

論文要旨

イトマキヒトデ未受精卵アポトーシスの分子機構の解明

田村 りつ子

アポトーシスはプログラムされた細胞死とも呼ばれ、生命の維持において、重要な役割を担う生物機構である。例えば、発生過程で不要になった細胞や、がん細胞などの異常な細胞はアポトーシスによって、他の細胞や組織に障害を与えることなく排除され、個体の恒常性が保たれている。アポトーシスは、タンパク質分解酵素である caspase (cysteine-aspartic acid specific protease) によって制御されており、その機能と構造によって initiator caspase と effector caspase の 2 種類に大別される。哺乳類では、ミトコンドリアから cytochrome *c* が放出されると、これが引き金となり、Apaf-1 複合体である apoptosome が形成される。initiator caspase である caspase-9 は、apoptosome と CARD (caspase recruitment domain) を介して結合・凝集することによって活性化し、その後、下流の effector caspase である caspase-3 を切断・活性化することによって、アポトーシスが誘導される (Li et al., 1997 ; Yuanming et al., 1999)。

当研究室では、イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) の未受精卵に、ホルモン刺激から 10 時間程度でアポトーシスが誘起されることを見だし (Sasaki and Chiba, 2001)、ヒトデ卵のアポトーシス機構に関与する因子として caspase-3/9 とヒトデ Apaf-1 (sfApaf-1) を同定し、解析してきた。アポトーシスの研究は、脊椎動物の他に、線虫、ショウジョウバエなどのモデル生物を中心に進められてきたが、それ以外の動物ではほとんど明らかになっていない。したがって、ヒトデ卵アポトーシスの分子機構を解明することは、動物の進化におけるアポトーシス機構の保存、そして進化を解き明かす大きな一歩となりうる。本論文では、sfApaf-1 との相互作用による caspase-3/9 の活性化機構、そしてヒトデ卵アポトーシスの生理的意義に関する一連の研究成果について述べる。

1. イトマキヒトデ未受精卵アポトーシスの分子機構

イトマキヒトデの caspase は、N 末端に caspase-9 に特徴的な CARD をもち、caspase-3 に特徴的な DEVDase 活性をもつことから、当研究室では caspase-3/9 と呼んでいる。この caspase-3/9 がアポトーシスの直接的な実行因子であることが当研究室の先行研究より示唆されていたが、その活性化機構についての詳細は不明であった。そこで、まず、sfApaf-1 と caspase-3/9 が相互作用するかどうかを検討した。リコンビナント GST-sfApaf-1-CARD を用いて、caspase-3/9 の CARD もしくは全長との相互作用を解析した結果、sfApaf-1 と caspase-3/9 は CARD を介して結合することが明らかとなった。次に、リコンビナント GST-sfApaf-1-CARD をヒトデ未成熟卵無細胞系へ加えたところ、内在性の caspase-3/9 が活性化され、このとき sfApaf-1-CARD と caspase-3/9 が多量体を形成していることが明らかとなった。哺乳類では、Apaf-1-CARD と caspase-9 が複合体を形成することで、caspase-9 が凝集し活性化が起こるという報告があり (Eric et al., 2002)、これらの結果は、sfApaf-1 が、哺乳類 Apaf-1 と類似した機能をもつことを示している。

次に、ヒトデ卵アポトーシスにおける sfApaf-1 の役割を詳細に検討するため、ヒトデ未成熟卵無細胞系をゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、通常状態の内在性 sfApaf-1 を解析した。その結果、内在性 sfApaf-1 と内在性 procaspase-3/9 がそれ

それ予測分子量付近で検出され、通常の卵母細胞では、sfApaf-1、procaspase-3/9 は相互作用していないことが強く示唆された。さらに、抗 caspase-3/9 抗体を用いた免疫沈降法により、未成熟卵無細胞系とアポトーシス卵無細胞系における内在性 caspase-3/9 を免疫沈降した結果、アポトーシス卵無細胞系でのみ caspase-3/9 とともに sfApaf-1 が共沈したことから、両者の相互作用はアポトーシス過程において誘導されることが示唆された。なお、哺乳類細胞においてアポトーシスの引き金となる cytochrome *c* を、ヒトデ卵無細胞系に加えてもアポトーシスが誘導されなかったことから、ヒトデ卵アポトーシスにおける caspase-3/9 の活性化機構は、哺乳類とは異なる制御を受けていると考えられる。そこで、通常の卵母細胞では、caspase-3/9 に何らかの阻害物質が結合しており、caspase-3/9 と sfApaf-1 の相互作用が阻害されている可能性があると考え、解析を進めた。ほとんど活性のないリコンビナント procaspase-3/9-His₆をヒトデ未成熟卵無細胞系に加えたところ、DEVDase 活性が上昇したことから、内在性 procaspase-3/9 に結合していた阻害因子がリコンビナント procaspase-3/9-His₆によって外れ、阻害から解かれた内在性 procaspase-3/9 が活性化したと考えられた。さらに、このとき内在性 sfApaf-1、procaspase-3/9、活性型 caspase-3/9 は複合体を形成することで活性化していることが、ゲル濾過クロマトグラフィーによる実験で明らかとなった。これらの結果は、通常状態では sfApaf-1 と caspase-3/9 の相互作用が阻害されているが、アポトーシス過程における何らかの刺激によってその阻害が解かれると、両者が複合体を形成し、caspase-3/9 の活性化が誘導されることを強く示唆している。

2. イトマキヒトデ未受精卵アポトーシスの生理的意義

一般に、アポトーシスは不要な細胞を取り除くために誘導され、例えばアフリカツメガエルでは、排卵しきれず体内に残った卵はアポトーシスによって除去されることが報告されている (Iwasaki et al., 2013)。そこで本研究では、イトマキヒトデの卵巣内におけるアポトーシスを検討した。その結果、放卵された体外成熟卵と同様、卵巣内成熟卵でもアポトーシスが誘導されることを見いだした。次に、卵巣内成熟卵内の MAPK 活性を検討した。体外の卵アポトーシスでは、ホルモン刺激後 MAPK が活性化し、その活性が数時間維持されること (MAPK 依存期間) が必要であり、MAPK 依存期間終了後に MAPK は自発的に不活性化し (Sasaki and Chiba, 2004)、その後 1~2 時間で caspase-3/9 が活性化する。一方、卵巣内では、ホルモン刺激後 90 分までは MAPK の活性化はみられず、第一減数分裂中期で再び細胞周期を停止する (Usui et al., 2008)。今まで卵巣内では MAPK は活性化していないと考えられてきたが、本研究において、MAPK がホルモン刺激から 3 時間程度で一部活性化し、その活性は持続されたのち自発的に不活性化し、アポトーシスが誘導されることを見いだした。さらに、ホルモン刺激から 12 時間経過した卵巣内成熟卵に、雌性前核が観察されたことから、第一減数分裂中期の停止を解除してから卵巣内でアポトーシスが誘導されることが明らかになった。したがって、ヒトデ卵アポトーシスは、放卵しきれず卵巣内に残ってしまった卵を分解し、取り除く役割を担っていると考えられる。