアポトーシス関連因子の分子数を求めた (Fig. 18A)。その結果を Table 2 に示す。計測の結果、caspase-8の分子数は、caspase-3の分子数より6倍多く存在すると 見積もられた。また、今回測定した caspase-8 の分子数は、過去の報告 60 よりも多かった。 次に細胞内の各タンパク質の濃度を求めるために、HeLa 細胞の体積およびその核体積を、 細胞膜ないしは核膜を標識する蛍光タンパク質を用いて測定した (Fig. 18B)。測定結果を Table 3 に示す。調べた 8 個の細胞について、その細胞体積は 5,149 µm³ ~ 9,573 µm³ ま での間で分布し、平均は 6,884 ± 1,371 μm³ だった。同様に核の体積を求め、細胞質体積(= 細胞体積 – 核体積)として平均 5,657 ± 1,485 μm³という値を得た。これらの数値をもと にアポトーシス関連因子の1細胞当たりの濃度を算出したところ、caspase-3は10.6 μM、 caspase-6 は 0.9 μ M、caspase-8 は 58.7 μ M、caspase-9 は 0.9 μ M、Bid は 2.9 μ M となっ た。caspase-8のホモログでありデスレセプター刺激によるイニシエーターカスパーゼであ る caspase-10 は 0.4 µM 以下であった。この濃度は過去の報告 61 あるように細胞死を誘導 するには不十分な量であるように見えた。一方、数理モデルより初期活性に必要な caspase-8 と caspase-3 濃度は各々110 nM と 190 nM と見積もったので、これらのデータ と細胞内濃度と比較したところ、アポトーシスの初期活性化量は細胞質内にある caspase-8 の 0.19%、 caspase-3 の 1.79% であることが分かった (Table 4)。 すなわち、アポトーシス シグナルを下流へと伝えるためには、細胞質の caspase-8 量の 0.2 %が活性化するだけで十 分であることが分かった。



Figure 18 Quantitative analyses of molecules involved in apoptotic signal transduction.

(A) Immunoblot analyses for estimating the amount of caspases and Bid in HeLa cells. Protein content of caspases (caspase-3, caspase-6, caspase-8, caspase-9, and caspase-10) and Bid in extracts of precounted HeLa cells was determined by SDS-PAGE followed by immunoblotting with suitable specific antibodies. Recombinant proteins

were used, in the indicated quantities, as the index of standardization. (**B**) Estimation of the volume of the cell body and nucleus of HeLa cells. Eight HeLa cells expressing both plasma membrane-bound mRFP1 and nuclear LBR-EGFP were imaged under a confocal microscope.

Protein	Total length (amino acids)	Molecular weight (g)	Number (per cell)
caspase-3	277	31593.8	3.6 x 10 ⁷
caspase-6	293	33309.9	3.2 x 10 ⁶
caspase-8	481	55707.6	2.0 x 10 ⁸
caspase-9	416	46280.8	2.9 x 10 ⁶
caspase-10	522	58977.5	$< 1.4 \text{ x } 10^{6}$
Bid	195	21994.6	9.9 x 10 ⁶

Table 2 The number of caspase and Bid proteins in a single cell.

_	Volume (µm ³)				
Cell number	whole cell	nucleus	cytoplasm		
#1	6,098	1,307	4,791		
#2	9,573	1,090	8,483		
#3	5,149	1,508	3,641		
#4	6,292	1,205	5,087		
#5	6,019	1,154	4,865		
#6	7,849	900	6,949		
#7	6,715	1,053	5,662		
#8	7,374	1,602	5,772		
Mean±SD	6,884±1,371	1,227±235	5,656±1,485		

Table 3 The volume of the whole-cell and nucleus of HeLa cells.

Table 4 The ratio of caspases activating to initiate apoptosis on HeLa cells.

	Cono in a coll	Conc. of activated caspases based by	ratio
Conc. In a cen	mathematical model	Tatio	
caspase-8	58.7 μM	110 nM	0.19%
caspase-3	10.6 µM	190 nM	1.79%

【考察】

第二章では、アポトーシスのシグナルを下流に伝えるために必要な caspase-8 の初期活性の量を求め、全量の約 0.2%が活性すれば十分であることが判明した。シグナルの強さを数値化するためには、数理モデルを使った検証が欠かせないが、数理モデル自身も実験データと整合したものでなければならない。本研究では、カスパーゼカスケードに対する数理モデルを構築し、抑制・増加などカスパーゼカスケードを人為的に操作した結果から求めた実測データとモデルを照合することで実験結果に合致した数理モデルを完成した。このモデルを使って、caspase-8 の初期活性化される値を割り出した。このように、カスパーゼの活性に関する数理モデルと実試験の比較をすることにより、数理モデルによる精度の高い推定を可能にした。

これまでに、カスパーゼの活性化を伴うアポトーシスのシグナル伝達に関する数理モデルは、数多く作られてきた⁶²⁻⁷⁵。しかし、多くが理論のみで作成されていたために、モデルの信頼性については検証されていない。我々の数理モデルは、実測データとその整合性を照合しながら作成したために(Figs.13・16)、その信頼性は高いと考えられた。実際、粒子フィルターによって算定した活性化caspase-8とcaspase-3の量はそれぞれ110 nMと190 nMとなったが、この際の数理モデルによるFRETのratio変動は、実測データとほぼ重なり合った(Fig. 17)。明らかに、今回新たに作成した数理モデルは完成度の高いモデルである。

本研究ではアゴニスティックな抗Fas抗体を培地に加えてHeLa細胞にアポトーシスを 誘導した。つまり、培地に接している細胞表面上のレセプターは全て抗体と反応しうる状 態である。そのためアポトーシスのシグナルは、均一に細胞内に伝わる⁷⁶。しかし、Fasあ るいはTRAILレセプターのようなデスレセプターの本来のリガンドは、膜結合型である。 膜結合型のFasリガンドを発現する細胞が、標的細胞と接触することでリガンドとレセプタ ーが結合し標的細胞にアポトーシスを誘導する。このレセプター・リガンド結合は点と点 の接触であり、局部的な刺激である。局部刺激で活性化するcaspase-8の量は、今回の数理 モデルから求めたcaspase-8の初期の活性化量よりも少ない可能性が考えられる。それでも アポトーシスが誘導されるのは、リガンドとレセプターの結合を維持する機構が働き、ア ポトーシス刺激の入力が持続することで初期活性化量の小ささを補っているのではないか と推測される。

今回、Type 2細胞のHeLa細胞を研究対象に解析を進めたが、リンパ球系細胞のような Type 1細胞においても同様に検証する必要がある。今後Type 1細胞に対する検証が進めば、 Type 1細胞とType 2細胞におけるcaspase-8の初期活性化量の違いの有無など、より正確な アポトーシスのシグナル伝達経路を理解できることが期待される。

また本研究の数理モデルでは、各因子の濃度は細胞内で均一としてモデルを作成したが、 実際は不均一あるいは局所的に存在していることが考えられる。イメージングとゲノム編 集技術等を組み合わせることにより、内在の各タンパク質の細胞内分布を測定することが 可能になれば、不均一性を確かめ、より完成度の高いモデル作成が可能になると考えてい る。

第三章 発生時のアポトーシス解析を目的とした

Xenopus Bid および *Xenopus* caspase-108 の単離、 ならびに SCAT3 発現トランスジェニックカエルの作製

アポトーシスは、発生時に主に器官形成や臓器形成の過程で観察される²¹⁻²³。例えば指 形成時に、指間の部分は細胞死によって細胞が除去されることで指が形成される。ニワト リの場合は哺乳類と同様に指間部分が除去されるが、アヒルの場合は水かきとして残る。 ニワトリの指間部分にカスパーゼの阻害剤を含むビーズを包埋すると、細胞死が抑制され て水かき様の構造が残る⁷⁷。両生類では、変態時期に見られる尾の退行は細胞死を伴うこと は以前より知られている²⁴⁻²⁶。加えて、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の初期発生 の過程においてアポトーシスが起きることも報告されている²⁷⁻²⁹。このような細胞死やア ポトーシスは、哺乳類と同じくアポトーシス実行因子のカスパーゼや Bcl-2 ファミリー分子 が関与している可能性が考えられる。既にアフリカツメガエルでは、caspase-3 を含む幾つ かのカスパーゼが同定されており^{30,78}、その中で caspase-3 と caspase-9 が変態期の退行し ている組織においてその発現が認められることも報告されている[^{32,33}]。本章では、アフリ カツメガエルからアポトーシス実行因子の Bid および xCaspase-8 のパラログである xCaspase-108 を単離し、その機能を解析した。また、caspase-3 のモニター分子 SCAT3 を発現するトランスジェニック (Tg)カエルを作製し、系統化した Tg カエルを使って、変 態時期の caspase-3 の活性を検出できるか検討した。

【方法】

Xenopus laevis及び受精卵、培養細胞

*Xenopus laevis*は浜松生物教材より購入した。*Xenopus*卵の*in vitro* fertilizationは、 Suzukiらの報告に準じた⁷⁹。受精卵は、3%塩酸システインで透明帯を除去し、水で数回洗 浄後のものをmRNAマイクロインジェクション、あるいはRT-PCR分析に用いた。胚のステ ージは、Nieuwkoop & Faber (1967)の方法⁸⁰に則って決定した。野生型マウス、caspase-8 欠損マウス¹⁵、caspase-9欠損マウス⁸¹よりマウス胚性繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF)を樹立した。またヒト胚性腎293細胞 (HEK293 cell)由来のHEK293Fas および HEK293T細胞株を用いた。各々の細胞株は、Fasおよびlarge T抗原をそれぞれ高 発現している。これらの細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) + 10%牛 胎児血清 (FCS)で培養した。

