



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	デスレセプターを介するアポトーシス誘導に重要な 新規分子DELEの同定とその機能解析
Author(s)	原田, 種展; Harada, Tanenobu
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第9705号
Issue Date	2010-09-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k9705
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/43931
Type	doctoral thesis
File Information	harada_thesis.pdf



デスレセプターを介するアポトーシス誘導に重要な
新規分子 DELE の同定とその機能解析

北海道大学 大学院 獣医学研究科

人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門

原田 種展

目次

序論	1
----	---

実験材料および方法	9
-----------	---

1. 細胞培養および遺伝子導入
2. サイトカインおよび抗体
3. 遺伝子発現プラスミドベクターの構築および siRNA の細胞内導入
4. DELE タンパク質特異的抗体作製のための DELE 抗原タンパク質の調整
5. ポリアクリルアミド電気泳動および PVDF 膜への転写
6. 免疫沈降法
7. 細胞内局在の解析
8. PVDF 膜を用いた DELE 特異的抗体の生成
9. 定量的および半定量的 RT-PCR
10. 遺伝子恒常発現細胞クローンの構築
11. 細胞生存率とカスパーゼ活性化の測定

結果	18
----	----

1. ミトコンドリアに局在する新規 DAP3 会合分子 DELE (death ligand signal enhancer)の同定
2. DELE タンパク質のドメイン構造
3. 免疫沈降法による DAP3 と DELE の哺乳類培養細胞内会合の解析
4. 共焦点レーザー顕微鏡による DELE の細胞内局在部位の解析

5. DELE タンパク質を特異的に認識する抗体の作製
6. DELE 遺伝子を恒常的に発現する細胞における TNF- α および TRAIL に対する感受性の解析
7. DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞における TNF- α および TRAIL に対する感受性の解析
8. DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞におけるデスレセプター刺激によるカスパーゼ活性化の解析
9. がん細胞における DELE mRNA 発現量の解析

考察	46
引用文献	56
謝辞	61

略語一覽

CARD:	caspase recruiting domain
DAP3:	death associated protein 3
DAPI :	4',6-diamidino-2-phenylindole
DD:	death domain
DED:	death effector domain
DELE:	death ligand signal enhancer
DISC:	death-inducing signaling complex
DR:	death receptor
EGFP:	enhanced green fluorescent protein
FADD:	Fas-associated death domain
FasL:	Fas ligand
GST:	glutathione S-transferase
IB:	immuno blot
IFN- γ :	interferon- γ
IP:	immuno precipitation
IPTG:	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
LIP1:	LKB1 interacting protein 1
MTS:	mitochondria
PAGE:	polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF:	polyvinylidene difluoride
SDS:	sodium dodecyl sulfate
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
TPR:	tetratricopeptide repeat
TRAIL:	TNF-related apoptosis inducing ligand
YCA-1:	yeast caspase-1

序論

アポトーシスはプログラム細胞死、すなわち遺伝情報に基づく能動的な細胞死の一形態として知られ、type I のプログラム細胞死に分類される。プログラム細胞死としては他に、オートファジーによる細胞死(type II)、ネクローシス様の細胞死(type III)等が知られており、これら細胞死は形態的な特徴によって分類されている。アポトーシスによる細胞死はホスファチジルセリン(phosphatidylserine)の細胞膜外側への転移から、細胞質および核の凝集とDNAの断片化による細胞の萎縮を伴う点が特徴的であり、アポトーシスを起こした細胞は最終的にアポトーシス小体を形成し、アポトーシス小体がマクロファージにより貪食され、痕跡を残さずに細胞が消滅する。アポトーシスは、これらプログラム細胞死の中でも主要な位置を占め、生体の恒常性維持に極めて重要な役割を果たしている。アポトーシスの機能は個体発生段階における組織形成、免疫システムの調節、傷害を受けた細胞やがん化した細胞の排除等多岐に渡り重要な位置付けがなされている。そして、アポトーシスの制御機構に不具合が生ずることで、細胞のがん化(Hajra and Liu, 2004; Vermeulen et al. 2004; Tanaka and Miyake, 2007)、免疫システムの破綻(Krammer et al., 2007; Opferman, 2008)、神経変性(Abou-Sleiman et al., 2006; Nakamura and Lipton, 2009; Lorz and Mehmet, 2009)等、個体生存維持に重大なダメージを与える疾患が引き起こされることが明らかになっている。

哺乳動物細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路としては主にデスレセプターを介したカスパーゼ-8の活性化に働く経路とミトコンドリアの膜電位喪失に伴うカスパーゼ-9の活性化に働く経路の2つが知られている。

Tumor necrosis factor (TNF) receptor type1 (TNFR1; death receptor 1 [DR1])、 Fas (DR2)、 DR3、 TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (TRAIL receptor 1; DR4, TRAILR2; DR5)、 DR6 は、細胞にアポトーシスを誘導するシグナルを伝達する受容体として知られ、デスレセプターファミリーとして分類されている。これらの受容体は、種々のヒトの疾病における、生理学的および病理学的な多くの現象に関与することが知られている(Ashkenazi and Herbst, 2008; Croft, 2009; Karin and Gallagher, 2009; Strasser et al., 2009; Wilson et al., 2009)。デスレセプターを介するアポトーシスの誘導経路においては、リガンド刺激によりデスレセプター分子が細胞膜上で 3 量体を形成し、レセプターの自己会合によって、レセプターの細胞内領域に存在する death domain (DD)と細胞内アダプター分子 Fas-associated death domain (FADD)が直接、あるいは他の分子を介して間接的に会合する(Ashkenazi and Dixit, 1998)。デスレセプターの 3 量体と会合した FADD は、death effector domain (DED)を介してアポトーシスの誘導に重要なシステインプロテアーゼであるカスパーゼ-8 の前駆体(プロカスパーゼ)と会合し、death-inducing signaling complex (DISC)を形成する。DISC 形成に伴い、プロカスパーゼ-8 は自己開裂により活性型カスパーゼ-8 となり、下流のエフェクターカスパーゼとアポトーシス誘導分子の活性化を伴うカスパーゼカスケードの活性化を通じて細胞内にアポトーシス誘導シグナルを伝達する。

ミトコンドリアは真核細胞内におけるエネルギー生産の場として重要な細胞内小器官であるが、アポトーシスの誘導においても極めて重要な機能を担っており、ミトコンドリアの機能に不具合が起きると、細胞にアポトーシスが誘導されることが知られている。ミトコンドリアを介したアポトーシスシグナル伝達経路は、アポトーシス誘導刺激を受けてミトコンドリア膜透過性が上昇し、ミトコンドリアよりシトクロム c が放出されることにより活性化される。ミトコンドリアより放出された

シトクロム c はそのセンサー分子である Apaf-1 に認識され、Apaf-1 の構造変化に伴いイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ-9 の自己会合が促進され、自己開裂によるカスパーゼ-9 の活性化が起こる。次いで、その下流のエフェクターカスパーゼおよびアポトーシス実行因子が活性化されてアポトーシスが誘導される(図 1)。ミトコンドリア経路を介したアポトーシスにおいては、その誘導および抑制に Bcl2 ファミリータンパク質が深く関与している。Bcl-2 サブファミリーはアポトーシス抑制性の働きをし、一方 Bax サブファミリー、BH3-only サブファミリーは促進的に働く。アポトーシス誘導に関わるデスレセプター経路とミトコンドリア経路は各々が完全に独立した系として存在するわけではなく、デスレセプター経路の活性化は JNK (c-Jun N-terminal kinase)の活性化および Bid の開裂を通じてミトコンドリア膜電位の喪失とカスパーゼ-9 の活性化を誘導することでミトコンドリア経路にも働きかけ、最終的な細胞の生死を調節するために重要な役割を担っている。

Death associated protein 3 (DAP3)は、HeLa 細胞において Interferon- γ (IFN- γ)によって誘導されるアポトーシスの制御に関与する分子として同定された GTP 会合タンパク質である(Kissil et al., 1995)。その後の解析により、DAP3 は TNF- α 、FasL (Fas Ligand)および TRAIL などのデスレセプターのリガンドによるアポトーシスの誘導経路においても重要であることが報告されている(Kissil et al., 1999; Gressner et al., 2005)。特に、TRAIL を介したシグナル伝達経路においては、TRAIL による刺激依存的に、DAP3 は FADD を TRAIL 受容体であるデスレセプター、DR4 および DR5 にリクルートし、カスパーゼ-8 の活性化を通じてアポトーシスの誘導に働くことが報告されている(Miyazaki and Reed, 2001)。この様に DAP3 は細胞質において TRAIL の受容体である DR4、DR5 と会合し、重要な機能を発揮している分子であると考えられているが、その一方

で DAP3 は N 末端領域にミトコンドリア局在シグナル配列を有し、ミトコンドリアにも局在が認められる分子であることが知られている。

DAP3 は進化的に非常によく保存されているタンパク質であり、デスレセプターの存在しない線虫(*Caenorhabditis elegans*)や酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)においてもそのホモログの存在が確認されている。線虫の DAP3 のホモログはヒト子宮頸がん細胞に由来する培養細胞株である HeLa 細胞中で過剰発現させることにより、ヒトの DAP3 と同様にアポトーシスを誘導できることが明らかにされている。このことは DAP3 のアポトーシス誘導に関わる機能が進化的に保存されていることを示している。また酵母における DAP3 のホモログである Ygl129c は酵母細胞を過酸化水素で処理した際の酸化ストレスにより誘導されるアポトーシスを正に制御する分子として知られ、興味深いことに、酵母の DAP3 ホモログは哺乳動物のカスパーゼ-8 に相当する YCA-1(yeast caspase-1)の下流でアポトーシスシグナル伝達に重要な機能を果たしていることが報告されている(Kissil et al., 1999; Berger et al., 2000; Saveanu et al., 2001; Madeo et al., 2002)。これらの報告から、宮崎らによって報告された TRAIL 刺激により誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路における FADD のリクルートとカスパーゼ-8 の活性化に働く経路以外にも、DAP3 が関与するアポトーシス誘導に関わるシグナル伝達経路が存在していることが予想される。

ミトコンドリア局在シグナル配列を含む N 末端領域を欠く DAP3 の変異タンパク質は、TNF- α 、FasL の刺激により誘導されるアポトーシスに対する活性化能が失われ、かつ抑制能も示さないことが報告されている(図 2)。このことから、これらの刺激によるアポトーシスシグナル伝達経路においては DAP3 の N 末端領域に存在するミトコンドリア局在配列が重要な役割を果たしている

と考えられる。デスレセプターを介したシグナル伝達経路においては、ミトコンドリアの膜電位喪失に伴い誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路が重要な役割を果たしており、多くの細胞ではミトコンドリアを介したアポトーシスの誘導を抑制する分子として知られる Bcl-2、Bcl-xL の過剰発現により、デスレセプターを介したアポトーシスの誘導が抑制されることが知られている。ミトコンドリアの膜電位喪失がアポトーシスの誘導調節に重要な働きをしていることは TRAIL 刺激により誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路においても同様であり、ミトコンドリアの膜電位喪失を誘導する JNK の活性化は TRAIL 刺激により誘導されるアポトーシスに対する細胞の感受性を著しく向上させることが報告されている。したがって TNF- α 、FasL、TRAIL 刺激によって誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路においてミトコンドリアに局在する DAP3 がミトコンドリア経路を介したアポトーシスの活性化に働き、カスパーゼ-9 の活性化を通じて、その補助的な機能を果たしている可能性が強く示唆される。

本研究では、ミトコンドリアにおける DAP3 のアポトーシスの誘導に関わる分子機構を明らかにするため、ミトコンドリアに局在する DAP3 会合分子の検索を行った。これまでに本研究室において yeast two-hybrid 法を用いてヒト胎児脳の cDNA ライブラリーより DAP3 との会合が予想される分子のスクリーニングを行った結果、41 クローン、29 種の陽性クローンの遺伝子解析結果が得られている。29 種の陽性クローンがコードするタンパク質のアミノ酸配列を元に web ベースのタンパク質局在予測プログラムである PSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)を用いることで、ミトコンドリアへの局在が予想されるクローンの抽出を行った。その結果、3 種のクローンがミトコンドリア局在シグナル配列を有するタンパク質をコードしていることが明らかとなった。そのうち 2 種のクローンについては既知のタンパク質をコードしていたが、残る 1 クローンは機能的に

未知なタンパク質をコードする KIAA0141 遺伝子であることが明らかとなった。そこで、KIAA0141 遺伝子に注目し、その翻訳産物の機能解析を行うこととした。KIAA0141 遺伝子がコードするタンパク質は 515 個のアミノ酸からなり、そのアミノ酸配列から予想される分子量は約 55kDa であった。本研究では機能的に未知な分子である KIAA0141 分子の哺乳動物細胞内における DAP3 会合能の解析および細胞内局在性の解析を行い、また、デスレセプターを介したアポトーシスシグナル伝達経路における機能について過剰発現系、および siRNA を用いた発現抑制系を用いて解析を行った。本研究の成果により、デスレセプターを介したアポトーシスシグナル伝達経路における重要性が明らかとなったため、KIAA0141 遺伝子産物を death ligand signal enhancer (DELE)と名付けた。

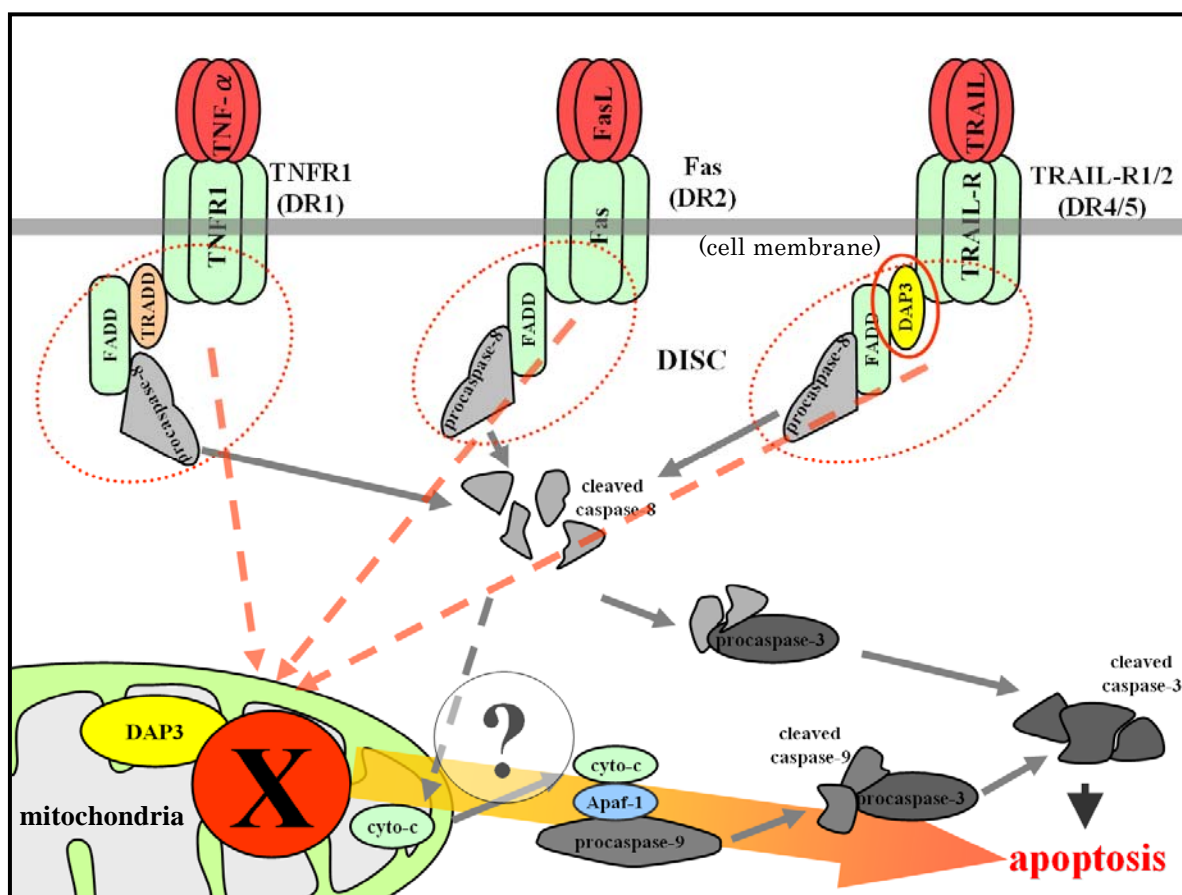


図 1. デスレセプターを介したアポトーシスシグナル伝達経路における DAP3 の機能

細胞にアポトーシスを誘導する経路としては、FADD を介しカスパーゼ-8 の活性化に働くデスレセプター経路とミトコンドリア膜電位の喪失から Apaf-1 を介したカスパーゼ-9 の活性化に働くミトコンドリア経路の2つの経路が主要な経路として知られている。これら2つの経路は共に下流のエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ-3 を開裂、活性化し、カスパーゼ-3 がアポトーシス実行分子の活性化を行うことでアポトーシスを誘導する。DAP3 は TRAIL の受容体である DR4 および DR5 と会合し、その直下で FADD のリクルートとカスパーゼ-8 の活性化を通じてアポトーシスを誘導する。一方、TNF- α 、FasL 刺激により誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路においては、ミトコンドリアに局在する DAP3 がアポトーシス誘導に関っていると考えられている。デスレセプターを介したアポトーシス誘導経路は FADD を介したカスパーゼ-8 の活性化に働くが、同時にミトコンドリア膜電位の喪失を亢進させ、ミトコンドリア経路の活性化に働くシグナルも伝達する。進化的に極めて良く保存された DAP3 にはデスレセプターの存在しない生物種にもホモログの存在が認められ、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスシグナル伝達経路においても重要な働きをしていると推測されるが、その経路に関わる分子、およびその活性化機構はほとんど明らかにされていない。

