

[研究課題名] アポトーシス実行タンパク質の機能とその制御

[研究課題名 (英文)] Roles of caspase proteases in apoptosis and their regulatory mechanism.

[研究担当者 (分担者も含む)] 森島信裕

[研究室] 遺伝生化学研究室

1. 研究目的

アポトーシスの実行に中心的な役割を果たす一群のプロテアーゼ、カスパーゼ族についてその機能と制御機構を明らかにすることが研究目的である。これまでカスパーゼの研究は主に培養細胞を用いて行われてきたが、本研究では発生におけるアポトーシス、種々のストレスによって起きる病理学的アポトーシスなど生体内での細胞運命決定に関わるカスパーゼの機能と制御に注目する。これらの研究の推進は個体の細胞レベルで生/死、正常/異常というバランスがどのようにして成り立っているかを明らかにし、生物の構築原理解明に貢献する事が期待される。

2. 平成 15 年度の研究計画

異常な立体構造を持つ蛋白質が小胞体内に蓄積することは細胞にとってストレスとなり、ストレスが長く継続したり、強度が強い時にはアポトーシスが起こることが分かってきた。このアポトーシスにおいてはカスパーゼ 1 2 をイニシエーターとするカスパーゼ・カスケードが起動することが示唆されている。カスパーゼ-1 2 が生体内のどこでいつ活性化しているかを探り、このプロテアーゼが生体内で果たす役割やその制御機構について探究するため、平成 15 年度はカスパーゼ-1 2 の活性化を組織レベルで検出する新たな手段を得る事を目指す。まずカスパーゼ-1 2 の活性化に伴うプロセッシング部位を明らかにし、プロセッシングによって生ずるペプチド断端の構造を特異的に認識する抗体の作製を試みる。また、カスパーゼ-1 2 とは異なる状況下で活性化するイニシエーター、カスパーゼ-9 の活性化を検出する抗体 (工業所有権 (特許) 申請済み) を用い、正常発生に伴うアポトーシス及び病態におけるアポトーシスにおいてこのカスパーゼが関与しているか否かについて検討する。

3. 平成 15 年度の研究成果

アポトーシス（細胞死）は正常な発生やホメオスタシスの維持などに必要で、その異常は癌をはじめとする数多くの病気の原因となる。アポトーシスの実行を担うカスパーゼ・プロテアゼ族とその調節因子が数多く見い出されてきた。カスパーゼ族の中でイニシエータタイプと呼ばれるカスパーゼは種々のアポトーシス刺激に最初に対応して活性化し、その後のアポトーシス反応を引き起こす事が *in vitro* 系で示されている。しかし、イニシエータ・カスパーゼが生体内のどこで、いつ、どのようなきっかけによって活性化してアポトーシスを起こすのかという問題はほとんど解かれていない。この問題に挑戦するため、イニシエータ・カスパーゼの活性化やカスパーゼの基質の切断を特異的に認識する抗体の開発を進め、それらを用いて生体内でのイニシエータ・カスパーゼ活性調節の機構を明らかにすることを目指している。

カスパーゼの活性化は前駆体の特異的プロセッシングにより起こり、活性化したカスパーゼは基質の特定箇所のアスパラギン酸残基のペプチド結合を切断する。従って、アポトーシスの起こる前には存在しなかったペプチドの切断末端が活性化カスパーゼや基質に現れる。これまで、切断末端の構造（N または C 末端を含む数残基のペプチド）に対応したオリゴペプチドを用いてウサギを免疫することにより切断末端認識抗体の作製を試みてきた。本年度は小胞体ストレスに対応して働くカスパーゼ-12のプロセッシングを認識できる抗体の作製に成功した。この抗体を用いてマウス胚切片を染色し、胚発生における筋分化に伴うアポトーシスにおいてカスパーゼ-12が活性化している事を組織レベルで検出した。また、カスパーゼ-9の基質切断を認識する抗体を用い、発生における腎臓分化、成体の肺における線維腫の初期にイニシエータ・カスパーゼ-9が活性化してアポトーシスを起こす事を示した。発生に伴うアポトーシスは単に余剰細胞の除去のために起こり、細胞数を調節する働きがあるとされてきたが、器官形成に適していない細胞を除去するという質的な選択をしている事を示唆するデータを得た。この結果はアポトーシスの生物学的意義の理解を変え、生物の構築原理の理解に新たな視点を与えるきっかけになる可能性がある。

4. 目的と成果の要約

カスパーゼ・カスケードを起動させるイニシエータ・カスパーゼが生体内のどこで、いつ、どのようなきっかけによって活性化し、アポトーシスを起こすかという問題に取り組んでいる。イニシエータ・カスパーゼの活性化やカ

スパーゼの基質切断を特異的に認識する抗体の開発を進め、正常な胚発生や成体の病理組織で見られるアポトーシスにおいて特異的なイニシエータ・カスパーゼが活性化していることを検出した。

5. 研究成果の概要（英文）

By using specific antibodies, we have detected activation of “initiator-type” caspases in either apoptosis associated with organogenesis during development or that found under pathological conditions.

6. 平成 15 年度誌上発表

(1) 原著論文

Araki, T., Hayashi, M., Nakanishi, K., Morishima, N. and Saruta, T. (2003) Caspase-9 takes part in programmed cell death in developing mouse kidney. *Nephron Exp Nephrol.* **93**:e117-124.

Kasper, M., Seidel, D., Knels, L., Morishima, N., Neisser, A., Bramke, S. and Kosolowski, R. (2004) Early signs of lung fibrosis after in vitro treatment of rat lung slices with CdCl₂ and TGF-β1. *Histochem. Cell Biol.* **121**:131-140.

(2) その他

7. メンバー

森島信裕 Nobuhiro MORISHIMA

8. 共同研究者

中西慶子 Keiko NAKANISHI

清和恵美子 Emiko SEIWA

柴田武彦 Takehiko SHIBATA

荒木崇志 Takashi ARAKI

(慶応大学 Keio University)

林松彦 Matsuhiko HAYASHI

(慶応大学 Keio University)

猿田享男 Takao SARUTA

(慶応大学 Keio University)

~ Michael KASPER

~~~ (Technical University of Dresden)

~~~ Lilla KNELS

~~~ (Technical University of Dresden)

~~~ Anja NEISSER

~~~ (Technical University of Dresden)

~~~ Silvia BRAMKE

~~~ (Technical University of Dresden)

~~~ Dagmar SEIDEL

~~~ (Technical University of Dresden)

~~~ Roland KOSLOWSKY

~~~ (Technical University of Dresden)