<u>Xenopus Caspase-108およびXenopus Bidの単離</u>

XenopusのDEDドメインを持つ分子、ならびにBid分子の同定のために、Blastソフトウ

エアを用いてNCBIデータベースを検索した。ヒトFADDのDEDドメイン配列をプローブに、 *Xenopus* に限定して検索を行ったところ、2つのESTクローン (GenBank accession nos. BJ063173 and BJ0590094) が同定された。同様に、ヒトBidをプローブに検索したところ、 1つのESTクローン (GenBank accession no. AW641666) が同定された。これらクローン の全塩基配列を、DyeDeoxyterminator Cycle sequencing (Applied Biosystems社)、および DNAシークエンサー (PRISM[™] 310, Applied Biosystems Inc. and LI-COR 4000, LI-COR Biosciences社)で解読した。*Xenopus*およびヒト分子のアミノ酸配列比較には、 CLUSTAL Wソフトウエア ⁸²を用いた。

遺伝子発現用プラスミドの構築及び細胞への遺伝子導入

Xenopus caspase-106 (xCaspase-106)とEGFPの融合タンパク質を哺乳類細胞で発現す るため、PCRで増幅したxCaspase-106 cDNA断片をpEGFP-C1 (BD-Clontech社)に導入し た。 タグ標識xCaspase-108の発現のため、xCaspase-108 cDNA断片にFLAGタグ配列を 付加し、pME18SあるいはpCAGGS^{38,83}に導入した。プロテアーゼ欠損変異である xCaspase-108 (C384S)は、プロテアーゼの活性基である384番目のシステイン残基 (QACQG)をセリンに置換したDNA断片をPCRによって作製し、pCS2に導入した。Xenopus Bid (xBid)のミトコンドリアへの移行を検討するために用いた融合タンパク質xBid-EGFP は、xBid cDNAをpEGFP-N1 (BD-Clontech社)に導入した。xBidの変異体xBid (D52A)は、 カスパーゼ認識配列であるIETDのうち、52残基目のアスパラギン酸"D"をアラニン"A" に変更したものをpEGFP-N1に導入し、融合タンパク質発現プラスミドpxBid (D52A) -EGFPを作製した。EGFPと切断型のxBid (txBid)の融合タンパク質EGFP – txBidの発現に は、xBid cDNAの53番目のアミノ酸残基グリシンよりカルボキシル末端までに相当する DNA断片を pEGFP-C1に導入した。GFPとマウスcaspase-8の融合タンパク質 GFP-mCasp8 cDNA、Flag - マウスFADD cDNA、そしてマウスBcl-XL cDNAは、先行研 究によってpME18Sに導入したものを使用した。これら全てのプラスミドは、 LipofectAMINE PLUS Reagent (Invitrogen社)を用いてヒト培養細胞に遺伝子導入した。

<u>トランスジェニック (Tg)カエル作製およびそのコンストラクト作製</u>

SCAT3をカエルで発現させるために用いたプラスミドコンストラクトは、pCAGGSベク ターにSCAT3を導入して作製した。SCAT3を発現するトランスジェニック(Tg)カエルは、 REMI法と呼ばれたKrollとAmayaらによって開発された方法を用いた⁸⁴⁻⁸⁶。ファウンダー や子孫がTgカエルであることは、全身での蛍光の発現の有無によって判定した。また、初 期胚の観察を行う際も蛍光によって確認した。本研究では、F1世代のメスの卵を用いた。

培養細胞におけるxCaspase-108とxBidのアポトーシス誘導能

培養細胞に、EGFP-xCaspase-108あるいはEGFP-txBidを単独で、あるいはtxBidや

マウスBcl-XL発現プラスミドと共にリポフェクションによって導入した。一部の細胞につ いては、カスパーゼの阻害剤であるcarbobenzoyl – Val – Ala – Asp – fluoromethylketone (z-VADfmk) (Kamiya Biomedical社)を培地に100 µMの濃度で添加した。導入24時間後に 3.7%ホルマリンで固定し、蛍光顕微鏡 (DMIRE2, Leica Microsystems社)でEGFP陽性細 胞の画像を撮影した。同様に、Caspase-8欠損マウスならびにcaspase-9欠損マウス由来 MEFにEGFP – txBidを導入し、24時間培養後に顕微鏡観察した。プロテアーゼ不活性型の xCaspase-108 (C384S)変異体は、pEGFP-C1と共にHeLa細胞に導入し、24時間培養後に抗 Fas抗体CH-11 (MBL社)を200 ng/mL、シクロへキシミド (CHX)を5 µg/mL添加してアポ トーシス誘導を始めた後、継続して8時間培養した。同様にBcl-XLの抗アポトーシス効果に ついて、Bcl-XLとpEGFP-C1をHeLa細胞に共導入し、200 ng/mLのCH-11と5 µg/mLの CHXを添加し24時間さらに培養した。

<u>xBidの細胞内局在</u>

HeLa細胞にpDsRed2-Mito (BD-Clontech社)とpxBid – EGFPないしはpxBid (D52A) – EGFPを共導入し、200 ng/mLのCH-11と5 µg/mLのCHXを添加してアポトーシスを誘導し た。xBidの局在確認は共焦点顕微鏡 (TCS SP2, Leica Microsystems社)を用いた。

<u>リコンビナントxCaspase-108の作製、in vitroプロテアーゼ活性</u>

xCaspase-108およびxCaspase-8の組換えタンパク質を合成するために、両分子のcDNA をpMAL-c2Eベクター (New England Biolabs社)に導入した。ネガティブコントロールと して、xCaspase-106のlarge subunitのみからなるxCaspase-106 (p21)を作製した。このタ ンパク質は、small subunitを欠くためにプロテアーゼ活性を有しない。これらのプラスミ ドを、大腸菌Rosetta (DE3) (Novagen社)に形質転換し、IPTG誘導によりマルトース結合 タンパク質との融合タンパク質を発現させた。このタンパク質をアミロースレジン (New England Biolabs社)を用いて精製した。プロテアーゼ活性の検出には、蛍光基質となる $acetyl - Ile - Glu - Thr - Asp - \alpha - (4 - ethylcoumaryl - 7 - amide)$ (Ac-IETD-MCA) (Peptide Institute社)を使い、1 µg のリコンビナントタンパク質を200 µLのプロテアーゼ アッセイバッファー [50 mM PIPES (pH 7.2), 10% sucrose, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, and 10 mM dithiothreitol]中で37 °Cで反応させた。プロテアーゼにより基 質が切断されると7 – amino – 4 – methylcoumarin (AMC)が遊離するので、この量をプレ ートリーダー (ARVO-SX, PerkinElmer Life Science社)で、励起波長355nm、蛍光波長 460nmで測定した。全ての試験は、実験回数 n=3で行った。MBP修飾に対する影響を懸念 し、xCaspase-108の両末端にHisタグを付加したxCaspase-108-Hisも同様に作製し、 nickel-NTAレジン (Qiagen社)にて精製した。xCaspase-108によるxBidの切断について確 認するため、xBid – EGFPおよびxBid (D52A) – EGFPを無細胞系にて作製した³⁹。pEUベ クターのSP6プロモーターを用いてxBid – EGFPおよびxBid (D52A) – EGFPのmRNAを

作製し、小麦胚芽抽出物を用いて*in vitro*でタンパク質合成を行った。xBid – EGFPおよび xBid (D52A) – EGFPに対するxCaspase-108の切断活性は、プロテアーゼアッセイバッファ ー中、z-VAD-fmk存在下、あるいは非存在下で37 °C、3時間反応することにより調べた。 活性の有無は、反応溶液をSDS-PAGEで電気泳動し、イメージングアナライザー (LAS-3000, FUJIFILM社)を用いて、EGFPの蛍光が見られるペプチドの大きさから判定し た。

イムノブロッティングおよび免疫沈降

アポトーシス刺激によるxBidの切断を調べるため、xBidおよびxBid (D52A)を HEK293Fas細胞に導入し、2日後に200 ng/mLのCH-11と5 µg/mLのCHXを添加してアポ トーシスを誘導した。6時間後に細胞を回収し、lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100, and 0.5% sodium deoxycholate]で溶解した。こ の細胞抽出液をSDS-PAGEで分離した後、抗GFP抗体 (1E4、MBL社)を使ってイムノブロ ッティングを行った。

xCaspase-108と*Xenopus*およびマウスアポトーシス関連因子の相互作用を調べるため、 HEK293T細胞にEGFP – xCaspase-108あるいはGFP – mouse caspase-8発現プラスミド とFlag – xFADD ないしはFlag – mouse FADD発現プラスミドを遺伝子導入した。24時間 培養後、細胞を回収しlysis bufferで溶解し、抗Flag抗体 (M2、Sigma Chemicals社)と Protein-A Sepharose (Amersham Biosciences社)を用いてタンパクを免疫沈降した。得ら れたタンパク質は、SDS-PAGE後抗Flag抗体および抗GFP抗体を用いてイムノブロッティ ングを行った。

xCaspase-108のホモ二量体化、xCaspase-108とxCaspase-10あるいはxCaspase-8のヘ テロ二量体化を調べるため、HEK293T細胞にEGFP – xCaspase-108発現プラスミドとFlag – xCaspase-108、Myc – xCaspase-10⁸⁶、HA – xCaspase-8⁸⁶の発現プラスミドを共導入し た。24時間培養後細胞をlysis bufferで溶解し、抗GFP抗体で免疫沈降した。得られた免疫 沈降物は、SDS-PAGE後、抗GFP抗体、抗Flag抗体、抗Myc抗体 (9E10)、そして抗HA抗 体 (ab-hatag、InvivoGen社)で検出した。免疫沈降のイムノブロッティングの2次抗体には、 マウスIgG TrueBlot[™] (eBioscience社)、あるいは HRP-標識 抗マウス IgG抗体 (Cell Signaling Technology社)を用いた。また、免疫沈降に用いた遺伝子導入細胞のアポトーシ スを阻害するため、カスパーゼ-インヒビターであるバキュロウイルスp35遺伝子⁸⁷発現プラ スミドを遺伝子導入した。