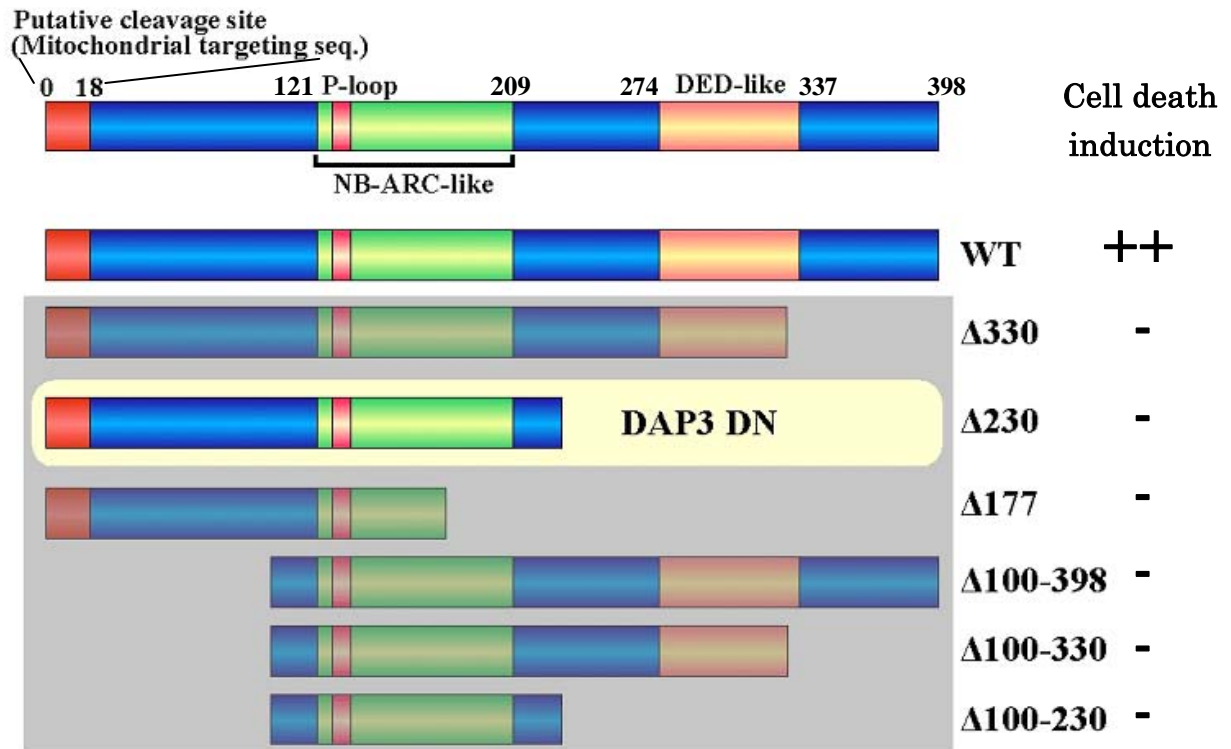


図 2 DAP3(death associated protein 3)タンパク質およびそのアミノ酸欠失変異体の構造

DAP3 タンパク質の種々の欠失変異体について図示した(Kissil et al., 1999)。DED (death effector domain)様の構造領域を欠くDAP3の変異タンパク質は、ドミナントネガティブ変異体として働く。また、ミトコンドリア局在シグナル配列を含むN末端領域を欠くDAP3の変異タンパク質は、TNF- α 、FasLの刺激により誘導されるアポトーシスに対する活性化能が失われ、かつ抑制能も示さない。したがってTNF- α およびFasL刺激により誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路におけるDAP3のアポトーシス誘導に関する機能にはミトコンドリア局在シグナル配列の存在が必要であると考えられる。

材料と方法

1. 細胞培養と遺伝子導入

本研究では、ヒト非小細胞性肺癌由来培養細胞株 A549 細胞、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞およびヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞を用いた。なお、A549 細胞は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより供与されたものを用いた。これらの細胞株は、10%の非働化したウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(Sigma, St, Louis, MO, US)中で、37°C、5% CO₂ 条件下で静置培養した。

培養細胞への遺伝子導入はリポフェクトアミン 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)を用いた。250 μ l の Opti-Mem (Invitrogen)に 10 μ l のリポフェクトアミンを添加した混合液を 5 分間室温でインキュベートしたのちに、250 μ l の Opti-MEM に最大 4 μ g の発現ベクターを添加したものと混合した。この混合液を 20 分間室温でインキュベートし、6 ウェルプレートに 50%コンフルエントとなる様に播種した細胞に添加し、遺伝子導入した。

2. サイトカインおよび抗体

培養細胞のアポトーシス誘導には、ヒト組み換え可溶性 TRAIL (Superkiller TRAIL; Alexis biochemicals, San Diego, CA, US)、抗 CD95 モノクローナル抗体(抗 Fas 抗体: Beckman Coulter, Inc. CA, US)、およびヒト組み換え TNF- α (PEPROTECH Inc. New Jersey, US)を用いた。TNF- α 、抗 Fas 抗体による細胞死の誘導には、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(Wako Pure Chemical Industries. Ltd. Osaka Japan)を終濃度 10 μ g/ml となる様に添加した。タンパク質の解

析のために行ったイムノブロット法には、特異的抗体として、ラット抗 HA モノクローナル抗体 (Roche, Mannheim, Germany)、マウス抗 GFP モノクローナル抗体(Roche)、ウサギ抗カスパーゼ-3 抗体(Cell signaling technology, Beverly, MA, US)、ウサギ抗開裂カスパーゼ-9 抗体(Asp330; Cell signaling)、抗カスパーゼ-8 モノクローナル抗体(Cell signaling)、および HRP 結合抗 FLAG モノクローナル抗体(Sigma)を用いた。

3. 遺伝子発現プラスミドベクターの構築および siRNA のトランスフェクション

ヒト DELE の cDNA (KIAA0141; NCBI Reference Sequence: NM_014773) クローンは、財団法人かずさ DNA 研究所(Chiba, Japan)より提供されたものを用いた。DELE 遺伝子の C 末端側に EGFP タグ、あるいは HA タグをつけた発現ベクターは、PCR 法を用いて作製した。DELE 遺伝子発現用レトロウイルスベクターの作製は、DELE 遺伝子 cDNA のコード領域を PCR 法で増幅し、pMX-IRES-EGFP (Cell Biolabs, San Diego, CA, US)に挿入し作製した。FLAG タグをつけた DAP3 遺伝子発現ベクターは、宮崎らが作製したものを用いた。

DELE 特異的 siRNA は、市販されているもの 3 種を用いた(Applied biosystems, Foster City, CA, US)。250 μ l の Opti-Mem に 5 μ l のリポフェクトアミンを添加した混合液を 5 分間室温でインキュベートしたのちに、250 μ l の Opti-MEM に 200 pmol の siRNA を添加したものと混合した。この混合液を 20 分間室温でインキュベートし、6 ウェルプレートに 50%コンフルエントとなる様に播種した細胞に添加し遺伝子ノックダウンを行った。

4. 免疫沈降法

6 ウェルプレートに 2×10^5 細胞/ウェルとなる様に HEK293T 細胞を細胞を播種し、DAP3 および DELE の発現ベクターを、各々 $2 \mu\text{g}$ ずつトランスフェクションした。24 時間後に細胞を集め、PBS(-)で 2 回洗浄した後、プロテアーゼインヒビターカクテル(Complete Mini I, Roche)を含む lysis buffer (0.5 % Nonidet-P40, 20 mM Tris-HCl [pH 7.4])を用いて溶解させ、 4°C 、 $15,000 \times g$ の条件で 20 分遠心し、総細胞抽出液を得た。FLAG タグを付けたタンパク質の免疫沈降は総細胞抽出液を anti-FLAG M2 agarose (Sigma)と混合し、 4°C でローテーターを用いて一晩混和させることにより行った。また、EGFP と融合させたタンパク質の免疫沈降は総細胞抽出液を Protein-G Shepharose (GE Healthcare, Munich, Germany)およびマウス抗 GFP 抗体(Roche)と混合し、 4°C で 1 時間混和させることで行った。その後、lysis buffer で担体を 3 回洗浄し、2x SDS-PAGE gel loading buffer 中で 5 分間ボイルすることにより、担体に結合したタンパク質を溶出させた。溶出させたサンプルは、SDS-PAGE による分画後、DAP3 および DELE 等に対する特異的抗体を用いたイムノブロット法による解析に供した。

5. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびイムノブロットング法による解析

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS (Sodium dodecyl sulfate)-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)は、1 mm 厚、 $90(\text{W}) \times 85(\text{H})$ mm のミニスラブゲルを用い、 20 mA/gel の定電流で行った。泳動後のゲルの PVDF 膜(Polyvinylidene difluoride; Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, US)への転写は、セミドライブロットング装置(AE-6677: ATTO CORPORATION, Tokyo, Japan)を用い、blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS,

20% methanol)中、90 mA の定電流で1時間エレクトロトランスファーすることで行った。抗体によるタンパク質の検出は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)と HRP 標識抗体を用いた発光検出法で行い、Light-Capture AE-6971C (ATTO)を用いて撮影した。

6. 細胞内局在の解析

HeLa 細胞を 4 well chamber slide に 5×10^4 細胞/ウェルとなる様に播種し、C 末端側に EGFP を融合させた DAP3 あるいは DELE の発現ベクターと、シトクロム c オキシダーゼ VIII サブユニット由来のミトコンドリアターゲット配列を有する赤色蛍光タンパク質発現ベクター(pDsRed2 Mito; Clontech)と共にトランスフェクションした。トランスフェクションした 24 時間後に細胞を PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定を行った後、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)を含有する封入剤で封入し、封入した試料は共焦点レーザー顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan)を用いて細胞内におけるタンパク質の局在を解析した。

7. DELE タンパク質特異的抗体作製のための DELE 抗原タンパク質の調製

大腸菌 BL21(DE5)株を GST と融合させた完全長の DELE (GST-DELE WT)および DELE の 355-515 アミノ酸領域(GST-DELE Δ NH)を発現するプラスミドでトランスフォームさせた。LB 培地中(1%[w/v] Bacto Tryptone [Becton Dickinson [[BD]], Sparks, MD], 0.5%[w/v] Bacto Yeast Extract [BD], 1%[w/v] NaCl)でトランスフォームさせた大腸菌を $OD_{600}=0.6$ 程度に達するまで 37°Cで振盪培養し、終濃度 1 mM の IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside:Wako)を添加後、さらに 3 時間 37°Cで振盪培養することにより、GST 融合タンパク質の発現誘導を行った。

発現誘導後の大腸菌を遠心分離により集め、TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl)に懸濁し、超音波破碎機(SONIFIER 250 Branson, Danbury, CT)で破碎した後、10,000rpm、10 分間、4°Cで遠心し、沈殿を集めた。沈殿を4% Triton X-100を含むTE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA)で懸濁し、室温で10分間振盪させた。その後10,000xg、10分間、4°Cで遠心し、集めた沈殿を、再度4% Triton-X100を含むTEに懸濁し、同様に室温で10分間振盪後、遠心分離により沈殿を集めた。この沈殿を封入体画分として、SDS-PAGE gel loading buffer 中で15分間 boil することにより可溶化し、SDS-PAGE で分画した。分画後のゲルを Quick-CBB (Wako) で染色した後、目的のタンパク質のバンドを切り抜き、ゲルをすりつぶした後、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、4% SDS、10 μ l/ml β -メルカプトエタノール中で一晩、室温で浸透することにより、タンパク質の抽出を行った。抗原のウサギへの免疫は外部の業者に委託することで行った (GST-DELE Δ NH については Hokkaido System Science, Hokkaido, Japan; GST-DELE WT については, IBL, Gunma, Japan)。

8. PVDF 膜を用いた DELE 特異的抗体の精製

ウサギ抗血清の作製に用いた DELE 抗原タンパク質を SDS-PAGE で分画し、エレクトロトランスファー法によって PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore)に転写した。PVDF 膜を Quick-CBB で染色することによって可視化させた目的のタンパク質を含むバンドを切り出した。切り出したメンブレンを100%メタノール中で振盪することにより脱色後、超純水で洗浄し、約 1x2 mm 角に細切したものを抗体精製用 PVDF 膜として用いた。同様に GST タンパクを転写した PVDF 膜も作製した。

抗体精製用 PVDF 膜は、20 mg/ml ウシ血清アルブミン(BSA)を含む PBS 中で室温 1 時間振盪することによりブロッキングを行い、DELE タンパク質で免疫されたウサギの抗血清を加えて室温で 1 時間振盪し、DELE 特異的抗体を吸着させた。その後、メンブレンを 0.5% Tween20 を含む PBS で 3 回、0.15 M NaCl で 2 回洗浄した。上清を完全に除去した後、0.1 M glycine-HCl (pH 2.5)で、吸着した抗体の溶出を行い、溶出した抗体溶液に 1/20 量の 2 M Tris-BSA (2 M Tris base, 20 mg/ml BSA, 5 mM NaN₃)を添加し、中和させた。この抗体溶液を GST タンパク質を転写した PVDF 膜と 4°C、一晩反応させ、GST タンパク質と反応する抗体を吸収したものを、DELE 特異的精製抗体として用いた。

9. リアルタイム RT-PCR および半定量的 RT-PCR

細胞からの総 RNA 抽出は、10⁶ 個の細胞あたり 500 μl の TRIzol Reagent (Invitrogen)を用いて行った。抽出した RNA (2 μg)を鋳型にし、逆転写酵素(RevaTra Ace; Toyobo. Osaka, Japan)を用いて cDNA 合成を行った。また、乳がん組織に由来する total RNA は市販のインフォームドコンセントの得られた患者組織から単離された RNA を用いた(qPCR Human Breast Matched Pair Total RNA Panel; Clontech)。

半定量的 RT-PCR は、ExTaq DNA ポリメラーゼ(Takara, Otsu, Japan)により model 2720 thermal cycler (Applied Biosystems)を用いて行った。25 μl の反応系において 1 μg のテンプレート cDNA を用い、熱変性(96°C 10 秒)-アニーリング(58°C 10 秒)-相補鎖合成(72°C 30 秒)を 1 サイクルとして、28 サイクルの反応条件で行った。PCR 反応生成物は 2%アガロースゲル中で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して UV イルミネーターで検出した。

リアルタイム RT-PCR は、SYBR Premix ExTaq II DNA ポリメラーゼ(Takara)により、MX3000 quantitative PCR system (Stratagene, La Jolla, CA, US)を用いて行った。25 μ l の反応系において酵素メーカーのプロトコルに従った試薬用量で 1 μ g のテンプレートを用い、熱変性(96°C 10 秒)-アニーリング(58°C 10 秒)-相補鎖合成(72°C 30 秒)を 1 サイクルとして、40 サイクルの反応条件で行った。増幅反応に用いるプライマーは DELE mRNA を特異的に増幅するプライマーセットおよび GAPDH mRNA を特異的に増幅するプライマーセット(Vandesompele et al., 2002)を用いた(表 1)。リアルタイム PCR 反応の解析は、MX3000 quantitative PCR system の専用プログラム MXPro を用いて行い、DELE mRNA 発現量は、GAPDH mRNA を内部標準として用い、サンプル間の相対的な比率で表した。

10. DELE 遺伝子恒常発現細胞クローンの樹立

レトロウイルスベクターのパッケージングおよび HeLa 細胞と A549 細胞への感染は、Platinum Retroviral Expression System, Pantropic (Cell Biolabs, San Diego, CA)を用いて、Plat-GP 細胞にパッケージング用 DELE ベクターおよび pVSV-G 発現ベクターを共発現させてレトロウイルスベクターを生成させ、このレトロウイルスベクターを感染させることで行った。レトロウイルスベクターの感染後、A549 細胞を限界希釈法でクローン化し、ベクターの発現カセットに組み込まれた GFP の発現を指標として発現カセットがゲノムに組み込まれた細胞の検出およびスクリーニングを行った。その後、リアルタイム RT-PCR 法により、各細胞クローンにおける DELE mRNA の発現量を解析した。

11. 細胞生存率とカスパーゼ活性化の測定

細胞の生存率は、細胞を96ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルとなる様に播種し、リガンド刺激を加えた後、所定の時間に Cell Counting Kit 8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)試薬を各ウェル10 μ l 加えてプレートシェーカーで混和した後 37°Cで 30 分インキュベートし、プレートリーダー (Model 680; Bio-Rad Laboratories, Inc. Tokyo, Japan)を用いて 570nm の吸光度を測定することにより解析した。

カスパーゼ活性の定量化は、細胞を96ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルとなる様に播種し、リガンド刺激を加えた後、所定の時間が経過した時点で 100 μ l の Caspase-Glo Assay Kit (Promega, San Luis Obispo, CA, US)試薬を加え、室温で 30 分インキュベートし、化学発光測定装置(Mithras LB940; BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co KG, Bad Wildbad, Germany)を用いて解析した。

表1 DELE リアルタイムRT-PCRに用いたプライマー

プライマー		配列
DELE	Sense	5'-TTCCAGCTCAGTGTTTCCATC-3'
DELE	Antisense	5'-GTAGTAGGCACCTGGCATAG-3'
GAPDH	Sense	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
GAPDH	Antisense	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

表2 本研究において用いた発現ベクター

ベクター	挿入遺伝子	エピトープタグ	プロモーター
pcDNA3-FLAG		FLAG	CMV
pcDNA3-DAP3-FLAG	DAP3	FLAG	CMV
pcDNA3.1(+)-HA		HA	CMV
pcDNA3.1(+)-DELE-HA	DELE	HA	CMV
pcDNA3.1(+)-DELE-HA	DELE(WT)	HA	CMV
pcDNA3.1(+)-DELE Δ N115-HA	DELE(Δ N115)	HA	CMV
pEGFP N ₁ -DELE	DELE(WT)	GFP	CMV
pEGFP N ₁		GFP	CMV
pGEX6p-2		GST	tac
pGEX6p-2-DELE(WT)	DELE(WT)	GST	tac
pGEX6p-2-DELE(Δ HN)	DELE(Δ HN)	GST	tac
pMX-IRES-EGFP			MuLV-LTR
pMX-IRES-EGFP-DELE	DELE		MuLV-LTR
pVSV-G			CMV
pDsRed-Mito			CMV

結果

1. ミトコンドリアに局在する新規 DAP3 会合分子 DELE の同定

Death associated protein 3 (DAP3)が関与するアポトーシス誘導の分子機構を明らかにするために、本研究室では、ヒト胎児脳の cDNA ライブラリーに対して、yeast two-hybrid 法を用いて DAP3 に結合する分子の探索を行い、その結果、武田らによって報告された LIP1 (LKB1 interacting protein 1 (Takeda et al., 2007))をはじめとして、いくつかの DAP3 と会合することが予測される分子のクローンが得られている。DAP3 はミトコンドリアにも局在が認められる分子であり、その N 末端領域に存在するミトコンドリア局在シグナル配列を含む領域が、TNF- α および FasL 刺激により誘導されるアポトーシスを促進するために重要であることが報告されている。その一方で、ミトコンドリアに局在する DAP3 のアポトーシス誘導に関わる分子、およびその機構については殆ど明らかにされていない。これまでに、DAP3 を bait とした yeast two-hybrid 法によるスクリーニングの結果、DAP3 と会合が予想される陽性クローン、全 41 クローンの遺伝子解析により、DAP3 と会合が予想される 29 種の分子が明らかにされている。本研究では、ミトコンドリアに局在する DAP3 のアポトーシスシグナル伝達経路に関わる分子と、その分子機構を明らかにすることを目的として、これら 29 種の分子のアミノ酸配列に対して web ベースのタンパク質局在予測プログラムである PSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)を用いて局在部位の解析を行った。その結果、これらのクローン中にはミトコンドリアに局在することが予想される 3 種の分子が含まれており、それらのうち 2 種は前述の LIP1 を含む既知の分子であった。一方、残る 1 種は KIAA0141 遺伝子によりコードされる機能的に未知な分子であることが明らかとなった。

KIAA0141 は、ポストゲノムプロジェクトの 1 つとして、ヒトで発現している長鎖 mRNA を網羅的に解析することを目的として行われた HUGE (Human Unidentified Gene-Encoded Large Proteins: <http://www.kazusa.or.jp/huge/>; Nagase et al., 1996)プロジェクトによって見出された分子である。本研究では、後述するようにこの KIAA0141 遺伝子の翻訳産物がデスレセプターを介したシグナル伝達経路に促進的に働く分子であることが明らかとなったことから、当該分子を DELE (death ligand signal enhancer)と命名した。なお、以下の解析では KIAA0141 遺伝子産物を DELE と記す。

2. DELE タンパク質のドメイン構造

DELE タンパク質内の予測されるドメイン構造を、図 3 に示す。DELE 遺伝子の塩基配列から、その翻訳産物は 515 個のアミノ酸からなる予想される分子量が約 55kDa のタンパク質であることが明らかとなった。前述のタンパク質局在予測プログラム PSORT II を用いた解析により、N 末端側にミトコンドリアターゲット配列を有することが示唆され、NCBI の Conserved Domain Database (CDD)による一次構造の解析では 246-272 番目のアミノ酸および 386-420 番目のアミノ酸の領域にタンパク質相互の結合に関与するモチーフである TPR (tetratricopeptide repeat)配列を有することが示された(Lamb et al., 1995; Das et al., 1998; D'Andrea and Regan, 2003)。また、生物の進化の過程で比較的遠縁にあたるタンパク質間の相同性を見出すことを目的として作られたホモロジー解析プログラムである PSI-BLAST により、タンパク質の立体構造データベース(PDB:Protein Data Bank)を用いてホモロジー検索を行うと、カスパーゼ-9 の CARD (caspase recruiting domain)と弱い相同性が認められる領域が 209-283 番目のアミノ酸

領域に存在することが明らかとなった。

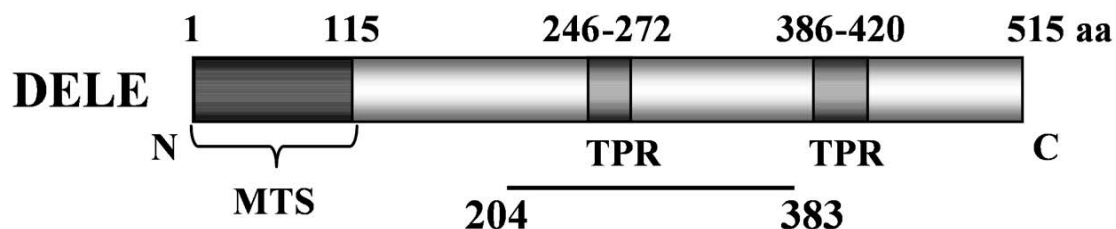


図3. DELEタンパク質内の予測されるドメイン構造

PSORT II により予測されたミトコンドリア局在配列MTS (mitochondria targeting sequence) およびCDD (conserved domain database)を用いた解析により予測されたDELEの機能ドメインであるTPR (Tetratricopeptide repeat)モチーフ配列の位置を図に示した。傍線で示した204-383番目のアミノ酸領域は、yeast two-hybrid法で得られた陽性クローンがコードしていた領域を表す。

3. 免疫沈降法による哺乳類の培養細胞内における DAP3 と DELE の会合の解析

Yeast two-hybrid 法はタンパク質間の会合を検出するスクリーニングの方法としては優れた方法であるが、その一方で、細胞内での会合性を示さない偽陽性クローンが多数得られてくることが欠点として挙げられる。そこで、yeast two-hybrid 法によるスクリーニングによって DAP3 と会合が予想される分子として見出された DELE が、実際に哺乳動物細胞内で DAP3 との会合能を有するか否かを確認するために、免疫共沈降法による解析を行った。FLAG タグをつけた DAP3 (DAP3-FLAG) 遺伝子と HA タグをつけた DELE (DELE-HA) 遺伝子の発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞を集め、その総細胞抽出液を調製した。その総細胞抽出液に対して、抗 FLAG 抗体が結合したアガロースビーズを用いて免疫沈降を行った。その結果 DAP3-FLAG 遺伝子を発現させた細胞では、DAP3-FLAG と共に DELE-HA が沈降されることが明らかとなった(図 4)。DELE の発現量は DAP3 に対して比較的弱く、相対的に DAP3 と共沈される DELE のシグナルは弱くなったものの、FLAG タグのみを発現するコントロールベクターをトランスフェクションした細胞では DELE の沈降は認められなかったことから、その会合が特異的であることが示された。以上の結果より、実際に哺乳動物細胞内で DELE が DAP3 との会合能を有することが明らかとなった。

FLAG vector	+	+	-	-
DAP3-FLAG	-	-	+	+
HA vector	+	-	+	-
DELE-HA	-	+	-	+

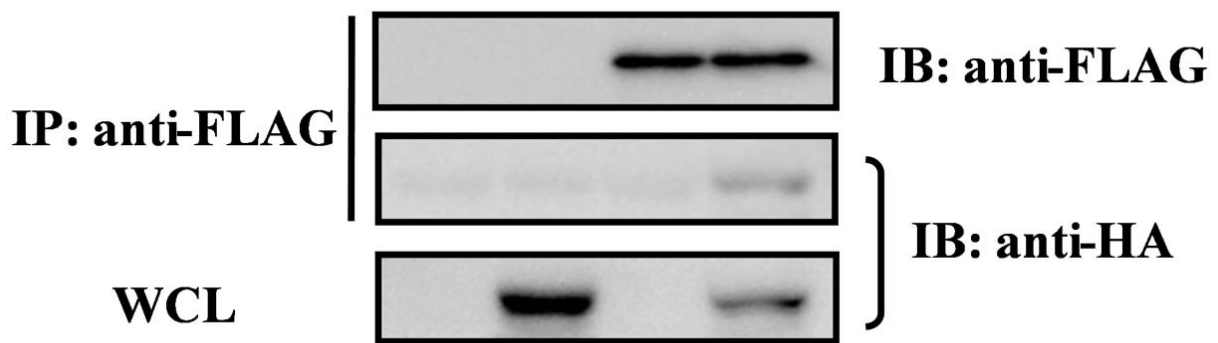


図4. 免疫共沈降法によるDELEとDAP3の細胞内会合能の解析

HEK293T細胞に、図中に示した遺伝子発現プラスミドをトランスフェクションした。その24時間後に細胞を集め、細胞の総抽出液(whole cell lysate:WCL)より、抗FLAG抗体結合アガロースビーズを用いてFLAG-DAP3タンパク質を免疫沈降(immuno precipitation:IP)させた。免疫沈降された分画はその後、抗HA抗体または抗FLAG抗体を用いたイムノブロット(immuno blot:IB)による解析に供した。

(IP:免疫沈降, IB:イムノブロット)

4. 共焦点レーザー顕微鏡による DELE の細胞内局在部位の解析

前述した様に、PSORT II を用いた解析により、DELE の N 末端領域にはミトコンドリア局在シグナル配列が存在し、DELE はミトコンドリアに局在するタンパク質であることが予想された。このことを確認するために、DELE の C 末端側領域に EGFP (enhanced green fluorescent protein; オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)由来の改変緑色蛍光タンパク質)を融合させたタンパク質 (DELE-EGFP)の遺伝子を発現するベクターを構築した。DELE-EGFP および DAP3 と EGFP の融合タンパク質(DAP3-EGFP)をコードする遺伝子を発現するベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、それぞれのタンパク質の細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。なお、ミトコンドリアの局在マーカーとしてシトクロム c オキシダーゼのサブユニット VIII に由来するミトコンドリア局在シグナル配列を有する造礁サンゴ(*Discosoma* sp.)由来の赤色蛍光タンパク質(DsRed)の遺伝子発現ベクター(pDsRed-Mito; Clontech)を用いた。なお DELE-EGFP の発現は EGFP 単体や DAP3-EGFP の発現との比較では相対的に弱かったが、DELE-EGFP を発現させた細胞を長時間培養すると HA タグを付けた DELE タンパク質を発現させた場合と同様に細胞死が誘導されることから、トランスフェクション後 24 時間の細胞を用いて細胞内局在の解析を行った。また、このことから EGFP を融合することによって基本的な DELE の分子機能に変化は生じていないと考えられた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて DELE-EGFP および DAP3-EGFP の細胞内局在を解析した結果、DELE-EGFP および DAP3-EGFP の緑色蛍光は、いずれもミトコンドリア局在マーカータンパク質の赤色蛍光とほぼ一致して観察された(図 5)。これらのことから、DELE の細胞内局在は PSORT II を用いて予測された結果と一致し、主にミトコンドリアに局在するタンパク質であることが明らかとなった。また、DELE-EGFP と DAP3-EGFP

の細胞内局在についてもほぼ一致して観察されることから、先に示した DELE と DAP3 が哺乳動物細胞内において会合能を有するという結果と併せて、DELE が DAP3 の機能制御に関与している可能性が強く示唆された。

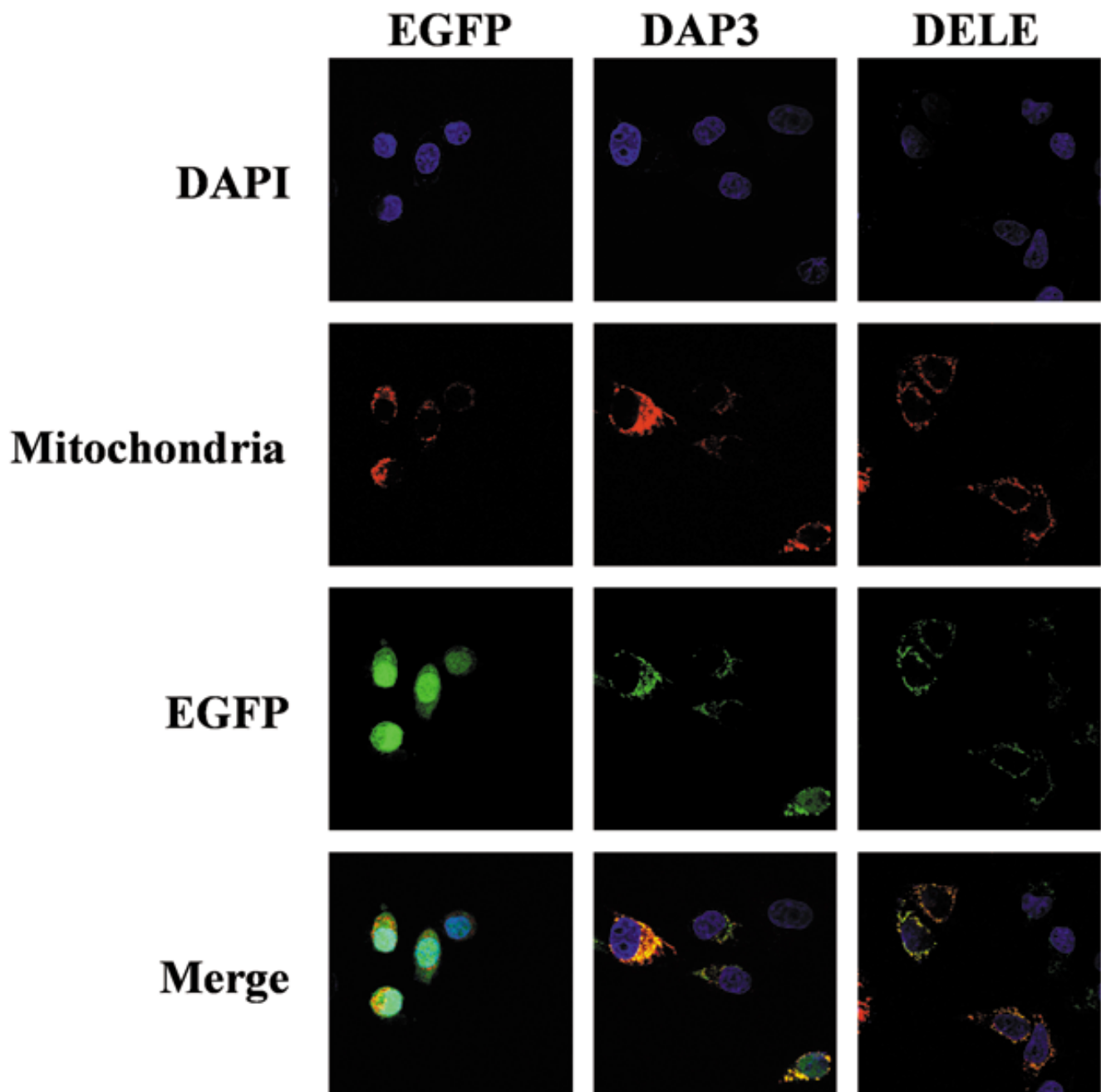


図5. DELEの細胞内局在解析

EGFPと融合させたDAP3およびDELEタンパク質をコードする遺伝子の発現ベクタープラスミドをCOXVIII由来のミトコンドリア局在シグナルを有する赤色蛍光マーカータンパク質の発現ベクタープラスミド(pDsRed2 Mito; CLONTECH)と共にHeLa細胞にトランスフェクションした。24時間後に細胞を固定、DAPI染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各々のタンパク質の細胞内局在を観察した。(倍率:400倍)