<u>RT – PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)解析</u>

アフリカツメガエルの様々な発生段階の胚、および成体組織よりISOGEN reagent (Nippongene社)を用いてRNAを回収した。各RNA 1µg よりReady-To-Go RT-PCR beads (Amersham Biosciences社)およびランダムへキサマープライマーを用いてcDNA合成を行 った。このcDNAより各遺伝子をPCR増幅した。用いたプライマーは、 xCaspase-108およびxCaspase-10 (forward:5'-CAAGACCTTTCTGGATGTGTGTG-3', reverse: 5'-TTTGCTTGAAACCTGGATGGAG-3'), xCaspase-8 (forward: 5'-CGCTTCTATACTGGAAATATTCTT-3', reverse: 5'-TTGTACTGAAATCTTCTCAAAT-3'),

xBid (forward: 5'-GGAAACGTCCAATTAAGATCT-3',

reverse: 5'-CCTCTGTCTGGCGAGACGCTC-3')である。

ポジティブコントロールとして、EF1a (forward: 5'-CAGATTGGTGCTGGATATGC-3', reverse: 5'-ACTGCCTTGATGACTCCTAG-3')とオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) (forward: 5'-CAGCTAGCTGTGGTGTGG-3',

reverse: 5'-CAACATGGAAACTCACACC-3')を用いた。PCR産物は、2.5%アガロースゲル を用いて分離・検出した。

xCaspase-108およびtxBidのカエル胚へのマイクロインジェクション

xCaspase-108のプロテアーゼ活性変異体xCaspase-108 (C384S)および活性型のtxBidの mRNAは、pCSII-xCaspase-108 (C384S)ならびにpCSII-txBidのプラスミドをテンプレー トにmMESSAGE mMACHINE SP6 kit (Ambion社)を用いて作製し、Sephadex G-50 column (Amersham Biosciences社)を用いて精製した。このmRNAを*Xenopus* 4割球胚の背 部2細胞、腹部2細胞に20、50、200 pgマイクロインジェクションした。遺伝子を導入した 胚は3% Ficoll含有0.1 x Steinberg's solution⁸⁸で培養した。

SCAT3-Tgカエルを用いた蛍光タンパク質の解析

SCAT3を発現する4割球胚にtxBid mRNAを導入し、胚発生を進めた後、胚をprotease inhibitor cocktail (ナカライテスク社) 含有lysis bufferにて溶解し、遠心した。この抽出物 を熱変性せずにSDS-PAGEを行い、イメージングアナライザー (Typhoon 9410, Amersham Biosciences社)にてECFPとVenusの蛍光を検出した。検出後、ゲルをクマシー

ブリリアントブルーR250にて染色した。

尾のSCAT3の蛍光観察には、stage 63の変態時期に入ったオタマジャクシを、0.02%濃度のm-アミノ安息香酸エチルメタンスルホナートを含む飼育水中で20分間麻酔した後、蛍光顕微鏡 (DMIRE2, Leica Microsystems社)を用いた。FRETの蛍光比の求め方は、前章の方法に従った。

【結果】

<u>xCaspase-108の単離</u>

Caspase-10に特徴的なDED領域を含むタンパク質を、NCBIのESTデータベース上で検索し、Xenopusの尾由来cDNAライブラリーより、ヒトcaspase-10と相同性の高いクローン を1つ特定した。このクローンのcDNA領域を解読した結果、このcDNAがコードするタン パク質は512アミノ酸を有し、既に単離されていたXenopus caspase-10とアミノ酸で84%、 Xenopus caspase-8と32%の相同性を有した(Fig. 19A,B)。このタンパク質は、既知の Xenopus caspase-10の選択的スプライシングの産物である可能性と、別の遺伝子に由来す るパラログな分子である可能性が考えられた。Xenopus laevisは、4倍体からなる動物であ ることから(考察に記載)、後者である可能性が高かった。そのことを証明するために、 Xenopus caspase-10との発現の違いに着目した。それぞれを識別できるオリゴDNAをプラ イマーセットとして、様々な発生段階の胚、あるいは成体の臓器より調整した全RNAを鋳 型に用いて、RT-PCRを行ったところ、発生が進むに従ってXenopus caspase-10とは別の新規遺 伝子であり、caspase-108と命名した。 (A)

Casp10β	MDFNSMLL <mark>S</mark> IDDGLGREDIEALKFLCRDVLRKNKLLSVR <mark>SGQ</mark> ELFQQ	47
Casp10	MDFNSMLL <mark>R</mark> IDDGLGREDIEALKFLCRDVLRKNKLLSV <mark>Q</mark> SG <mark>H</mark> ELFQQ	47
Casp8	MSDLLSSTVDAMNLADM <mark>N</mark> KLLFEISEDLDKTETLAMIFLCEKRVTADEKENIKDAKTLELC	61
	•	
Casp10β	LKTEDLISEDDFFLLAELLYIINHHSLLR-DLGTNKENVQKDLPHQGKISSYRRMLYELSE	107
Casp10	LMTEDLINEDNYFILGELLYIINHHSLLH-DLGTNKVEVQKALPHHWKISPYRQMLYELSE	107
Casp8	LKKKDLICYNDLSFLK <mark>ELLY</mark> RIGRNDLLRGKLGVRTEEIKRIIEVSPQISPYRILLYDISQ	122
Casp10β	NVTGDEKRILFLLPFQKKHKENKTFLDVLCQLEKENSITEDNVGLLEDIFKKVS-PDLLK	167
Casp10	NVTGEDEKRILFILP <mark>LH</mark> KKHKENKTFLDVLCQLEKENA <mark>ITEDNV</mark> KLLEEVFRKVS-PDLLK	167
Casp8	GLSKKEVEDIKY <mark>ni</mark> dlstakt <mark>en</mark> asi lei fle dek vGkihpDdlok <mark>i</mark> khdletigckn i sk	183

Casp10β	IIEKYKER <mark>ENN-L</mark> QPSAPPEYEHELINPPLSIQVSSKNNESWNEETEDLIEHI	219
Casp10	IIEKYKERGDK-LHRPE <mark>IGLMQPSAPPDYEHELINP</mark> HLSIQVSSKDNESWDEGIESLIEHN	227
Casp8	NTEDYERISEADNHRPENLEDIFEKISVQEEQVNCTAQEPFNGEQ	228
Casp10β	GTIHEEAEKEDDKSGNIDNQLSDLRLNPEITPQASLKMELYDMNRKHRGYCLIIDNYIFAK	280
Casp10	GTILGEAEKEDDESGNIDHQLSDLRLNSEVTPQASLOMELYHMNHKHRGYCLIIDNSIFMK	288
Casp8	RTPQPETESDYCQPQQHSHMNLDTYHLEKNPHGWCVVTNNYDEKE	273
Casp10β	GKRREGSDKDAGALRDVFKWLGLDVEIVENLGSEEIRDRIKKFKSKDHSERDCF	334
Casp10	GKRREGSDKDAGALSDVFSWLGLEVEIVKNLGTEQIRGCLKRFKSKDHSERDCF	342
Casp8	ARSQDCKYTD <mark>REC</mark> IA <u>KDA</u> EEITRIFNARGYITBEHRDUTAANIOKTLEMYSK <mark>KDH</mark> AEKDSE	334
Casp10β	VCCILTHGESGTV <mark>I</mark> GSDDEEVSIREIMSYFTPTSCISLALKPKLFFIQACQGRYTHPSSKV	395
Casp10	VCCILTHGESGTVMGSDDKEVSIREVMSYFTATSCISLTLKPKLFFIQACQGIYTHPSSKV	403
Casp8	VCFILSHGGVGTVCGCDGEEVEIKRLTKYENGQHCRSLINKPKIFFIQACQGKESHPKVDM	395
Casp10β	EADATVPVEHKKYIVNVPKEADFLLGMSTVDGY <mark>F</mark> AYRHR <mark>TE</mark> GSWYIQALCKNLVEMVPRGE	456
Casp10	EPDASVPVEHKKYIVNVPKEADFLLGMSTVDGYAAYRHKKYGSWYIQALCKNLVEMVPRGE	464
Casp8	DMDTSE-YEPDANGSHLPLEADFLTAFATVEDYTSLRHRENGSIYIQQLCKALTTYTNQ	453
Casp10β	DILSILTKVNKDVSLKEDSEGILKQMPQPSYTLLKKLIFPVPNVPFKPNICQENSP	512
Casp10	DILSILTKVNKDVSLKEDSEQKLKQMPQPAYTLLKKLIFPVPDVPFRSTTCQENSP	520
Casp8	DLIDIITSVNSDVANMLFRLWRKNVTQMPSFKSEIRKKLILPPNAM	500
(B)		

	xCaspase-10β	xCaspase-10	xCaspase-8	hCaspase-10	hCaspase-8
xCaspase-10β	-	84	32	43	33
xCaspase-10		-	30	40	33
xCaspase-8			-	32	32
hCaspase-10				-	33
hCaspase-8					-

Figure 19 Alignments of xCaspase-108 with their homologs.

(A) Amino acid sequence comparison of xCaspase-108, xCaspase-10, and xCaspase-8. The predicted amino acid sequence of *Xenopus* caspase-108 cDNA clone db61b04 was aligned with caspase-10 and caspase-8 from *Xenopus*. Amino acids that are identical or similar between the three molecules are indicated in black and shaded boxes,

respectively. Two DED motifs are underlined and the protease domain is indicated by a box. Asterisks (*) indicate the amino acids deleted in caspase-106, but not caspase-10. The bold arrows underneath the amino acid sequence indicate the primers used for RT-PCR analysis. (**B**) Comparison of homologies between *Xenopus* and human initiator caspases. The numbers indicate the percentage identity between the two molecules.