5. DELE タンパク質を特異的に認識する抗体の作製

DELE を介したアポトーシス誘導に関わるシグナル伝達経路とその分子機構を明らかにするためには、内在性の DELE の質的、量的な変化を観察することが重要であり、そのためには内在性の DELE を検出する抗体を得ることが必要であると考えられた。そこで、大腸菌で組み換え DELE を発現させ、その組み換えタンパク質を抗原としてウサギに免疫し、DELE 特異的な抗体の作製を試みた。完全長および DELE の 355-515 アミノ酸領域(DELE Δ NH)と GST (glutathione S-transferase)の融合タンパク質を tac プロモーター(大腸菌由来の trp プロモーターと lac プロモーターを融合させた高発現型プロモーター)制御下で発現するベクターを構築し、その大腸菌内での発現を確認した。その結果、完全長および DELE Δ NH と GST の融合タンパク質は IPTG の添加により大腸菌内で発現が誘導されることが明らかとなった(図 6)。しかし、これら 2 種の融合タンパク質は可溶性が低く、可溶画分に回収することが出来なかったため、これら融合タンパク質を発現させた大腸菌から封入体を調製し、SDS-PAGE で分画した後、バンドを切り出すことにより部分的に精製したタンパク質を抗原として用いることにした。

抗原の精製を行ったところ、GST-DELE Δ NH の収量が相対的に高かったため、まず、これを抗原としてウサギに免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清を抗原として用いた GST-DELE Δ NH 融合タンパク質を転写した PVDF 膜を用いて DELE Δ NH を認識する抗体を分画し、次いで GST タンパク質を転写した PVDF 膜での吸収を行い、GST と反応する抗体を除去することにより、抗体の精製を行った。抗体の特異性を検討するため、HEK293T 細胞に HA タグを付けた DELE タンパク質(DELE-HA)を発現するベクターをトランスフェクションし、総細胞抽出液を抗原としてイムノブロット法による解析を行った。その結果、過剰発現させた DELE-HA を特異

的に認識する抗体は得られたが、この方法で得られた抗体で内在性 DELE を検出することはできなかつた (図 7A)。

そこで、完全長の DELE と GST の融合タンパク質(GST-DELE WT)を発現させた大腸菌より封入体を調製し、SDS-PAGE で分画後、ゲル切り抜きによって精製し、これを抗原として再度ウサギへの免疫を行った。得られた抗血清より GST-DELE Δ NH と同様に PVDF 膜を用いて抗体の精製を行った。この抗体の特異性について HEK293T 細胞で過剰発現させた DELE-HA を用いてイムノブロット法による解析を行ったところ、過剰発現させた DELE-HA を特異的に検出することが可能であったが、GST-DELE WT を抗原として用いた場合においても内在性の DELE を検出することはできなかつた(図 7B)。

本研究で作製した 2 種の抗体が内在性 DELE を検出できなかった理由については、後述するように、DELE タンパク質は比較的細胞内での半減期が短いことが予想されるため、作製した抗体では全長の DELE タンパク質が検出できない可能性と、内在性の DELE がリン酸化や糖鎖付加等、何らかの翻訳後修飾を受けており、そのために検出できない可能性の 2 つの可能性が考えられた。

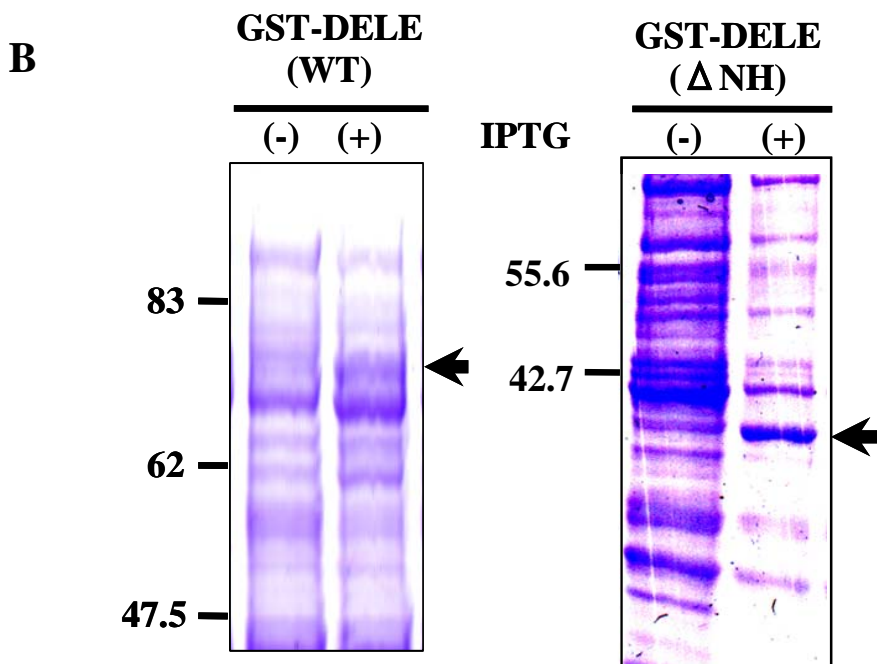
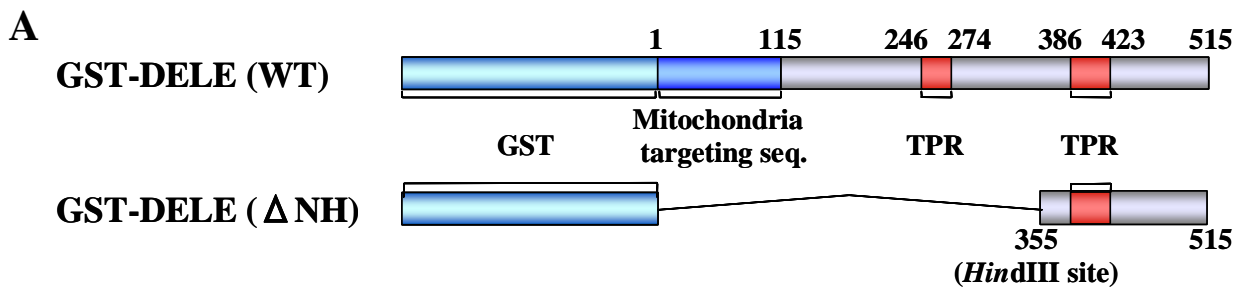


図 6. 組換え DELE-GST 融合タンパク質の発現解析

A: 組換え GST 融合 DELE タンパク質のアミノ酸構造。GST と融合させた完全長 DELE (GST-DELE [WT])および N 末端領域の 354 アミノ酸を欠く DELE(GST-DELE[Δ NH])のアミノ酸構造を示した。

B: GST-DELE (WT)および GST-DELE(Δ NH)を発現するプラスミドを導入した BL21(DE5)細胞を LB 培地中 $OD_{600}=0.6$ となるまで、 37°C で振とう培養した。その後、終濃度 1mM となるよう IPTG を添加し 37°C 、3時間振とう培養することにより、組換えタンパク質の発現誘導を行った。発現誘導させた大腸菌を集め、その総細胞抽出液を SDS-PAGE で分画した。分画後のゲルを CBB(Quick-CBB; Wako)で染色し、それぞれのタンパク質の発現誘導について解析を行った。また、コントロールとして IPTG による発現誘導を行わなかった大腸菌の総細胞抽出物を用いた。

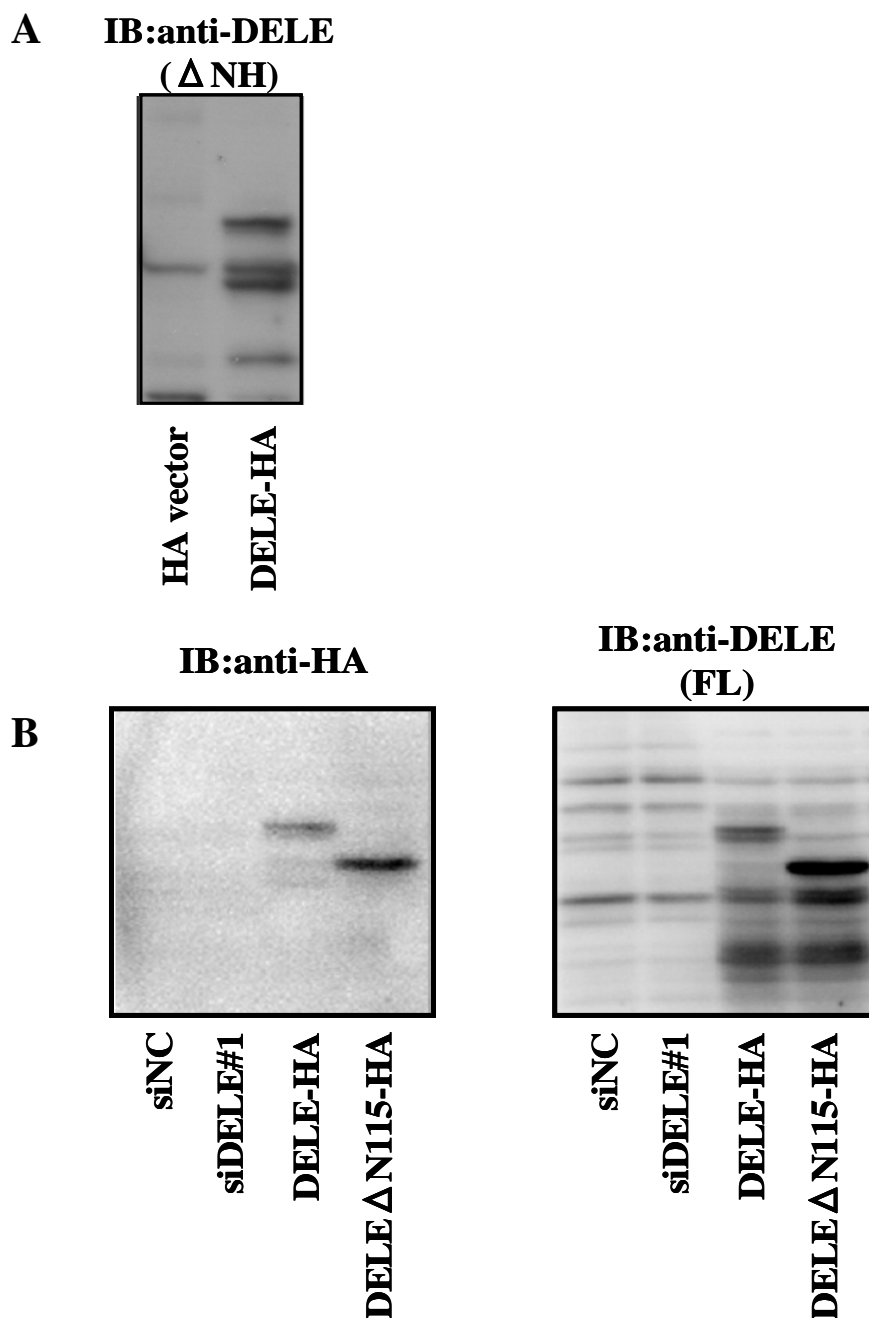


図 7. 精製した DELE 特異的抗体による DELE タンパク質の検出

A: HA-タグを付けた DELE の発現ベクターおよび、コントロールベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後の細胞を集め、その総細胞抽出液に対し、GST-DELE ΔNH を抗原として免疫したウサギの抗血清より精製した抗 DELE 抗体を用いて、イムノブロッティング法により解析した。

B: HeLa 細胞にコントロール siRNA (si-NC)、DELE 特異的 siRNA (siDELE#1)、HA タグを付けた DELE の発現ベクター (DELE-HA) および N 末端領域 115 アミノ酸を欠く DELE の発現ベクター (DELE ΔN115-HA) をトランスフェクションした。24 時間後の細胞を回収し、その総細胞抽出液に対し、抗 HA 抗体および GST-DELE WT を抗原として免疫したウサギより精製した抗 DELE 抗体を用いてウエスタンブロッティング法により解析した。

6. DELE 遺伝子を恒常的に発現する細胞における TNF- α および TRAIL 刺激に対する感受性の解析

HeLa 細胞に DELE 遺伝子を一過的に過剰発現させると、細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった(図 8)。位相差顕微鏡下の観察ではアポトーシスに特徴的な細胞質の凝縮を伴う変性した細胞が認められ、また細胞死の結果生じた浮遊している細胞の断片が観察された。このことから、DELE の過剰発現により誘導される細胞死はアポトーシスであると予想され、DELE がアポトーシス誘導に関わるシグナル伝達経路を活性化させる分子である可能性が考えられた。DELE と会合する分子である DAP3 は、アノキス、酸化ストレス誘導性アポトーシスおよび炎症性サイトカイン誘導性アポトーシスなど、様々なアポトーシスの誘導において重要な働きをすることが知られている(Miyazaki et al., 2004; Li et al., 2009; Murata et al., 2006)。本研究では、これらの中から TNF スーパーファミリーに属する TNF- α 、FasL および TRAIL 刺激により誘導されるデスレセプターを介したアポトーシス誘導に注目し、これらのシグナル伝達経路における DELE の機能を解析するために、DELE 遺伝子を恒常的に発現する細胞クローンの樹立を試みた。DELE 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを HeLa 細胞に感染させ、ウイルスベクターが感染した細胞を限界希釈法によりクローニングした。得られたクローンのうち 3 クローンの細胞内の DELE mRNA 発現量について半定量的 RT-PCR およびリアルタイム PCR 法を用いて解析した結果、DELE 遺伝子を発現させた HeLa 細胞クローンは、挿入遺伝子を有さないコントロールベクターを感染させた細胞と比較して、10 倍程度と極めて低い DELE mRNA の発現しか認められなかった(図 9A)。このことから、HeLa 細胞は、DELE の過剰発現に対する感受性が高く、DELE の発現が高い細胞が細胞死を引き起こしてしまうために、HeLa 細胞を用いて DELE を恒常

的に高発現するクローンを得ることは困難と考えられた。そこで、DELE 遺伝子を導入する細胞株として、TNF- α 、FasL および TRAIL により誘導されるアポトーシスに対する感受性が低いことが報告されている (Lee et al., 1999; Zhu et al., 2004) 培養細胞株である、ヒト非小細胞性肺癌細胞に由来する A549 細胞を用いて、再度 DELE を恒常的に発現する培養細胞株の樹立を試みた。その結果得られたクローンのうち、3 クローンの細胞内における DELE mRNA 発現量について、半定量的 RT-PCR およびリアルタイム PCR 法を用いて解析した。その結果、図 9B に示した様に、DELE 遺伝子を発現させた A549 細胞クローンは、挿入遺伝子を有さないコントロールベクターを感染させた細胞と比較して、約 30~100 倍程度の DELE mRNA を発現していることが明らかになった。

次に、これらの DELE 遺伝子を恒常的に発現する A549 細胞株において TNF- α および TRAIL 刺激により誘導される細胞死に対する感受性について解析した。DELE 遺伝子を恒常的に発現する細胞株を TNF- α または TRAIL で刺激し、刺激後の細胞生存活性を Cell Counting Kit 8 (Dojindo) を用いて測定した。これらの結果より、未刺激の細胞に対して刺激した細胞の生存活性の減少を死細胞の割合として百分率で算出し、グラフに表した。その結果、DELE 遺伝子を恒常的に発現する細胞株は、コントロール細胞と比較して、TNF- α および TRAIL の刺激による細胞死の亢進が認められた (図 10)。また、この細胞死誘導の亢進の程度は、各細胞株間の DELE 発現量との相関が認められ、DELE の発現量が高い細胞株で、より高い細胞死の亢進が認められた。これらの結果から、DELE は TNF- α および TRAIL の刺激により誘導される細胞死の亢進に働くシグナル伝達分子である可能性が示唆された。

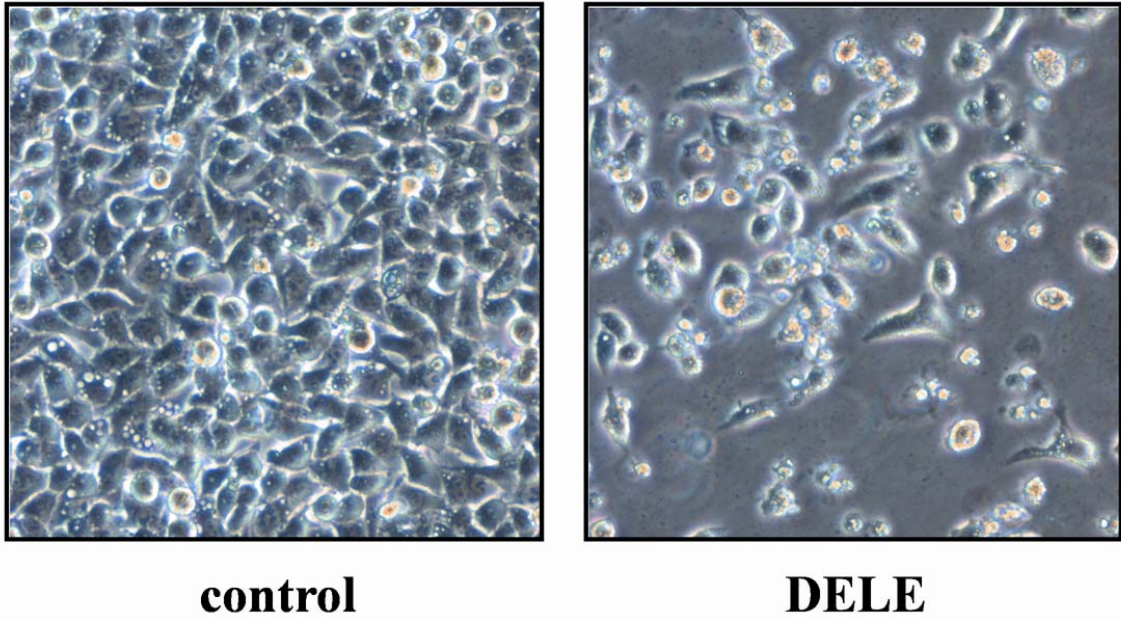


図8. DELE遺伝子の過剰発現によるHeLa細胞の細胞死誘導の解析

6ウェルプレートに播種したHeLa細胞に4 μg のコントロールベクター、またはDELE遺伝子発現ベクターをトランスフェクションした。48時間後、細胞の形態変化を位相差顕微鏡を用いて観察した。(倍率:200倍)

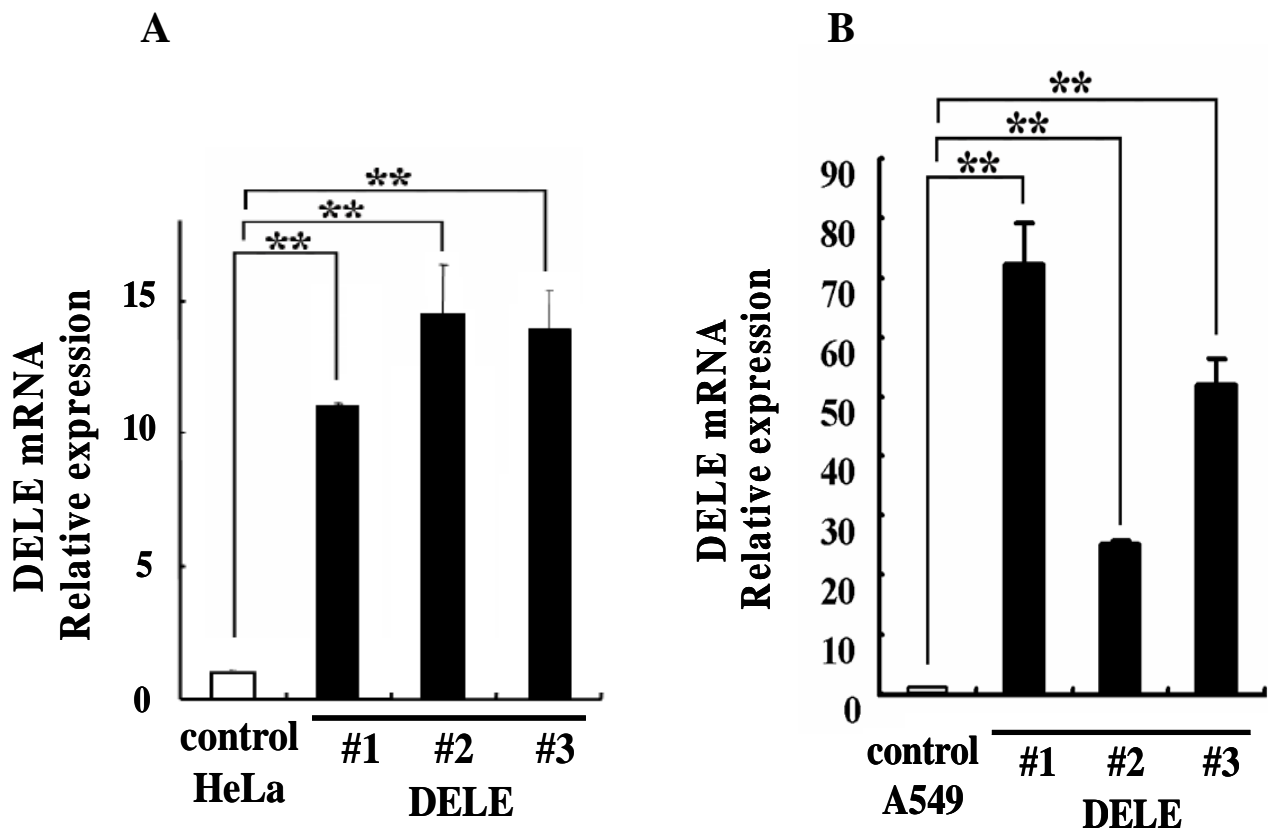


図9. DELE遺伝子を恒常的に発現する培養細胞株の樹立

HeLa細胞(A)およびA549細胞(B)にDELE遺伝子を発現させるレトロウイルスベクターを感染させ、限界希釈法により、DELE遺伝子を恒常的に発現する培養細胞株をクローニングにより樹立した。グラフは、リアルタイムPCR法により、樹立した細胞株のDELE mRNA発現量を測定した結果を示す。結果は、GAPDH mRNA発現量で標準化した各細胞のDELE mRNA発現量を、コントロール細胞に対する相対的な比率として表した。ダブルアスタリスク(**)は統計学的解析値 $p < 0.01$ を表す。

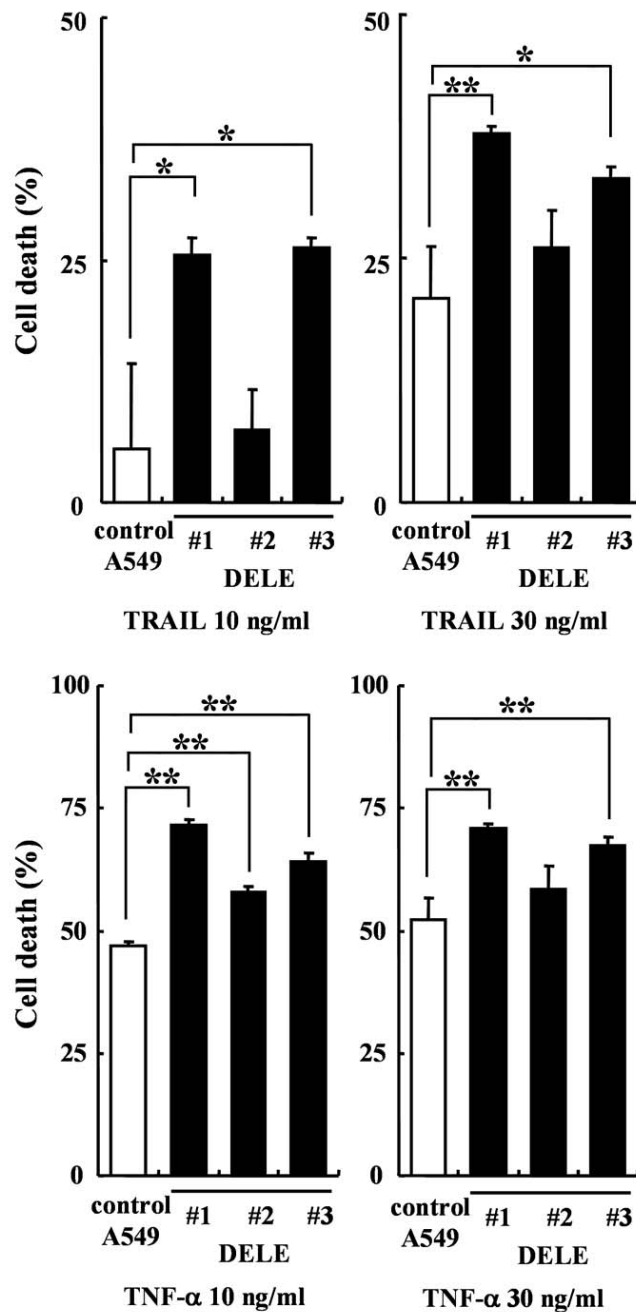


図 10. DELE 遺伝子を恒常的に発現する A549 由来細胞株の TRAIL および TNF- α に対する感受性の解析

DELE 遺伝子を恒常的に発現する A549 細胞を 10 ng/ml あるいは 30 ng/ml の TRAIL または TNF- α で刺激し、それぞれ 24 時間後 (TRAIL 刺激) あるいは 12 時間後 (TNF- α 刺激) の生存活性を Cell Counting Kit 8 (Dojindo) を用いて測定した。

コントロールベクターを導入した A549 細胞と DELE 遺伝子恒常発現 A549 細胞に TRAIL、TNF- α を上記の終濃度となる様に添加し、添加後 12 時間 (TNF- α 刺激) あるいは 24 時間 (TRAIL 刺激) 後に Cell Counting Kit 8 試薬を加えて吸光度を測定することで細胞の生存活性を測定した。上のグラフでは、刺激をしていない細胞の生存活性を 100% としてそれに対する TRAIL および TNF- α で刺激した細胞の生存活性の減少を百分率で示した。

エラーバーは 3 回の独立した試験における標準偏差を表し、アスタリスク(*)は $p < 0.05$ を、ダブルアスタリスク(**)は $p < 0.01$ を表す。

7. DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞における TNF- α および TRAIL 感受性の解析

DELE 遺伝子を恒常的に高発現する細胞株は TNF- α あるいは TRAIL 刺激により誘導されるアポトーシスに対する感受性が亢進することから(図 10)、DELE がこれらサイトカインの刺激による細胞死誘導の調節に働く分子であることが示唆された。そこで、DELE の機能についてさらに検討を進めるために、DELE 遺伝子に対する siRNA を用いて DELE 遺伝子発現を抑制し、デスレセプターを介したアポトーシス誘導への影響を調べた。なお、siRNA を用いた実験では、トランスフェクション効率が高く、かつ HEK293T 細胞等と比して TNF- α および TRAIL に対する感受性が高かったことから、HeLa 細胞を用いることとした。

DELE mRNA の発現を特異的に抑制するためにデザインされた 3 種の siRNA (DELE siRNA#1-#3: Ambion)を、デスリガンド刺激に対する感受性が高い細胞株である HeLa 細胞にトランスフェクションし、これらの遺伝子サイレンシング効果について、半定量 RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。なお、陰性コントロールとして、ヒト細胞で発現している mRNAs に対しても有意な相同性を持たない様にデザインされた siRNA を用いた(Silencer Negative Control #1 siRNA; Ambion)。その結果、陰性コントロール siRNA に比べて DELE siRNA #1 および#2 はトランスフェクションにより、細胞の内在性 DELE 遺伝子の発現を 70-80% 抑制し、同程度の抑制効果を示すことが明らかとなった。一方、DELE siRNA #3 は、約 50%程度の抑制効果しか示さなかった(図 11)。これらの結果より、以後の解析には、DELE siRNA #1 を用いることとした。

HeLa 細胞に DELE siRNA #1 あるいはコントロール siRNA をトランスフェクションし、48 時間後、細胞に様々な濃度で TNF- α あるいは TRAIL の刺激を加え、刺激後 12 時間(TNF- α 刺激)あるい

は 24 時間後 (TRAIL 刺激) の細胞の生存率を Cell Counting Kit 8 を用いて測定した。細胞の生存率は未刺激の細胞の生存活性に対する百分率で算出し、図に示した。その結果、いずれの siRNA をトランスフェクションした細胞においても、TNF- α あるいは TRAIL 刺激による濃度依存的な生存率の低下が認められた。しかしながら、DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞においては、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞に比べ、生存率の低下が有意に抑制されることが明らかとなった (図 12)。また、DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞に対して TRAIL 刺激した細胞の位相差顕微鏡による観察像を図 13 に示した。位相差顕微鏡像による解析と Cell Counting Kit 8 を用いた細胞生存活性の測定結果には相関が認められ、TRAIL 刺激により誘導される細胞死が、特異的な siRNA を用いた DELE 遺伝子の発現抑制によって顕著に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、DELE は TNF- α および TRAIL 刺激により誘導されるアポトーシスのシグナル伝達において、重要な役割を担う分子であることが示唆された。

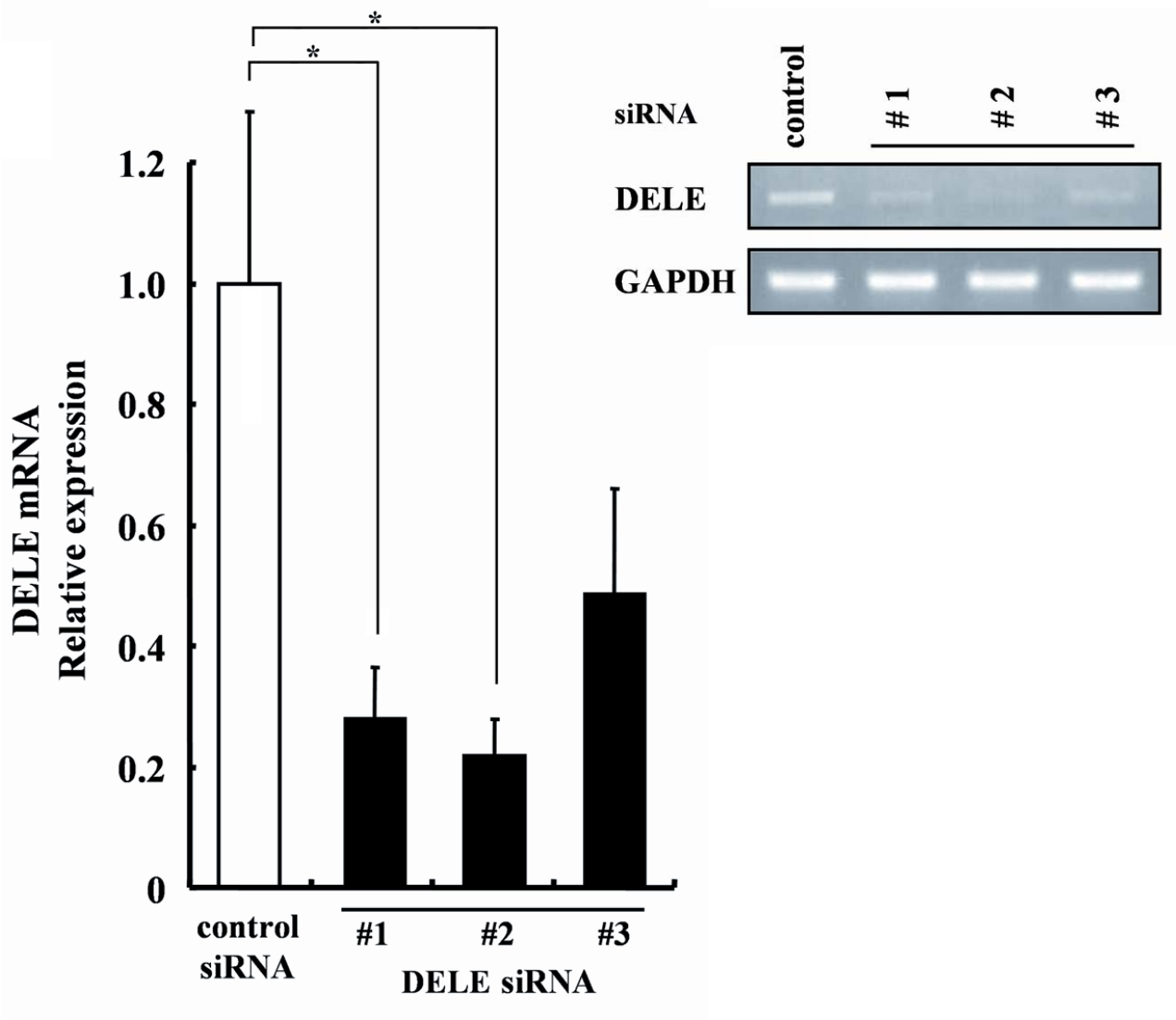


図11. DELE遺伝子に特異的なsiRNAによるDELE mRNAの発現抑制効果の検討

HeLa細胞にコントロールsiRNAまたはDELE遺伝子特異的siRNAをトランスフェクションし、48時間後の細胞におけるDELE遺伝子の発現量をリアルタイムRT-PCR法(A)および半定量的PCR法(B)によって解析した。グラフは、各細胞においてGAPDH mRNAの発現量で標準化したDELE mRNA発現量をコントロール細胞に対する相対的な比率として表した。