HeLa細胞を用いたXenopus caspase-106の細胞死誘導能

Xenopusでは、xCaspase-8とxCaspase-10の2つのイニシエーターカスパーゼが同定され ている78。これらの分子は、遺伝子導入により哺乳類細胞がアポトーシスを起こし、哺乳類 のホモログと同等の機能を有していた⁸⁶。xCaspase-108も同様の機能を持つことを調べる ため、遺伝子導入によって哺乳類の細胞がアポトーシスを起こすか確認した。この目的の ため、EGFPとxCaspase-106の融合タンパク質EGFP-xCaspase-106 cDNA (Fig. 20A)を 作製し、HeLa細胞にこの発現プラスミドを導入した。遺伝子が導入された細胞の識別およ び生存の有無は、蛍光顕微鏡下でEGFP陽性細胞を観察することで判定した。 EGFP-xCaspase-106を導入したHeLa細胞は、明らかにEGFP陽性細胞数がコントロールの EGFP導入HeLa細胞に比べ減少していたことから、EGFP-xCaspase-108が発現することに より細胞死が起きていたことを示す (Fig. 20B,C)。しかし、カスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmkを添加すると、EGFP陽性細胞数が増加し、細胞形態も正常に戻った(Fig. 20D)。 このことは、z-VAD-fmk添加によりxCaspase-108によるアポトーシスが阻害されたことを 示す。また、z-VAD-fmkを添加したHeLa細胞を詳しく観察すると、デスエフェクターフィ ラメント89と呼ばれる凝集体と同じ構造体がEGFP-xCaspase-108でも見られた (Fig. 20E)。 デスエフェクタードメイン (DED)を持つタンパク質同様、xCaspase-108もDEDを介して 多量体化することで活性化してアポトーシスを誘導することが考えられた。

これらのことより、xCaspase-106は哺乳類の細胞に対しても細胞死誘導能があることが 分かった。



Figure 20 Over-expression of xCaspase-106 induces apoptosis in mammalian cells.

(A) Constructs termed EGFP-xCaspase106 encode fusions of EGFP and caspase-106. (B-E) HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding EGFP alone (B), GFP-xCasp106 (C-E). Transfected cells were cultured in the presence or absence of 100 μ M z-VAD-fmk (D,E). After 24 h of culture, cells were washed and fixed. A single field was then photographed by phase contrast (right panels) and fluorescence (left panels) microscopy. The arrowheads in (C) indicate apoptotic bodies, while the dotted line in (E) indicates the edge of the magnified cell.

In vitro におけるxCaspase-10Bのプロテアーゼ活性の検証

xCaspase-108のプロテアーゼ活性について調べるため、リコンビナントの xCaspase-108とxCaspase-8を作製し、大腸菌から精製した。蛍光基質を用いた*in vitro*アッ セイにより、リコンビナントxCaspase-108は、xCaspase-8と同じプロテアーゼ活性を示す ことが分かった (Fig. 22A)。一方、xCaspase-108のlarge subunit領域のみから成るリコン ビナントは基質を切断しなかった。

ヒトCaspase-10がBidを切断する能力があるという報告がある ⁹⁰。本研究においてもリ コンビナントのxCaspase-108とxBidを用いてxCaspase-108がBidを切断するか検討した。 リコンビナントxBid – EGFP、およびxBid (D52A) – EGFPを無細胞タンパク質合成システ ム³⁹を用いて合成し、*in vitro*の系でxCaspase-108と反応した。その結果、Fig. 22Bに示す ように、xCaspase-108はxBidを切断するが、変異体は切断できなかった。この際、カスパ ーゼ阻害剤z-VAD-fmkを添加することでxCaspase-108のプロテアーゼ活性は阻害された。 これら*in vitro*の解析結果より、xCaspase-108はプロテアーゼ活性がありxBidを認識し切断 することが分かった。





(A) The protease activities of the following recombinant proteins fused to MBP at the N-terminus: the xCaspase-10 protease domain (xCasp106), the large catalytically inactive subunit of xCaspase-106 (xCasp106(p21)), and the xCaspase-8 protease domain

(xCasp8) were examined. The fluorescence of AMC released from a synthetic caspase substrate, Ac-IETD-MCA, was measured at the indicated times at 37 °C. The resultant data are presented as arbitrary units (AU). These data are representative of two experiments performed in triplicate. (**B**) The protease activity of recombinant xCaspase-106 against xBid was examined. Active xCaspase-106 (xCasp106-His), tagged with a His-tag sequence at both the N- and C-termini of the protease domain, was purified from *E. coli*. Both the xBid-EGFP and xBid(D52A)-EGFP fusion proteins were synthesized by *in vitro* translation. After incubation of xBid-EGFP or xBid(D52A)-EGFP with or without active xCasp106-His in the presence or absence of z-VAD-fmk, the reaction mixture was resolved by SDS-PAGE and the processing profile analyzed using an image analyzer. FITC-labeled molecular weight markers were applied at left side lane.

<u>xCaspase-108と、DEDドメインもつXenopusないしはマウス分子との結合</u>

先行研究により、*Xenopus* caspase-10がFADDと結合することを報告した⁸⁶。同様に、 xCaspase-108が*Xenopus*やマウスのFADDとそれぞれ結合するか検討した。共発現した HEK293細胞溶解液を用いたFADDの免疫沈降により、xCaspase-108がマウス caspase-8 と同じように*Xenopus* FADD、あるいはマウスFADDとの複合体として一緒に沈降すること が検出された (Fig. 22A)。さらにDEDドメインを介してxCaspase-108がxCaspase-108と ホモ二量体化するのか、xCaspase-8やxCaspase-10とヘテロ二量体化するのかを検討した ところ、xCaspase-108はxCaspase-108と、またxCaspase-8やxCaspase-10とも結合してい ることが分かった (Fig. 22B)。これらのことより、xCaspase-108はDEDドメインを通じて、 アダプター分子のFADDだけでなく、他のイニシエーターカスパーゼとも結合できることが 明らかになった。



Figure 22 xCaspase-106 interacts with Xenopus FADD, caspase-8 and caspase-10.
(A) HEK293T cells were co-transfected with plasmids either EGFP-xCaspase106, GFP-mouse caspase-8, Flag-xFADD, Flag-mouse FADD, or control vector. After 24 h of

transfection, cells were lyzed. Proteins were then immunoprecipitated from cell lysates with an anti-Flag antibody. Whole cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-Flag and anti-GFP antibodies. (**B**) HEK293T cells were co-transfected with plasmids either EGFP-xCaspase-108, FlagxCaspase-108, HA-xCaspase-8, Myc-xCaspase-10, or control vector. After 24 h of transfection, cells were lyzed. Proteins were immunoprecipitated from cell lysates with an anti-GFP antibody. Whole cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-Flag, anti-HA, anti-Myc, and anti-GFP antibodies. To prevent apoptosis, we introduced the baculovirus p35 gene, a strong caspase inhibitor⁸⁷, into all samples.

<u>xBidの単離</u>

Xenopus Bid に関しては、*Xenopus* 卵 cDNA ライブラリーを探索することによって 1 つの候補となる cDNA クローンを同定した。解読の結果、この cDNA クローンは、184 ア ミノ酸をコードし、ヒト Bid と 36%の相同性を示した (Fig. 23)。またアミノ酸配列を調べ ると、caspase-8/caspase-10 によって認識・切断される配列"LETD"を認めた (Fig. 23, shown by asterisks)。これらの特徴から、この分子は哺乳類 Bid の *Xenopus* ホモログであ ると断定し、xBid とした。



Figure 23 Alignments of xBid with their homologs.

Amino acid sequence comparison of *Xenopus* and human Bid molecules. Amino acids that are identical or similar between *Xenopus* and human molecules were indicated in black and shaded boxes, respectively. The bold lines over the amino acid sequence indicate the BH3 domain, while the caspase recognition sequence is designated by asterisks.

HeLa細胞を用いたBidの細胞死誘導能

哺乳類のBidはアポトーシス誘導能を持つ5%。xBidも同様の機能を持つことを調べるため、 遺伝子導入によって哺乳類の細胞がアポトーシスを起こすか確認した。EGFPとxBidのN末 端57アミノ酸を欠失したtruncated xBid (txBid)の融合タンパク質を発現するコンストラク トEGFP-txBidを作製した (Fig. 24A)。哺乳類のBidの場合、カスパーゼにより切断されて、 後半のペプチド断片がミトコンドリアに移行することで内因性のアポトーシスの経路を活 性化することが知られている56。今回カスパーゼによって切断された型として、予め前半部 分を欠いたtxBidをデザインした。このEGFP-txBidが細胞死誘導能を示すか、ヒト培養細 胞に導入して確認した。z-VAD-fmkを加えると、EGFP陽性細胞の減少が抑制されていた ことから、xCaspase-106と同様にtxBidはアポトーシスを誘導していることが明らかになっ た(Fig. 24B, C)。このことより、txBidを導入するとカスパーゼ依存的な作用で細胞死を誘 導することが推測された。txBidがミトコンドリア経路を惹起して細胞死を誘導しているこ とを確認するため、BidのようなBH3分子に対する抗アポトーシス分子として知られている Bcl-2ファミリー分子のBcl-XLを共発現して、txBidの効果を調べた。マウスBcl-XL発現ベ クターをEGFP-txBidと同時に細胞に導入したところ、EGFP陽性細胞は認められたがその 細胞数は少数であったことから、マウスBcl-XLは部分的にtxBidの細胞死誘導能を阻害する ことが分かった (Fig. 24D)。一方Bcl-XLは、抗Fas抗体で刺激したHeLe細胞においてEGFP 陽性細胞を大幅に復活させたことから(Fig. 24H)、txBidは強力なアポトーシス誘導分子で あることが推察された。さらにtxBidのアポトーシスシグナル経路の検証のため、caspase-8 欠損マウス胚性繊維芽細胞 (MEFs)およびcaspase-9欠損マウス胚性繊維芽細胞 ^{15,81}に EGFP-txBidのコンストラクトを導入したところ、caspase-8欠損MEFに対しては細胞死を 誘導するが、caspase-9欠損MEFでは細胞死が起きなかった(Fig. 20E,F)。txBidのアポト ーシス誘導にはcaspase-9が必要であることが確認された。

これらのことより、xBidは哺乳類の細胞に対しても細胞死誘導能があること、txBidの 細胞死誘導能はミトコンドリア経路を惹起していることが分かった。





(A) Constructs EGFP-txBid encode fusions of EGFP and truncated xBid. EGFP fusions of full-length wild-type and mutant xBid were named xBid-EGFP and xBid(D52A)-EGFP, respectively. (**B**-**H**) HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding EGFP-txBid (B-D) with mouse Bcl-XL (D). Transfected cells were cultured in the presence or absence of 100 μ M z-VAD-fmk (C). Mouse embryonic fibroblasts (MEF) deficient in caspase-8 (E) or caspase-9 (F) were also transfected with a plasmid encoding EGFP-txBid. After 24 h of culture, cells were washed and fixed. A single field was then photographed by phase contrast (right panels) and fluorescence (left panels) microscopy. (**G**, **H**) HeLa cells transfected with a plasmid encoding control EGFP together in

conjunction without (G) or with mBcl-XL (H) were treated with an anti-Fas antibody in the presence of CHX for 24 h. After fixation, cells were photographed by both phase contrast and fluorescence microscopy.

アポトーシスにおけるxBidのミトコンドリアへの移動

哺乳類のBidは、活性化caspase-8によって切断され、切断型Bidはミトコンドリアに移 行する⁵⁶。Xenopus Bidのミトコンドリアへの移行を確認するため、全長のxBidのC末端側 にEGFPを融合したタンパク質xBid-EGFPを発現するプラスミドを作製した (Fig. 24A)。 このプラスミドをpDsRes2-Mitoと共にHeLa細胞に導入し、Fasを活性化する抗体のCH11 を加えてアポトーシスを誘導したところ、EGFPの蛍光がミトコンドリアに局在している赤 色蛍光のDsRedと一致したことから、xBid-EGFPはミトコンドリアへと移行していること が判明した (Fig. 25B)。また、カスパーゼ認識配列LETDをLETAに置換したxBid変異体の xBid (D52A)、およびEGFPとの融合タンパク質xBid (D52A)-EGFPを発現するプラスミド を作製した (Fig. 24A)。xBid (D52A) – EGFPを発現する細胞では、Fas刺激アポトーシス を誘導してもxBid (D52A)-EGFPのミトコンドリアへの移行は見られなかった (Fig. 25C)。 哺乳類のBidと同じく、xBidについても切断されたペプチド断片がミトコンドリアへと移行 することを証明するため、イムノブロッティングを行った (Fig. 25D)。その結果、抗Fas 抗体でアポトーシスを誘導した細胞において、xBid - EGFPは切断されていたが、xBid (D52A) – EGFPは切断型が確認されなかった (Fig. 25D)。このように、xBidはアポトーシ ス惹起時に切断され、切断型であるtxBidはミトコンドリアへと移行し、内因性のアポトー シスを誘導することが明らかとなった。



Figure 25 xBid processing and translocation to the mitochondria following apoptotic stimuli.

(A-C) HeLa cells expressing xBid – EGFP (A, B) or xBid (D52A) – EGFP (C), stained with DsRed2 – Mito, were stimulated without (A) or with an anti-Fas antibody and CHX (B, C) for 2 h. Both EGFP and DsRed fluorescence images were examined by confocal microscopy. Scale bars indicate 8 µm (A) and 4 µm (B, C), respectively. (D) HEK293Fas cells untransfected or transfected with xBid-EGFP or mutant xBid (D52A) – EGFP were incubated in the absence or presence of anti-Fas antibody for 6 h. Cell lysates were then analyzed by immunoblotting with an anti-GFP antibody. The sizes of molecular weight standards are shown at the left side.

In vitro におけるxCaspase-108のプロテアーゼ活性の検証

xCaspase-108のプロテアーゼ活性について調べるため、リコンビナントの xCaspase-108とxCaspase-8を作製し、大腸菌から精製した。蛍光基質を用いた*in vitro*アッ セイにより、リコンビナントxCaspase-108は、xCaspase-8と同じプロテアーゼ活性を示す ことが分かった (Fig. 26A)。一方、xCaspase-108のlarge subunit領域のみから成るリコン ビナントは基質を切断しなかった。

ヒトCaspase-10がBidを切断する能力があるという報告がある ⁹⁰。本研究においてもリ コンビナントのxCaspase-106とxBidを用いてxCaspase-106がBidを切断するか検討した。 リコンビナントxBid – EGFP、およびxBid (D52A) – EGFPを無細胞タンパク質合成システ ム³⁹を用いて合成し、*in vitro*の系でxCaspase-106と反応した。その結果、Fig. 26Bに示す ように、xCaspase-106はxBidを切断するが、変異体は切断できなかった。この際、カスパ ーゼ阻害剤z-VAD-fmkを添加することでxCaspase-106のプロテアーゼ活性は阻害された。 これら*in vitro*の解析結果より、xCaspase-106はプロテアーゼ活性がありxBidを認識し切断 することが分かった。





(A) The protease activities of the following recombinant proteins fused to MBP at the N-terminus: the xCaspase-10 protease domain (xCasp106), the large catalytically inactive subunit of xCaspase-106 (xCasp106(p21)), and the xCaspase-8 protease domain (xCasp8) were examined. The fluorescence of AMC released from a synthetic caspase substrate, Ac-IETD-MCA, was measured at the indicated times at 37 °C. The resultant data are presented as arbitrary units (AU). These data are representative of two experiments performed in triplicate. (B) The protease activity of recombinant xCaspase-106 against xBid was examined. Active xCaspase-106 (xCasp106-His), tagged with a His-tag sequence at both the N- and C-termini of the protease domain, was purified from *E. coli*. Both the xBid-EGFP and xBid(D52A)-EGFP fusion proteins were synthesized by *in vitro* translation. After incubation of xBid-EGFP or xBid(D52A)-EGFP with or without active xCasp106-His in the presence or absence of z-VAD-fmk,

the reaction mixture was resolved by SDS-PAGE and the processing profile analyzed using an image analyzer. FITC-labeled molecular weight markers were applied at left side lane.

<u>Xenopus</u>胚および成体組織におけるxCaspase-108とxBid mRNAの発現

同定したxCaspase-108およびxBidの発生時および成体組織での発現をRT-PCRで確認 した。xCaspase-106の発現をxCaspase-10と比較するため、この二つを見分けることが出 来るPCRプライマーを設計した。組織での発現を確認したところ、xCaspase-108と xCaspase-10の両者は、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、脾臓で発現が認められた(Fig. 27A)。 一方、胚発生での発現を確認したところ、xCaspase-10は初期のstage 1-20にて発現が見ら れたのに対し、xCaspase-108は胚自身の遺伝子発現が活性化するstage 15/16以降で発現が あり、違いが認められた(Fig. 27B)。これは、xCaspase-8と同じ発現パターンであった。 このように、xCaspase-106とxCaspase-10は発生時には異なった発現パターンを示した。 一方でxBidは、発現量に違いが認められるものの、全ての組織や様々な発生段階にて発現 が確認された(Fig. 27A, B)。



Figure 27 Expression profiles of xCaspase-106 and xBid in adult tissues and during early embryogenesis.

(A, B) Total RNAs isolated from the brain, heart, kidney, liver, lung, muscles, and spleen of adult frogs (A) and from embryos at stages 1, 8.5/9, 10.25, 11/12, 15/16, 20, 25, and 32 (B) were subjected to RTPCR analysis of xCaspase-106, xCaspase-10, xCaspase-8, and xBid transcript expression. The resulting PCR products were resolved by 2.5% agarose gel electrophoresis. As an internal control, $EF1\alpha$ (A) and ornithine decarboxylase (ODC) (B) transcripts were examined. Molecular weight markers (M.W.M.) were applied in lane 1 of both panels.

xCaspase-10Bの胚発生での役割

xCaspase-108の胚発生時の役割について検討するために、xCaspase-108のプロテアー ゼ欠損変異体のmRNAを胚に導入した。予備的に、xCaspase-108 (C384S)をHeLa細胞で 発現させたところ、ドミナントネガティブ分子として内在のヒトカスパーゼに対して抑制 的に働き、Fas刺激を行ってもアポトーシスが誘導されないことが確認された (Fig. 28A)。

次に4割球のXenopus胚に、xCaspase-108 (C384S)のmRNAを導入し、stage 45まで発 生が進んだ時点で胚を観察した。4割球胚の背部2細胞にmRNAを導入すると、コントロー ルに比べ胴が短くなり (Fig. 28B,a,c)、いくつかの胚で浮腫を認めた (Fig. 28B,a,c, shown by arrow)。腹部の2細胞にmRNAを導入すると、腹部が未発達な胚が見られた (Fig. 28B,d,e, shown by arrowheads)。このような表現型はmRNA量に依存的であり、コントロール mRNAを導入した際には検出されなかった (未発表)。これらのことより、プロテアーゼ欠 損型xCaspase-108をXenopus初期胚に導入すると、高頻度で発生異常を誘発していること から、内在のxCaspase-108の機能を抑制していることが考えられた。明らかに xCaspase-108は、Xenopus初期胚発生に関与している可能性が高い。



Figure 28 A protease-deficient xCaspase- 108 causes the irregular development of Xenopus embryos.

(A) Anti-apoptotic assay of an xCaspase-106 mutant. HeLa cells were transfected with pCSII-xCaspase- 106(C384S) (panels c and d) or control vector (panels a and b) together with pEGFP-C1, cultured for 24 h and treated with (lower panels) or without (upper panels) 200 ng/mL of anti-Fas antibody CH11 and 5 µg/mL of CHX for 8 h. Viable cells were detected as EGFP-positive cells under the fluorescent microscope. (B) Morphological analysis of embryos expressing an xCaspase-106 mutant. Wild-type embryos were injected without (a) or with 20 pg (panels b and d) or 200 pg (panels c and e) mRNA encoding a protease-deficient form of xCaspase-106, xCaspase-106(C384S), at

the equatorial area of two dorsal (panels b and c) or two ventral (panels d and e) blastomeres at the four-cell-stage. Images of the developing embryos were acquired at stage 45. The arrows and arrowheads indicate the edema and the abdominal constriction of the dorsally and ventrally injected embryos, respectively. Scale bars indicate 2 mm. (C) A summary of the data in (B) is presented. The numbers of embryos displaying short trunk shape, edema, or abdominal constriction were counted under the microscope. Data represent the percentages calculated from duplicate experiments. Abbreviations: D, dorsal; V, ventral.