エラーバーは3回の独立した実験結果の標準偏差を表し、アスタリスク(*)は $p < 0.05$ であることを示す。

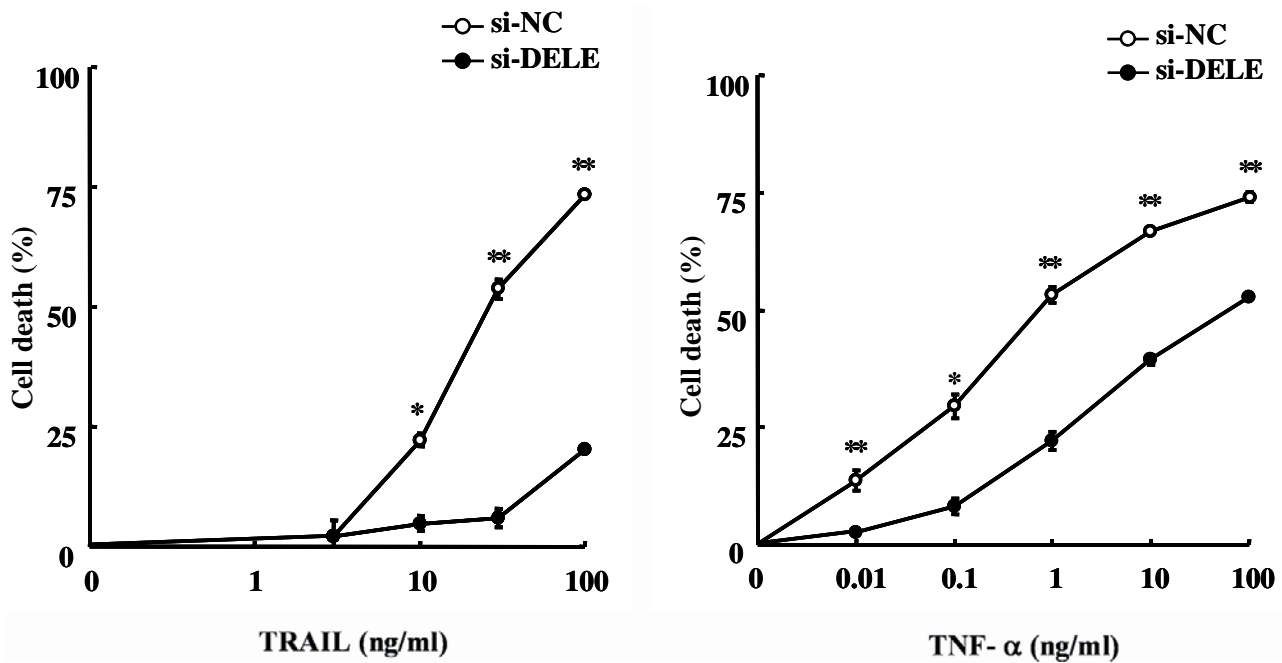


図12. DELE遺伝子の発現を抑制した細胞におけるTRAILおよびTNF- α 感受性の解析

HeLa細胞にコントロールsiRNA(si-NC)またはDELE遺伝子特異的siRNA(si-DELE)をトランスフェクションした。48時間後の細胞を図中に示した濃度のTNF- α あるいはTRAILで刺激し、それぞれ12時間後(TNF- α 刺激)、24時間後(TRAIL刺激)における細胞の生存活性を、Cell counting kit 8を用いて測定した。グラフは未刺激の細胞に対する各細胞の死細胞の割合を百分率で示した。

エラーバーは、3回の独立した実験結果の標準偏差を表し、アスタリスク(*)はコントロールsiRNAを導入した細胞とDELE特異的なsiRNAを導入した細胞間で $p < 0.05$ であることを示し、ダブルアスタリスク(**)は $p < 0.01$ であることを示す。

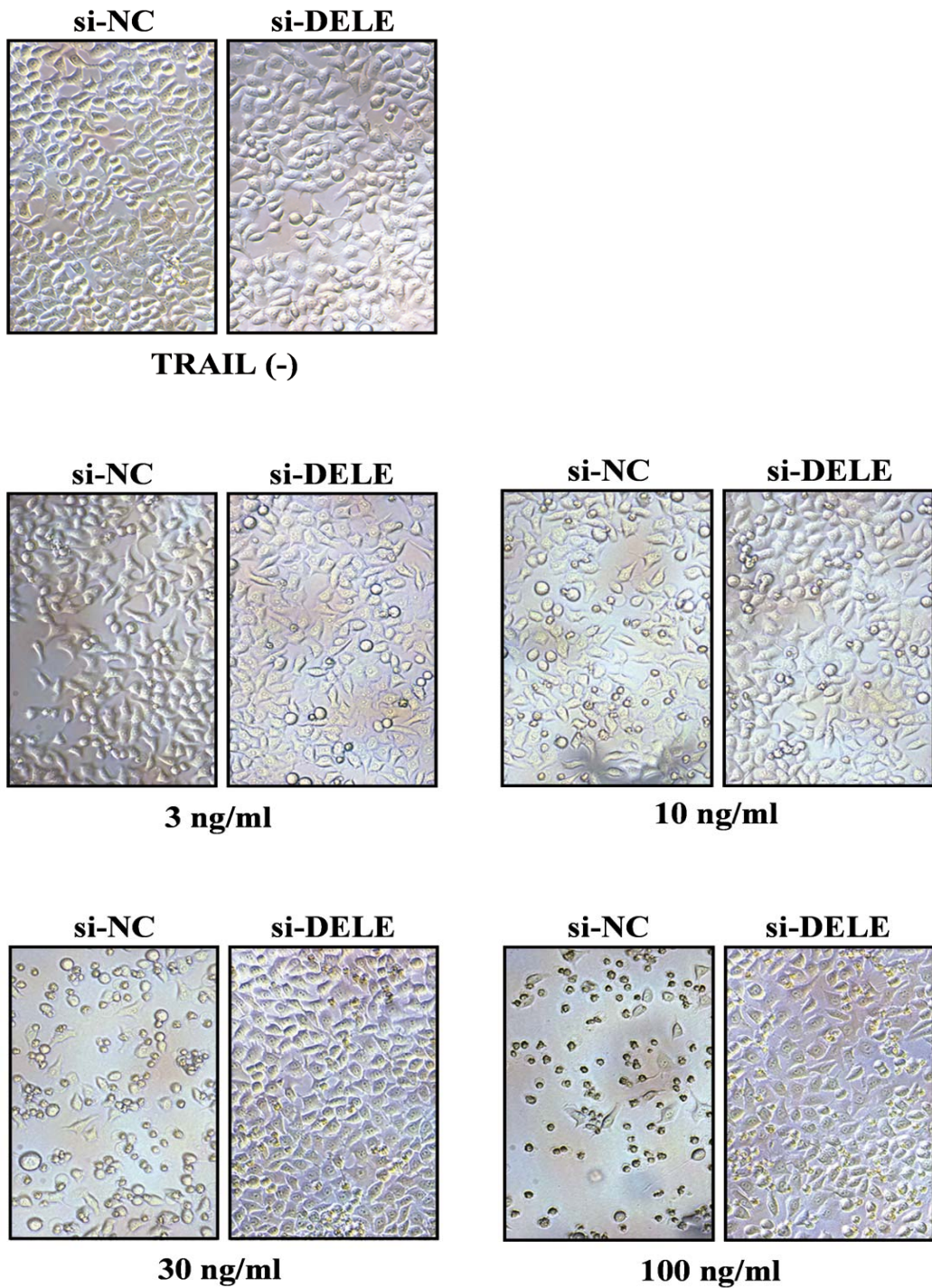


図13. DELE遺伝子の発現を抑制した細胞におけるTRAIL刺激に対する感受性の解析

HeLa細胞にコントロールsiRNA (si-NC)またはDELE遺伝子特異的siRNA (si-DELE)をトランスフェクションした。48時間後にそれぞれの細胞を図中に示した濃度のTRAILで刺激し、さらに24時間インキュベートした後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した(倍率:200倍)。

8. DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞におけるデスレセプター刺激後のカスパーゼ活性化の解析

カスパーゼの開裂による活性化は、デスレセプターを介したシグナル伝達経路によって制御されるアポトーシスをはじめ、様々なアポトーシスの誘導に重要な現象であることが知られている(Ashkenazi and Dixit., 1999; Guicciardi and Gores., 2009)。その一方で、カスパーゼの活性化を必要としないアポトーシス誘導経路も存在することが知られている(Kroemer and Martin, 2005)。そこで、DELE がカスパーゼ依存的なアポトーシスシグナル伝達経路に関与しているか否かを検証するために、カスパーゼに対する特異的抗体を用いたイムノブロット解析を行った。HeLa 細胞に DELE 遺伝子特異的 siRNA またはコントロール siRNA をトランスフェクションし、48 時間後、それぞれの細胞に TNF- α (10 ng/ml)あるいは TRAIL (30 ng/ml)による刺激を加えた。その後経時的に細胞を集め、その総細胞抽出液を用いてウエスタンブロット法による解析を行った。TNF- α および TRAIL で刺激した細胞におけるカスパーゼ-8、カスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3 の開裂の経時的変化を比較した結果、DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞においては、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3 のいずれにおいても、その開裂が阻害されることが明らかとなった(図 14)。

次に、DELE 遺伝子の発現抑制によるカスパーゼ開裂の阻害が、実際にカスパーゼ活性化の抑制に働くことを確認するために、カスパーゼの活性を解析した。HeLa 細胞にコントロールおよび DELE 遺伝子特異的 siRNA をトランスフェクションし、48 時間後、それぞれの細胞に対して、TNF- α 、抗 Fas 抗体および TRAIL により刺激を加えた。その 3 時間後(カスパーゼ-8、カスパーゼ-9)あるいは 4.5 時間後(カスパーゼ-3)の細胞におけるカスパーゼ活性を Caspase-Glo Assay

Kit (Promega)を用いて測定した。その結果、DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞では、TNF- α 、抗 Fas 抗体および TRAIL のいずれによる刺激においても、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞と比べ、カスパーゼ活性化の抑制が認められた(図 15)。これらの結果より、DELE はカスパーゼ活性化の制御によりデスレセプターを介した細胞死の誘導に働くものと結論づけた。

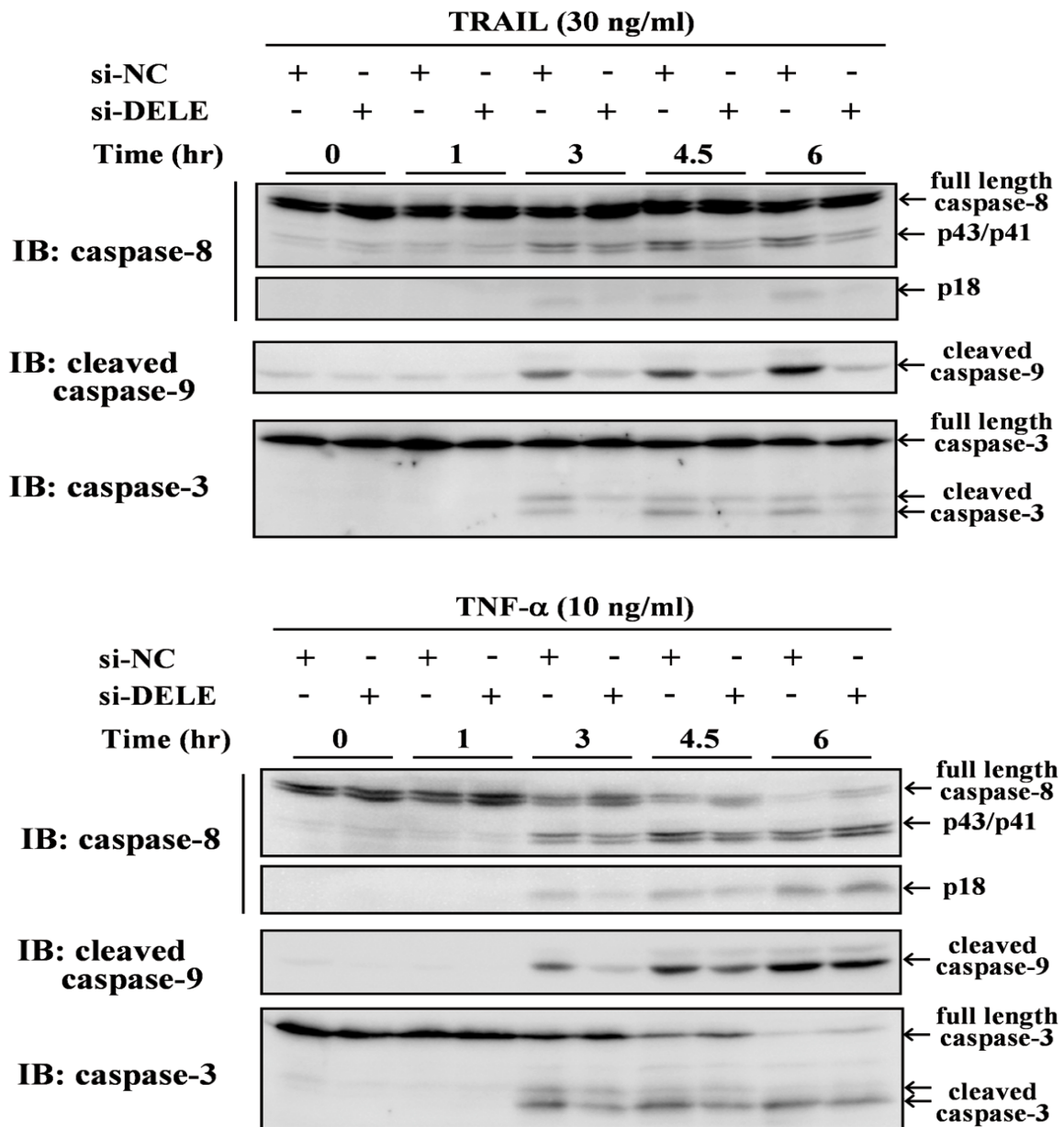


図14. DELE遺伝子の発現を抑制した細胞におけるカスパーゼ活性化の解析

HeLa細胞にコントロールsiRNAまたはDELE遺伝子特異的siRNAをトランスフェクションし、48時間後、それぞれの細胞をTRAIL (30 ng/ml)またはTNF- α (10 ng/ml)で刺激した。図中に示した時間にそれぞれの細胞を経時的に回収し、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9およびカスパーゼ-3の活性化を特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。