SCAT3発現Tgカエルの作製

胚発生過程において、カスパーゼの活性化を伴うアポトーシスを検出するために、カス パーゼ3の活性をモニターできるSCAT3を発現するTgカエルを作ることを試みた。 pCAG-SCAT3 (Fig. 30A)を、REMI法に従ってBamHIで切断して直鎖にした後、精子核と 一緒に未受精卵に導入した。その後、オタマジャクシまで発生した個体群の中から、全身 で蛍光を発する個体を蛍光顕微鏡下で選別して、カエルに変態するまで飼育を続けた。そ の結果、ファウンダーとして6匹のTgカエルを樹立し、さらに野生型のカエルと交配するこ とにより、F1世代として58匹のTgカエルを作出した (Fig. 30B)。

切断型xBid のXenopus胚発生におけるアポトーシス誘導能

強制発現したxBidがXenopus胚においてアポトーシスを引き起こすか調べるため、活性型であるtxBid mRNAを4割球胚の1細胞に導入し観察したところ、stage 8まで発生が進んだ胚で細胞死が起きているのを確認した(Fig. 29A)。胚の一部は、死細胞の塊として白くなっていた。この細胞死が見られた領域は、本来はtxBid mRNAを導入した細胞から発生する領域である。次に、txBidを導入した胚において、caspase-3が活性するかを確認するため、SCAT3-Tgカエルの胚にtxBid mRNAを導入して、SCAT3タンパク質の切断の有無を調べた(Fig. 29B)。同様に4割球胚の1細胞にtxBid mRNAを導入し、stage 5と共にstage 7と stage 10まで発生が進んだ胚を可溶化してタンパク質を抽出した。その抽出液を変性処理せずにSDS電気泳動を行い、泳動後のアクリルアミドゲルの蛍光パターンをイメージアナライザーで撮影取得した。txBid mRNAを導入した胚から抽出したSCAT3は、一部が切断されていた(Fig. 29B)。しかも、stage 7の胚よりstage 10の胚でSCAT3の切断が増加してした。一方、コントロール胚ではstage 5-10の間でSCAT3の切断は確認されなかった。このことより、活性型Bidの強制発現はcaspse-3の活性化を伴った細胞死を誘導することが判明した。



Figure 29 Enforced expression of truncated xBid induces apoptosis during development.

(A) Morphological analysis of the embryos occurring cell death. Wild-type embryos were injected with 50 pg (middle panel) and 200 pg (lower panel) of truncated xBid (txBid) mRNAs into the equatorial area of two dorsal blastomeres at 4-cell-stage and photographs were taken of developing embryos at stage 8. The arrows indicate the area involved in cell death. (B) Fluorescence images of SCAT3 in transgenic embryos were acquired after injection of txBid mRNA. Cell extracts were prepared from uninjected embryos or embryos injected at the 4-cell stage with 50 pg of txBid mRNA isolated, at stages 5, 7 or 10. Cell extracts derived from whole embryos were resolved by SDS-PAGE. Fluorescence was analyzed on a fluorescent image analyzer (upper panel), followed by staining of the gels with Coomassie Brilliant Blue (lower panel). FITC-labeled molecular weight markers are visible in the right lane. An arrow indicates full-length SCAT3, while the white and black arrowheads indicate the cleaved Venus and seCFP fragments, respectively. The numbers on the fluorescence measure using an image analyzer.

Xenopusの尾の退行時におけるcaspase-3の関与について

強制発現させたtxBidによるアポトーシス誘導によって、SCAT3-Tgカエルの胚で SCAT3の切断が確認されたことより、SCAT3-Tgカエルはアポトーシスにおいて*in vivo* で caspase-3の活性を可視化できることが期待された。そのため、変態期にアポトーシスが観 察される組織に着目し、退行時の尾でSCAT3のFRETの蛍光変動が起きているか検証した。 変態時期に達したSCAT3-Tgカエルのオタマジャクシを使って、尾の部位を顕微鏡観察した ところ、尾の基部から先端にかけてFRETの変動が大きくなっていることを認めた (Fig. 30C)。この解析結果は、先端に向かうに従ってcaspase-3の活性が高くなっていることを示 唆する。退行時の尾においてcaspase-3の発現が既に報告されていることから、SCAT3の FRETの変動は活性化したcaspase-3の作用を反映していると考えられる。



Figure 30 Detection of caspase-3 activation in the regressing tail of a transgenic frog expressing a biosensor SCAT3.

(A) Structure of CAG-SCAT3 transgene containing the FRET-based biosensor SCAT3 and the rabbit 6-globin polyA signal sequence, under control of the CAG promoter. (B) Whole-body fluorescence of a SCAT3-expressing transgenic frog: seCFP (left) and of Venus (right) fluorescence in a juvenile frog. (C) The imaging pattern of the tail of a SCAT3-expressing transgenic tadpole (stage 63) undergoing metamorphosis. Pseudo colors indicate the emission ratio of calculated fluorescent intensity passing through 535 nm and 480 nm filters, and were varied from 2.0 to 1.4 during monitoring.

【考察】

本研究によって、*Xenopus*由来のBid、およびcaspase-10に相同なcaspase-108を新たに 単離した。ヒト培養細胞に導入することで、caspase-108とBidのアポトーシス誘導能を確 認するとともに、カエル受精卵への遺伝子導入によっても同じく細胞死誘導を認めた。また、SCAT3トランスジェニックカエルの受精卵へ遺伝子導入することにより、カスパーゼの活性化によるSCAT3の切断を確認した。これらのことより、単離したxBidは、機能分子であることが分かった。さらに SCAT3-トランスジェニックカエルが*in vivo*においてもcaspase-3のモニター分子として利用できること、オタマジャクシの尾の退縮時に起こるcaspase-3の活性を、空間依存的な活性変化として捉えることができた。

最近の研究によって、Xenopus laevisの遺伝子型は、異種交配と全ゲノム重複により1 個体中に異なるゲノムを持った異質4倍体であることが立証された⁹¹。報告されたデータベ ースを調べたところ、本研究で同定したcaspase-108遺伝子は、L型由来の第9染色体上に存 在し、一方先に単離されたcaspase-10遺伝子は、S型由来の第9染色体上に存在しているこ とが判明した。魚類のシーラカンスから有袋類のオポッサムに至る生物種において、 caspase-10遺伝子は、3つの遺伝子caspase-8、caspase-18、そしてcflarと共にゲノム上で 並んで存在することが判明している⁹²。Caspase-10を含めた4つの遺伝子は、脊椎動物へと 進化する過程において、遺伝子重複によって祖先型のcaspase-8より派生してきたと考えら れる⁹²。caspase-8について調べたところ、L型由来の第9染色体上にcaspase-108と並んで存 在していた。このことは、caspase-108が他の生物種で見つかっているcaspase-10に相当す ると考えられる。興味深いことに、胚発生の過程では、母親の転写産物が含まれる初期の 発生時期ではcaspase-10が発現しており、胚自身の遺伝子発現が始まる時期になると caspase-108へと発現が切り替わっていた (Fig. 27B)。同様な現象は、Xenopusに2タイプ 存在しているSmad4 (Smad4α、Smad48)でも認められ⁹³、発生が進むに従ってSmad48か らSmad4αへと切り替えが起きる。遺伝子が2セットあるXenopus laevisは、発生に伴い、 その他の遺伝子も含めてそれぞれの遺伝子を使い分けている可能性が高い。一方成体の臓 器では、caspase-10とcaspase-106の両方が発現しており(Fig. 27A)、明らかに発現制御が 発生時期と異なっている。

Chenらは、第二章で用いたFvあるいはFRBドメインを各カスパーゼのプロテアーゼド メインに繋げた融合タンパク質を作製し、ホモ同士あるいはヘテロ間での活性化を調べた ⁴⁰。彼らは、caspase-3、caspase6、caspase-8、caspase-9、そしてcaspase-10について検 討し、caspase-8、caspase-9とcaspase-10の3つのカスパーゼがホモで二量体化を誘導した ら、活性化すると報告している。しかし、caspase-8とcaspase-10のヘテロの組み合わせで は活性化は起きなかった。本研究では、過剰発現の系ながらcaspase-108とcaspase-10、あ るいはcaspase-108とcaspase-8の間で相互作用が確認された(Fig. 22B)。生体内では、 caspase-10とcaspase-8が協調的に働くのか、それともそれぞれ独自に働くのか、興味ある 課題である。ヒトでは、caspase-10とcaspase-8の遺伝子のそれぞれに変異が生じた患者が 見つかっており、共に免疫系に異常が認められる。但し、caspase-10が機能しないと、免 疫細胞が増えて自己免疫疾患になるが⁹⁴、caspase-8が機能しないと免疫不全となる。 xCaspase-8 (C384S)のmRNAを調整後、4割球の*Xenopus*胚に導入してstage 45まで発生が 進んだ時点で胚を観察すると、胴が短い個体や浮腫を起こしている個体が認められ(未発表 データ)、このような表現型はxCaspase-106 (C384S) mRNAをマイクロインジェクション した場合 (Fig. 28B)と似ている。マウスにはcaspase-10遺伝子がゲノムより欠失している ことから、caspase-10とcaspase-8の関係を調べる上で、*Xenopus*は有用なモデル動物とな ると思われる。

Fig. 28BにおいてxCaspase-108の活性と胚発生について検討した。胚発生時に xCaspase-108の活性を特定することは重要であるが、xCaspase-108の基質認識配列が特定 されていないことから適当な基質をデザインできず、また活性型のxCaspase-108を認識す る抗体が作られていない等の理由によって、xCaspase-108の活性を胚で特定することは困 難であった。xCaspase-108の胚における発現については、Whole-mount in situ hybridization (WISH) によってstage 8~stage 32の胚について調べた²⁰。しかし、Fig. 28B に示すような、stage 45まで発生した胚ではWISHの技術的な限界から発現を特定すること はできず、異常が生じる領域で内在のxCaspase-108を確認できなかった。現在においても 未だに胚発生におけるxCaspase-108の生理的役割は明らかになっていないため、活性も含 めて胚発生におけるxCaspase-108の働きを明らかにしていきたいと考えている。

今回、細胞死を起こしながら退行する尾において、caspase-3のモニター分子である SCAT3に変動があることを認めた。尾のように、変態期の組織は、細胞死の検出が容易で ある。本来ならば変態にはまだ進まないオタマジャクシにおいて、甲状腺ホルモンを飼育 水に加えると、尾の退行が進むことが知られている。SCAT3-Tgカエルにおいて甲状腺ホル モン処理をして変態を進めると、SCAT3-Tgカエルの尾でFRETの変動を認めた(未発表)。 Dasらは退行時の尾において活性型のcaspase-3を組織免疫染色で検出し、さらに甲状腺ホ ルモン処理したオタマジャクシの尾ではより多くの活性型のcaspase-3を認めている³²。 Takagiらは人工的なアポトーシスの誘導系を使って、胚発生途中のアポトーシス細胞集団 でFRETの変動を特定している⁹⁵。このように胚発生時のアポトーシスと、SCAT3-Tgカエ ルのFRET変動に相関があるが、個々の細胞レベルで、caspase-3の活性とアポトーシス細 胞との関係を明確にする必要がある。今後、的確な観察条件を設定することにより、胚発 生段階で観察される細胞死について、caspase-3の活性化を伴うアポトーシスであることを 明らかにしたいと考えている。

総括

1972年にKerrらによって初めてアポトーシスが提唱 ⁹⁶されて以降、カスパーゼやBcl-2 ファミリー分子等、アポトーシスに関わる主要なタンパク質の同定、並びにシグナル伝達 経路の全容が明らかになりつつある。しかしこれまでの研究は、主に細胞集団を扱った生 化学的な手法を用いての解析であり、アポトーシス実行時に起こる細胞内の変化を単一細 胞で刻々と追跡することは困難であった。本研究の第一章では、FRET の原理を応用した カスパーゼの活性測定用モニター分子を作製し、並びにリアルタイムイメージングの技術 を開発することで、1 個の細胞中で起こるカスパーゼの活性を経時的に可視化することを試 みた。その結果、caspase-8 の活性状態を 1 細胞で提示することに成功した。さらに dual-FRET の系を構築することにより、複数のカスパーゼが関わるカスケードの時系列的 な変化を調べることが可能となり、caspase-8 の増大された活性が caspase-3 活性後に起こ ることを見出し、ポジティブフィードバックループの存在を特定することができた。

このように、デスレセプターを介する caspase 8 の活性化を分子レベルで捉えることが でき、さらにはカスパーゼの活性を基質の変化で表すことにより数理変換を可能にした。 次に第二章では、アポトーシスのシグナルを下流に伝えるために必要な caspase 8 の初期活 性の量を求めた。シグナルの強さを数値化するためには、数理モデルを使った検証が欠か せないが、数理モデル自身も実験データと整合したものでなければならない。本研究では、 カスパーゼカスケードに対する数理モデルを構築し、抑制・増加などカスパーゼカスケー ドを人為的に操作した結果から求めた実測データとモデルを照合することで実験結果に合 致した数理モデルを完成した。このモデルを使って、caspase 8 の初期活性化される値を割 り出した。今回、Type2 細胞の HeLa 細胞を研究対象に解析を進めたが、リンパ球系細胞 のような Type 1 細胞においても同様に検証する必要がある。今後 Type 1 細胞に対する検 証が進めば、Type 1 細胞と Type 2 細胞における caspase 8 の初期活性化量の違いの有無な ど、より正確なアポトーシスのシグナル伝達経路を理解できることが期待される。

発生におけるカスパーゼの生理的役割を理解するため、発生学の分野でよく使用される アフリカツメガエル (Xenopus laevis) に注目し、第三章ではアフリカツメガエル由来のア ポトーシス関連遺伝子の単離、並びに活性型 caspase-3 の検出用モニター分子を発現したト ランスジェニックカエルの樹立を試みた。今回、Bid および caspase-10 に相同な caspase-108 を新たに単離した。ヒト培養細胞に導入することで、Bid のアポトーシス誘導 能を確認するとともに、カエル受精卵への遺伝子導入によっても同じく細胞死誘導を確認 した。また SCAT3 トランスジェニックカエルの受精卵へ遺伝子導入することにより、 SCAT3 の切断を確認した。これらのことより単離した xBid は機能分子であることがわか った。さらに SCAT3 – トランスジェニックカエルが *in vivo*においても caspase-3 のモニ ター分子として利用できること、オタマジャクシの尾の退縮時に起こる caspase-3 活性を、 空間依存的な活性変化として捉えることができた。このことより、SCAT3 トランスジェニ ックカエルは、胚発生における caspase-3 の活性を検出するのに有効なモデル動物となり、 今後この動物とアポトーシス関連遺伝子を用いることで、発生時に見られるアポトーシス の解析、並びに caspase-3 を含めたカスパーゼの生理的役割の解明が進むと考えている。

結論

- FRETの原理を応用したモニター分子とリアルタイムイメージングの系を用いて caspase-8 と caspase-3 の活性を1細胞単位で同時に観察する系を開発し、デスレセプ ター刺激を介して起きる caspase-8 の初期活性化と、その後のポジティブフィードバッ クループによる活性化を識別・定量可能にした。
- 2. 実験的データと合致する数理モデルを構築し、数理モデルから HeLa 細胞で活性化される caspase-8 と caspase-3 の量を推定した。
- 3. 胚発生過程で観察されるアポトーシスを解析するため、*Xenopus*からアポトーシス関 連遺伝子をクローニングし、その機能を特定した。また樹立した SCAT3 トランスジェ ニックカエルはアポトーシス検出用のモデル動物として有用であることを認めた。

以上、アポトーシス実行因子であるカスパーゼの分子機序と生体における生理的役割の 解明を実施した。

謝辞

幸いにして得た新知見をここに論文としてまとめ得ましたのは、大阪大学大学院薬学研 究科分子生物学分野教授 水口裕之先生より御指導御鞭撻を頂きましたことによるもので あり、深く感謝申し上げます。

研究遂行にあたり、京都大学大学院生命科学研究科准教授 酒巻和弘先生、教授 米原 伸先生、東京大学大学院農学生命科学研究科教授 真鍋昇先生に多大な御指導御鞭撻を頂 きましたことを心より感謝申し上げます。

本研究に関して多大なるご指導・ご協力・ご助言を賜りました、大阪大学産業科学研究 所教授 永井健治先生、理化学研究所光量子工学研究領域 横田秀夫先生、須永泰弘先生、 辻村有紀先生、脳科学総合研究センター 宮脇敦史先生、横浜市立大学医学研究科准教授 中林潤先生、愛媛大学プロテオサイエンスセンター教授 澤崎達也先生、愛媛大学特別栄 誉教授 遠藤弥重太先生、基礎生物学研究所教授 上野直人先生、 基礎生物学研究所 高 木知世先生、総合研究大学院大学 先導科学研究科 八島健太先生、 横浜市立大学医学研 究科 竹本研先生、Vertex Pharmaceuticals 社 杭田慶介先生に心より感謝いたします。

本研究を遂行する上で、多大なる技術指導・実験協力を頂きました京都大学大学院生命 科学研究科高次遺伝情報学分野の皆様に心より感謝いたします。

最後に、論文執筆中温かく見守りつつ支えてくれた家族に心より感謝いたします。
引用文献

- Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. Properties of the caspases. *Biochim. Biophys. Acta* 1387, 17–31 (1998).
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. Science 281, 1312–6 (1998).
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424 (1999).
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–41 (2008).
- Sakamaki, K. & Satou, Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. J. Fish Biol. 74, 727–53 (2009).
- Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–87 (1998).
- Barnhart, B. C., Alappat, E. C. & Peter, M. E. The CD95 Type I/Type II model. Semin. Immunol. 15, 185–193 (2003).
- Kantari, C. & Walczak, H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 558–563 (2011).
- 9. Kuwana, T. *et al.* Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **273**, 16589–94 (1998).
- Algeciras-Schimnich, A. *et al.* Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11445–11450 (2003).
- Cowling, V. & Downward, J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ.* 9, 1046–56 (2002).
- Wurstle, M. L., Laussmann, M. A. & Rehm, M. The Caspase-8 Dimerization/Dissociation Balance Is a Highly Potent Regulator of Caspase-8, -3, -6 Signaling. J. Biol. Chem. 285, 33209–33218 (2010).
- Oberst, A. *et al.* Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 285, 16632–42 (2010).
- Varfolomeev, E. E. *et al.* Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267–76 (1998).

- Sakamaki, K. *et al.* Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Differ.* 9, 1196–1206 (2002).
- Yeh, W. C. *et al.* FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954–8 (1998).
- Yeh, W. C. *et al.* Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12, 633–42 (2000).
- Kuida, K. *et al.* Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368–372 (1996).
- Yoshida, H. *et al.* Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94, 739–50 (1998).
- Kominami, K. *et al.* The initiator caspase, caspase-108, and the BH-3-only molecule, Bid, demonstrate evolutionary conservation in *Xenopus* of their pro-apoptotic activities in the extrinsic and intrinsic pathways. *Genes to Cells* 11, 701–717 (2006).
- Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347–54 (1997).
- 22. Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. Cell death in development. Cell 96, 245-54 (1999).
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G. Apoptosis in development. *Nature* 407, 796–801 (2000).
- Kerr, J. F., Harmon, B. & Searle, J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J. Cell Sci.* 14, 571–85 (1974).
- 25. Tata, J. R. Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochem. Cell Biol.* **72**, 581–8
- Nishikawa, A. *et al.* Roles of macrophages in programmed cell death and remodeling of tail and body muscle of Xenopus laevis during metamorphosis. *Histochem. Cell Biol.* 109, 11–7 (1998).
- Hensey, C. & Gautier, J. Programmed Cell Death duringXenopusDevelopment: A Spatio-temporal Analysis. *Dev. Biol.* 203, 36–48 (1998).
- Hensey, C. & Gautier, J. Developmental regulation of induced and programmed cell death in Xenopus embryos. Ann. N. Y. Acad. Sci. 887, 105–19 (1999).
- Charrier, J. B., Teillet, M. A., Lapointe, F. & Le Douarin, N. M. Defining subregions of Hensen's node essential for caudalward movement, midline development and cell survival. *Development* 126, 4771–83 (1999).
- 30. Yaoita, Y. & Nakajima, K. Induction of apoptosis and CPP32 expression by thyroid

hormone in a myoblastic cell line derived from tadpole tail. *J. Biol. Chem.* **272**, 5122–7 (1997).