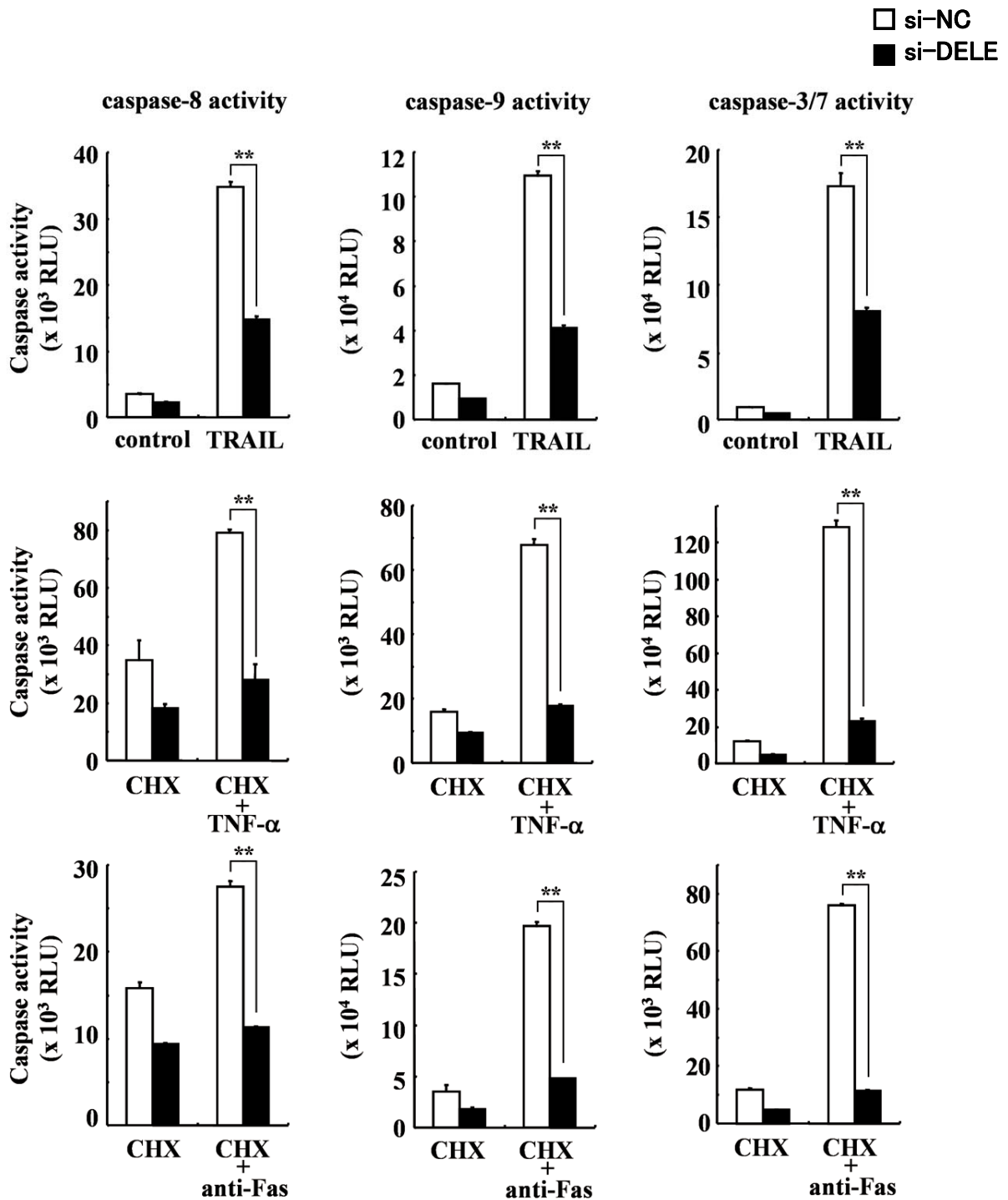


図15. DELE遺伝子の発現を抑制した細胞のデスリガンド刺激に対するカスパーゼ活性化能の解析

HeLa細胞にコントロールsiRNAまたはDELE遺伝子特異的siRNAをトランスフェクションし、48時間後、それぞれの細胞をTRAIL (30 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml)、抗Fasアゴニスティック抗体 (10 ng/ml) で刺激し、刺激後3時間の細胞におけるカスパーゼ-8とカスパーゼ-9、および、刺激後4.5時間後のカスパーゼ-3のプロテアーゼ活性をcaspase-glo assay systemを用いて解析した。ダブルアスタリスク(**)は $p < 0.01$ を表す。

9. がん細胞における DELE mRNA 発現量の解析

TRAIL は正常細胞にはアポトーシスを誘導しないが、がん細胞にアポトーシスを誘導するサイトカインとして発見され、注目された分子である(Wiley et al., 1995)。その後ナチュラルキラー(NK)細胞が TRAIL を発現し、がん細胞を殺すことにより、がんの転移を抑制しているという報告がなされ(Takeda et al., 2001)、TRAIL に対するがん細胞の感受性低下はがんの悪性化に関与していると考えられている。これまでの結果により、DELE の発現量の変化が TRAIL 刺激により誘導されるアポトーシスへの感受性に大きな影響を及ぼすことが明らかとなったため、実際のがん患者のがん組織における DELE の発現について検討を行うことにした。

がん細胞における DELE mRNA の発現解析には、インフォームドコンセントが得られた乳がん患者のがん組織とその周辺に存在する正常組織から抽出された市販の mRNA を用いて行った。入手した mRNA より cDNA を合成し、リアルタイム RT-PCR 法により DELE mRNA の発現量の解析を行った。DELE の発現量は GAPDH を内部標準として用い、GAPDH に対する相対的な発現量として解析を行った。その結果、がん組織における DELE mRNA の発現は正常組織との比較において低下していることが示された(図 16)。また、統計的に有意な差が生じているがん患者の組織が 3 例検出された。このことから、DELE の発現量低下ががんの発生に関与している可能性が考えられた。

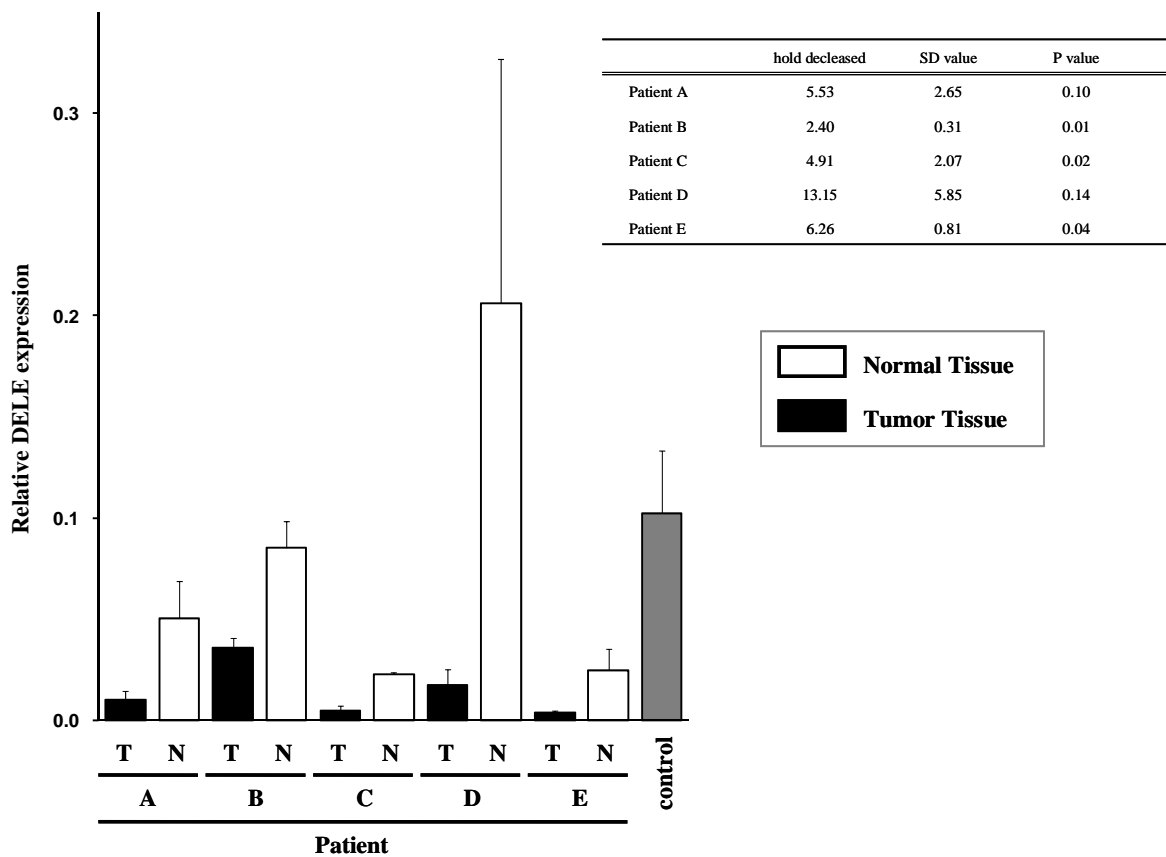


図16. 乳がん患者のがん組織と正常組織におけるDELE遺伝子発現量の比較

乳がん患者のがん組織とその周辺に存在する正常組織(市販品)におけるDELE遺伝子の発現量をリアルタイムRT-PCR法によって解析した。グラフは、各細胞においてGAPDH mRNAの発現量に対するDELE mRNA発現量の相対的な比率で表した。コントロールには、ヒトの様々な臓器から調製したRNAをプールした対照用RNAを用いた。また、右上の表には同一患者の正常細胞に対するがん細胞におけるDELE mRNAの発現低下率とその標準偏差、およびp値を示した。

考察

本研究では、DAP3 と会合する分子として機能的に未知であるタンパク質 DELE を見出し、デスレセプターを介したアポトーシス誘導に重要な働きを持つことを明らかにした。図 1 に示した様に、DAP3 は TRAIL の受容体である DR4、DR5 と会合し、TRAIL 刺激によって誘導されるアポトーシスにおいて重要な働きをすることが報告されており、細胞質において TRAIL 受容体を介したアポトーシスの制御に重要な働きをしていることが明らかにされている (Miyazaki and Reed, 2001)。一方で、DAP3 は N 末端領域に進化的に保存されたミトコンドリア局在シグナル配列を有し、ミトコンドリアにおいてもアポトーシスの誘導を亢進する機能を有していると考えられている。このことから、本研究ではミトコンドリアにおける DAP3 のアポトーシス誘導に関わる分子機構を明らかにするために、ミトコンドリアに局在が予想される新規 DAP3 会合分子、DELE に注目して解析を行った。

図 5 に示す様に、DELE が DAP3 と同様の細胞内局在分布を示し、ミトコンドリアに主な局在が認められることを示した。このことから、ミトコンドリアにおいて DAP3 と協働してアポトーシスの誘導に働いている可能性が示唆されたが、実際にミトコンドリアにおいてアポトーシス誘導に関わる機能を発揮しているか否かについて明らかにすることはできなかった。今回、DELE 遺伝子を恒常的に発現させた細胞株を用いた実験において、TNF- α および TRAIL 刺激により誘導される細胞死が DELE の発現量依存的に亢進されることを明らかにした(図 10)が、DELE 遺伝子の発現は、TNF- α よりも TRAIL の刺激で誘導されるアポトーシスに対してより大きな影響を与えることが示された。また、DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞において、TNF- α および TRAIL 刺

激で誘導される細胞死に対する感受性の低下が認められたが、この結果についても同様に TNF- α よりも TRAIL の刺激で誘導されるアポトーシスへの感受性の低下がより強いことから、DELE 遺伝子の発現量は TRAIL 刺激で誘導される細胞死に対して、より大きな影響を及ぼすことが確認された。図 10 に示した様に、TNF- α (100 ng/ml) および TRAIL (100 ng/ml) で刺激した際のコントロール細胞の生存率は 30% 未満であった。一方、DELE 遺伝子の発現を抑制した細胞においては、TRAIL 刺激後の細胞生存率が 80% 程度認められたのに対し、TNF- α で刺激した細胞については 50% 程度しか認められなかった。前述したように DAP3 は、細胞が TRAIL による刺激を受けた際に TRAIL の受容体である DR4、DR5 に会合し、FADD をリクルートする機能を持つ重要な分子である。この DAP3 の受容体との会合は、TRAIL 刺激時にのみ誘導されるものと考えられており、これまでのところ、DR4、DR5 以外のデスレセプターと DAP3 が会合するという報告はなされていない。したがって、DAP3 がデスレセプターの中でも TRAIL 受容体にのみ直接会合するという現象は、DAP3 会合分子である DELE の発現量が、TNF- α 刺激よりも TRAIL の刺激によって誘導される細胞死に強く影響することの一因であると考えられる。すなわち、TRAIL 刺激によって誘導される細胞死においては DAP3 と DELE が DR4 あるいは DR5 と会合することによって協調的にその受容体直下で制御している可能性を示唆するものである。

カスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 の活性化が下流のタンパク質分解性エフェクターカスパーゼであるカスパーゼ-3 の活性化を引き起こし、カスパーゼカスケードの活性化に働くことが明らかにされている。カスパーゼ-8 は、主にデスレセプターに会合するシグナル伝達分子である FADD に結合しオリゴマーを形成することによって活性化される(Thorburn, 2004; Chinnaiyan et al, 1995)。一方、カスパーゼ-9 の活性化は、ミトコンドリアの膜電位が消失し、ミトコンドリアから

シトクロム c が放出されることによって、細胞質に存在するシトクロム c のセンサー分子である Apaf-1 が活性化されることにより誘導される(Garrido et al., 2006)。本研究では、DELE 遺伝子の発現を抑制することによって、TNF- α 、抗 Fas 抗体および TRAIL の刺激により誘導されるカスパーゼ-8、カスパーゼ-9 およびカスパーゼ-3 の活性化が全て阻害されることを明らかにした(図 15)。カスパーゼ-8 とカスパーゼ-9 の活性化は各々独立した現象であるが、カスパーゼ-8 あるいはカスパーゼ-9 は、どちらかが活性化されると、他方も活性化されることが報告されている。従って、DELE 遺伝子の発現抑制によってカスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 の活性化が共に阻害されること、また、これらの活性化抑制に伴いカスパーゼ-3 の活性化も阻害される現象については、カスパーゼ-8 とカスパーゼ-9 の活性化経路が互いに影響しあうことにより説明される。図 14 に示した様に、TNF- α および TRAIL 刺激後 3 時間(アポトーシス誘導初期)の時点におけるカスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 の活性化を比較すると、カスパーゼ-9 の活性化が著しく抑制されているにもかかわらず、カスパーゼ-8 の活性化は殆ど抑制されていない。このことから DELE が、カスパーゼ-8 よりもカスパーゼ-9 の活性化により密接に関与している可能性が示唆され、ミトコンドリアの膜電位喪失に伴うアポトーシスの誘導制御に DELE が関与している可能性が考えられた。

本研究では、TRAIL 受容体、TNF- α 受容体および Fas などのデスレセプターにより誘導される細胞死のシグナル伝達における DELE の重要性を示した。DELE が関与する細胞死のシグナル伝達経路において、DELE が直接制御する下流の細胞死誘導分子については未だ不明であるが、PSI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いた配列相同性の検索により、DELE タンパク質の 209-283 番目のアミノ酸領域はカスパーゼ-9 の CARD と 29%の相同性を有することが

明らかとなった。DD、DED および CARD はデスドメインスーパーファミリーに属し、これらのドメインを有する分子は、アポトーシス誘導に働くシグナル伝達経路の制御に重要な役割を果たしている (Hofmann et al., 1997; Weber and Vincenz., 2001; Reed et al., 2004)。これらのドメイン構造は DD を介した Fas と FADD の会合、CARD を介したカスパーゼ-9 と Apaf-1 の会合の様に、他のタンパク質と会合し複合体を形成するために重要である。また、これらのドメイン構造を有する分子の多くは、ホモ二量体を形成しうることが知られている。DELE についても同様に二量体を形成する(図 17)ことが明らかとなっており、これらのことから、DELE がデスドメインスーパーファミリーに属するドメイン構造を有するタンパク質と会合することによって、アポトーシス誘導に促進性に働くことが予測される。

本研究では HeLa 細胞に DELE 遺伝子を一過性に過剰発現させると細胞死が誘導されることを明らかにした(図 8)。また、DELE 遺伝子を恒常的に発現させた細胞は、TNF- α および TRAIL 刺激により誘導される細胞死に対して DELE 遺伝子の発現量依存的に感受性が亢進することを示した。これらのことより、DELE 遺伝子の発現量がデスリガンド刺激により誘導される細胞死に対する感受性に関与し、その発現量の変化がアポトーシス誘導を制御している可能性が考えられる。しかしながら、TNF- α 、抗 Fas 抗体および TRAIL の刺激による DELE の mRNA レベルでの発現量の変化は認められなかったことから、転写後調節を受けているものと推測された。そこで、PESTfind を用いたアミノ酸配列解析を行った結果、DELE は N 末端側のミトコンドリアターゲット配列領域中に PEST 配列を有することを見出した。プロリン、グルタミン酸、セリンおよびスレオニンに富む配列である PEST 配列はタンパク質の不安定化に働くことが知られており (Rechsteiner and Rogers., 1996)、この配列を含むタンパク質は細胞内における半減期が短くな

る傾向にある。事実、図 18 に示した様に、DELE 遺伝子の発現ベクターを用いて過剰発現させた DELE タンパク質の検出量は、ユビキチンプロテアソーム経路の阻害剤である MG-132 を添加することで増加した。また、PEST 配列を含む N 末端側領域を欠失させた DELE(Δ N115)の発現ベクターを構築し、HEK293 細胞に発現させると、野生型 DELE の発現と比較して、タンパク質検出量の顕著な増加が確認された。これまでのところ、一過性に DELE を過剰発現させた細胞に対して TNF- α 、抗 Fas 抗体および TRAIL 刺激を行った場合にも DELE のタンパク質量の変化は認められていない。ユビキチンプロテアソーム経路を介した DELE のタンパク質レベルでの発現制御が、DELE による細胞死誘導の分子メカニズムのひとつである可能性が考えられたため、DELE のユビキチン化の解析を行ったが明確な結果を得ることはできなかった。