- Nakajima, K., Takahashi, A. & Yaoita, Y. Structure, expression, and function of the Xenopus laevis caspase family. *J. Biol. Chem.* 275, 10484–91 (2000).
- Das, B., Schreiber, A. M., Huang, H. & Brown, D. D. Multiple thyroid hormone-induced muscle growth and death programs during metamorphosis in Xenopus laevis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 12230–12235 (2002).
- Rowe, I. *et al.* Apoptosis of tail muscle during amphibian metamorphosis involves a caspase 9-dependent mechanism. *Dev. Dyn.* 233, 76–87 (2005).
- Hochreiter, B., Garcia, A. & Schmid, J. Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors* 15, 26281–26314 (2015).
- 35. Nagai, T. *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* **20**, 87–90 (2002).
- Nagai, T. & Miyawaki, A. A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 72–7 (2004).
- Campbell, R. E. *et al.* A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* A. 99, 7877–82 (2002).
- Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193–9 (1991).
- Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R. & Endo, Y. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14652–14657 (2002).
- Chen, M., Orozco, A., Spencer, D. M. & Wang, J. Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. J. Biol. Chem. 277, 50761-7 (2002).
- Suzuki, A. *et al.* Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5. *Oncogene* 23, 7067–75 (2004).
- Cao, Q. *et al.* Inhibitory mechanism of caspase-6 phosphorylation revealed by crystal structures, molecular dynamics simulations, and biochemical assays. *J. Biol. Chem.* 287, 15371–9 (2012).
- 43. Velázquez-Delgado, E. M. & Hardy, J. A. Phosphorylation regulates assembly of the caspase-6 substrate-binding groove. *Structure* **20**, 742–51 (2012).
- Chudakov, D. M., Matz, M. V, Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* 90, 1103–63 (2010).
- Luo, K. Q., Yu, V. C., Pu, Y. & Chang, D. C. Measuring dynamics of caspase-8 activation in a single living HeLa cell during TNFalpha-induced apoptosis. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 304, 217–22 (2003).

- Kawai, H. *et al.* Simultaneous imaging of initiator/effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1693, 101–10 (2004).
- Albeck, J. G. *et al.* Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells. *Mol. Cell* **30**, 11–25 (2008).
- Hellwig, C. T. *et al.* Real time analysis of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/cycloheximide-induced caspase activities during apoptosis initiation. *J. Biol. Chem.* 283, 21676–85 (2008).
- 49. Wu, X. *et al.* Measurement of two caspase activities simultaneously in living cells by a novel dual FRET fluorescent indicator probe. *Cytometry. A* **69**, 477–86 (2006).
- 50. Slee, E. A. *et al.* Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144, 281–92 (1999).
- 51. Kang, J. J. *et al.* Cascades of mammalian caspase activation in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **274**, 3189–98 (1999).
- Kominami, K. *et al.* In Vivo Imaging of Hierarchical Spatiotemporal Activation of Caspase-8 during Apoptosis. *PLoS One* 7, 1–18 (2012).
- 53. Sakamaki, K. *et al.* Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2766–2783 (2016).
- Gasparini, C., Vecchi Brumatti, L., Monasta, L. & Zauli, G. TRAIL-based therapeutic approaches for the treatment of pediatric malignancies. *Curr. Med. Chem.* 20, 2254–71 (2013).
- 55. Song, X. *et al.* Hyperthermia enhances mapatumumab-induced apoptotic death through ubiquitin-mediated degradation of cellular FLIP(long) in human colon cancer cells. *Cell Death Dis.* **4**, e577 (2013).
- 56. Gross, A. *et al.* Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274, 1156–63 (1999).
- 57. Chen, X. *et al.* Differential reactivation of fetal/neonatal genes in mouse liver tumors induced in cirrhotic and non-cirrhotic conditions. *Cancer Sci.* **106**, 972–81 (2015).
- McDonald, E. R. & El-Deiry, W. S. Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6170–5 (2004).
- Dunning & Ted. Accurate methods for the statistics of surprise and coincidence. Comput. Linguist. 19, 61–74 (1993).

- 60. Fricker, N. *et al.* Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *J. Cell Biol.* **190**, 377–89 (2010).
- 61. Lafont, E. *et al.* Caspase-10-dependent cell death in Fas/CD95 signalling is not abrogated by caspase inhibitor zVAD-fmk. *PLoS One* **5**, e13638 (2010).
- Varner, J., Fussenegger, M. & Bailey, J. E. A mathematical model of caspase function in apoptosis. *Nat. Biotechnol.* 18, 768–774 (2000).
- Bentele, M. *et al.* Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 166, 839–51 (2004).
- Eissing, T. *et al.* Bistability analyses of a caspase activation model for receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 36892–7 (2004).
- Hua, F., Cornejo, M. G., Cardone, M. H., Stokes, C. L. & Lauffenburger, D. A. Effects of Bcl-2 levels on Fas signaling-induced caspase-3 activation: molecular genetic tests of computational model predictions. *J. Immunol.* 175, 985–95 (2005).
- 66. Stucki, J. W. & Simon, H.-U. Mathematical modeling of the regulation of caspase-3 activation and degradation. *J. Theor. Biol.* **234**, 123–131 (2005).
- Bagci, E. Z., Vodovotz, Y., Billiar, T. R., Ermentrout, G. B. & Bahar, I. Bistability in Apoptosis: Roles of Bax, Bcl-2, and Mitochondrial Permeability Transition Pores. *Biophys. J.* 90, 1546–1559 (2006).
- Legewie, S., Blüthgen, N. & Herzel, H. Mathematical modeling identifies inhibitors of apoptosis as mediators of positive feedback and bistability. *PLoS Comput. Biol.* 2, e120 (2006).
- Rehm, M., Huber, H. J., Dussmann, H. & Prehn, J. H. M. Systems analysis of effector caspase activation and its control by X-linked inhibitor of apoptosis protein. *EMBO J.* 25, 4338–4349 (2006).
- Cui, J., Chen, C., Lu, H., Sun, T. & Shen, P. Two independent positive feedbacks and bistability in the Bcl-2 apoptotic switch. *PLoS One* 3, e1469 (2008).
- Albeck, J. G., Burke, J. M., Spencer, S. L., Lauffenburger, D. A. & Sorger, P. K. Modeling a snap-action, variable-delay switch controlling extrinsic cell death. *PLoS Biol.* 6, 2831–52 (2008).
- Harrington, H. A., Ho, K. L., Ghosh, S. & Tung, K. C. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theor. Biol. Med. Model.* 5, 26 (2008).
- Schlatter, R. *et al.* ON/OFF and beyond--a boolean model of apoptosis. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000595 (2009).
- 74. Calzone, L. *et al.* Mathematical modelling of cell-fate decision in response to death receptor engagement. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000702 (2010).

- 75. Pace, V., Bellizzi, D., Giordano, F., Panno, M. L. & De Benedictis, G. Experimental testing of a mathematical model relevant to the extrinsic pathway of apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 15, 13–23 (2010).
- 76. Huber, H. J., Laussmann, M. A., Prehn, J. H. M. & Rehm, M. Diffusion is capable of translating anisotropic apoptosis initiation into a homogeneous execution of cell death. *BMC Syst. Biol.* 4, 9 (2010).
- Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J. C. & Hurle, J.
 M. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Dev. Biol.* 301, 205–217 (2007).
- Nakajima, K., Takahashi, A. & Yaoita, Y. Structure, expression, and function of the Xenopus laevis caspase family. *J. Biol. Chem.* 275, 10484–91 (2000).
- 79. Suzuki, A. *et al.* A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early Xenopus embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10255–9 (1994).
- 80. Nieuwkoop, P. D. (Pieter D. . & Faber, J. Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. (Garland Pub, 1967).
- Kuida, K. *et al.* Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325–37 (1998).
- 82. Higgins, D. G. & Sharp, P. M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237–44 (1988).
- Sakamaki, K., Miyajima, I., Kitamura, T. & Miyajima, A. Critical cytoplasmic domains of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 11, 3541–9 (1992).
- Kroll, K. L. & Amaya, E. Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173–83 (1996).
- Amaya, E. & Kroll, K. L. A Method for Generating Transgenic Frog Embryos. in Molecular Embryology 97, 393–414 (Humana Press, 1999).
- 86. Sakamaki, K. *et al.* The adaptor molecule FADD from Xenopus laevis demonstrates evolutionary conservation of its pro-apoptotic activity. *Genes Cells* **9**, 1249–64 (2004).
- Zhou, Q. *et al.* Interaction of the Baculovirus Anti-apoptotic Protein p35 with Caspases. Specificity, Kinetics, and Characterization of the Caspase/p35 Complex [†]. *Biochemistry* 37, 10757–10765 (1998).
- 88. Yamamoto, T. S., Takagi, C., Hyodo, A. C. & Ueno, N. Suppression of head formation

by Xmsx-1 through the inhibition of intracellular nodal signaling. *Development* **128**, 2769–79 (2001).

- 89. Siegel, R. M. *et al.* Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J. Cell Biol.* **141**, 1243–53 (1998).
- Milhas, D. *et al.* Caspase-10 Triggers Bid Cleavage and Caspase Cascade Activation in FasL-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 19836–19842 (2005).
- Session, A. M. *et al.* Genome evolution in the allotetraploid frog Xenopus laevis. *Nature* 538, 336–343 (2016).
- 92. Sakamaki, K., Imai, K., Tomii, K. & Miller, D. J. Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *Bioessays* 37, 767–76 (2015).
- Masuyama, N., Hanafusa, H., Kusakabe, M., Shibuya, H. & Nishida, E. Identification of two Smad4 proteins in Xenopus. Their common and distinct properties. *J. Biol. Chem.* 274, 12163–70 (1999).
- 94. Wang, J. et al. Inherited Human Caspase 10 Mutations Underlie Defective Lymphocyte and Dendritic Cell Apoptosis in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Type II. Cell 98, 47–58 (1999).
- Takagi, C. *et al.* Transgenic Xenopus laevis for live imaging in cell and developmental biology. *Dev. Growth Differ.* 55, 422–33 (2013).
- 96. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–57 (1972).