DAP3 は幅広い生物種において保存されている分子であり、デスレセプターの存在しない線虫(*Caenorhabditis elegans*)や酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)にもそのホモログが存在し、アポトーシスの誘導に関わる機能の面でも保存されていることが知られている。一方、本研究で DAP3 と会合する分子として見出された DELE については、酵母や線虫におけるホモログの存在は確認できていないものの、PHI-Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を用いたホモロジー検索により、デスレセプターを持たないギボシムシ(*Saccoglossus kowalevskii*)やセンモウヒラムシ (*Trichoplax adhaerens*)、およびユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*) 等においてそのホモログが存在していることが明らかとなった。このことから DELE もまた DAP3 と同様に広い生物種において保存がなされている分子であり、本研究の成果により明らかにされたデスレセプターを介したアポトーシスシグナル伝達経路に加えて、デスレセプターを介さない他のアポトーシスシグナル伝達経路にも DELE が関与している可能性が示唆された。

DAP3 は細胞の接着が阻害された際に誘導されるアポトーシス様の細胞死であるアノイクス (anoikis:ギリシャ語で「ホームレス」の意)においても重要な役割を果たすことが報告されており (Miyazaki et al., 2004; Li et al., 2009)、このことは、組織における DAP3 発現量が細胞のがん化やがんの転移に関与している可能性を示唆している。これとは逆に、DAP3 は一部のがん細胞で高発現していることが報告されており (Mariani et al., 2001; Jacques et al., 2009)、これらの DAP3 遺伝子の変異についての解析が必要である。近年、DAP3 遺伝子を欠くマウス胚においてミトコンドリアにおける酸素代謝が阻害され、胚の矮化、発生異常を呈する胎性致死の表現型が見られるという報告がなされていることから (Kim et al., 2007)、DAP3 は細胞の代謝においても重要な機能を果たしているものと考えられる。一方、乳がん患者に由来するがん組織から単離された Total RNA を用いて、がん細胞における DELE mRNA の発現について解析を行ったところ、DELE mRNA の発現が正常組織と比較して低下していることが明らかとなった。このことから、DAP3 の高発現に伴うアポトーシス感受性の亢進を DELE の発現低下が相殺していることを示している可能性が考えられる。

HUGE protein database (<http://www.kazusa.or.jp/huge/>; Nagase et al., 1996) により提供されたノーザンブロットの解析データより、DELE mRNA は様々な組織において普遍的に発現していることが示されている。これらのことから、DELE の発現および機能の異常が原因でデスレセプターを介した細胞死の誘導が阻害あるいは亢進されることにより、様々な疾患の発症を引き起こしている可能性が考えられる。今後の研究において、DELE の生理学的重要性が明らかにされることが期待される。

本研究の結果予想される DELE の機能について、図 19 に示す。

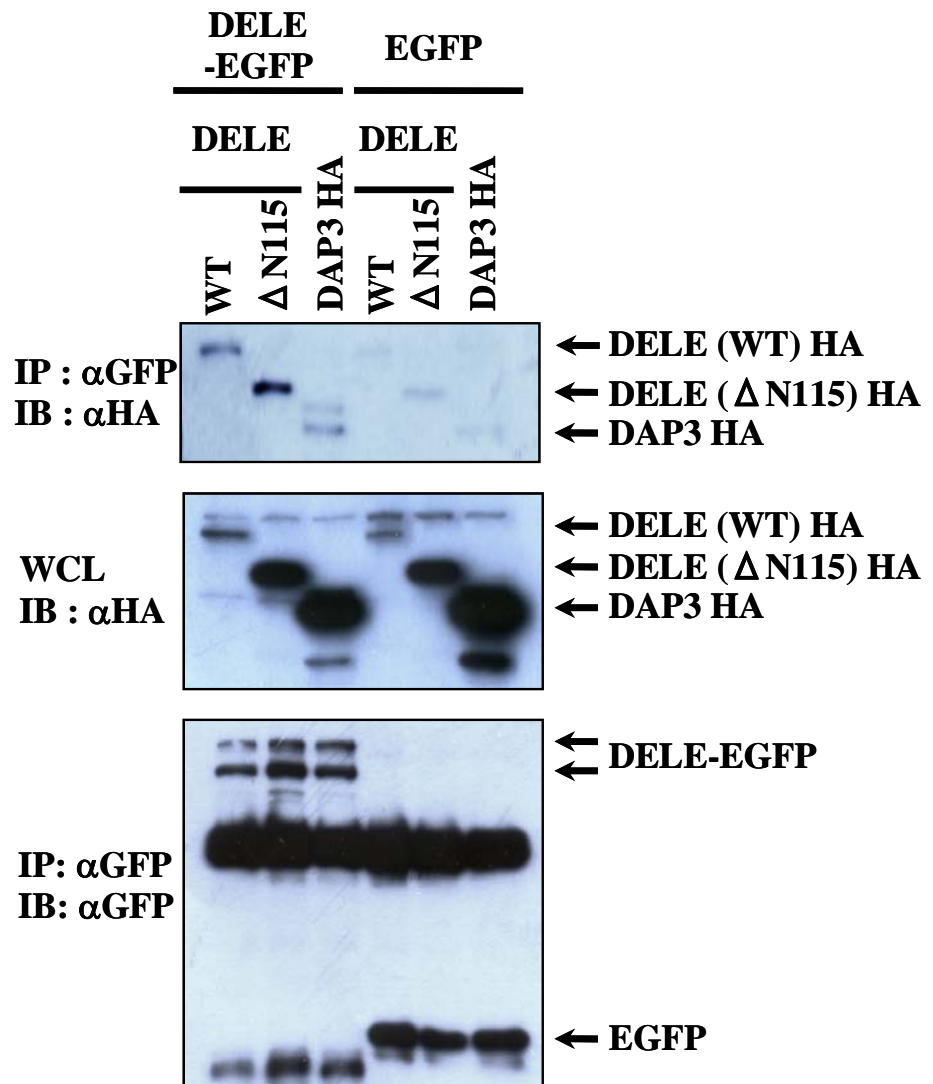


図 17. 哺乳類細胞内における DELE の自己会合

HA タグを付けた DELE、N 末端に存在するミトコンドリア局在配列を欠いた DELE、および DAP3 の発現ベクターを EGFP と融合させた DELE の発現ベクターと共に HEK293T 細胞へトランスフェクションした。24 時間後の細胞より総細胞抽出液(whole cell extract; WCE)を調製し、抗 GFP 抗体と Protein-G Shepharose を用いた免疫沈降に供した。その後、免疫沈降された画分を抗 HA 抗体および抗 GFP 抗体を用いたイムノブロット法により解析を行った。

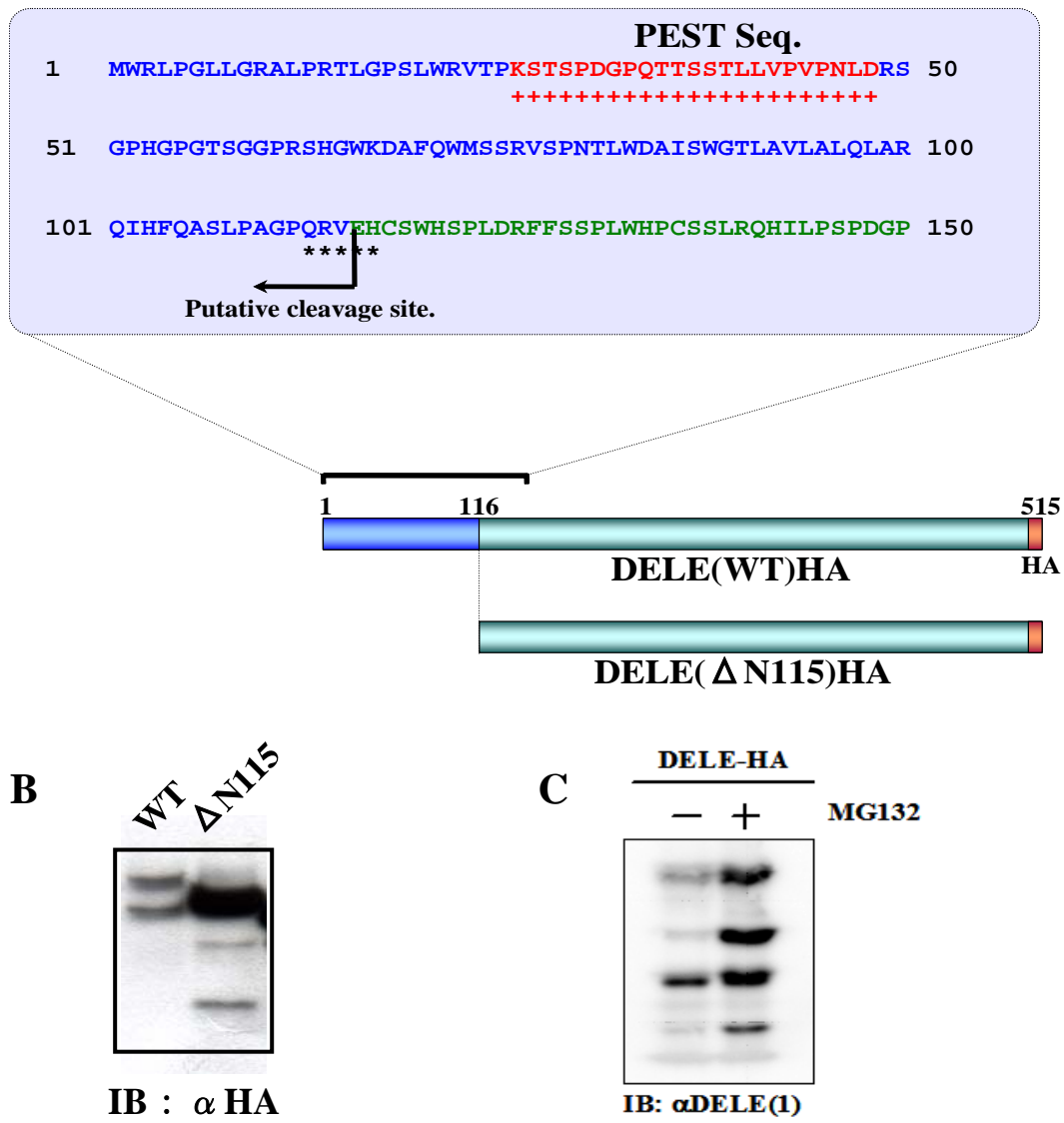


図 18. 細胞内における DELE タンパク質の発現効率の解析

A: DELE の 1-115 番目のアミノ酸領域を削り、ミトコンドリアターゲット配列(含 PEST 配列)を有さない、DELE(ΔN115)の発現ベクター(HA タグを C 末につけた)を作製した。

B: 等量 (2 μg) の DELE-HA 発現ベクターと DELE(ΔN115)発現ベクターを HEK293 細胞 10⁶ 個にトランスフェクションした細胞から調製した総抽出物をウエスタンブロット法により抗 HA 抗体で検出した。

C: 2 μg の DELE-HA 発現ベクターを HEK293 細胞 10⁶ 個にトランスフェクションした 24 時間後、MG-132 (10 μM)で 6 時間処理し、細胞から調製した総抽出物をウエスタンブロット法により抗 DELE 抗体で検出した。

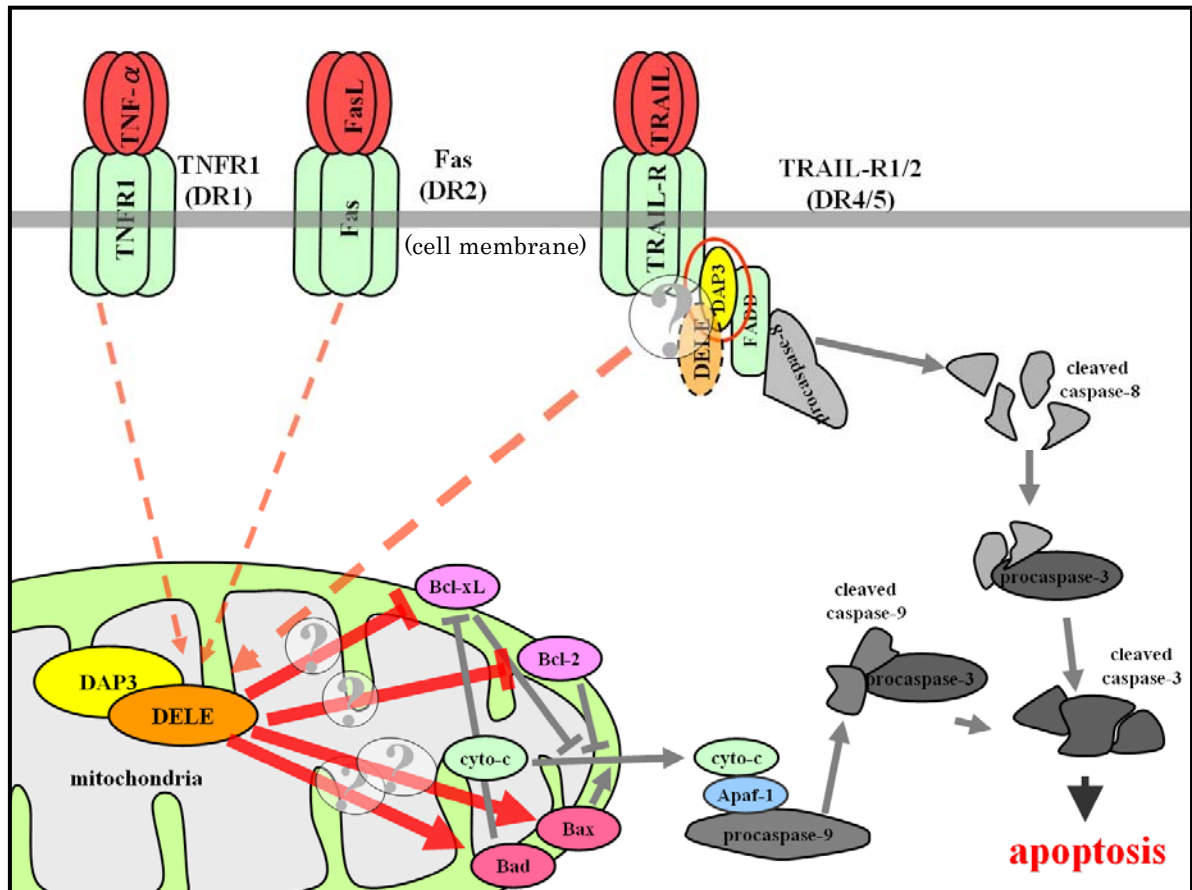


図 19. デスレセプターを介したアポトーシス誘導において予想される DELE の機能

DELE は DAP3 と会合し、ミトコンドリアにおいて TNF- α 、FasL および TRAIL 刺激により誘導されるアポトーシスを増強する機能を果たす。特に TRAIL 刺激によって誘導されるアポトーシスにおいては、ミトコンドリアを介して伝達される経路において、シトクロム c のリリースに対して抑制的に働く Bcl-2 や Bcl-xL の働きを阻害、あるいは、促進的に働く Bax や Bad の働きを増強することで、カスパーゼ-9 の開裂を介してアポトーシスを増強している可能性が予想される。TRAIL 刺激によって誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路では DAP3 が TRAIL 受容体である DR4 および DR5 に会合した際、同時に DELE も会合し、そのシグナル増強に働く可能性も予想される。

参考文献

1. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7, 207–219
2. Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308
3. Ashkenazi A, Dixit VM (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255–260
4. Ashkenazi A, Herbst RS (2008) To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest* 118, 1979–1990
5. Berger T, Brigl M, Herrmann JM, Vielhauer V, Luckow B, Schlondorff D, Kretzler M (2000) The apoptosis mediator mDAP-3 is a novel member of a conserved family of mitochondrial proteins. *J Cell Sci* 113, 3603–3612
6. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505–512
7. Croft M (2009) The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 9, 271–285
8. D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28, 655–662
9. Das AK, Cohen PW, Barford D (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17, 1192–1199
10. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13, 1423–1433
11. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, Lena AM, Candi E, Terrinoni A, Catani MV, Oren M, Melino G, Krammer PH, Stremmel W,

- Müller M. (2005) TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J* 24, 2458–2471
12. Guicciardi ME, Gores GJ (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J* 23, 1625–1637
 13. Hajra KM, Liu JR (2004) Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 9, 691–704
 14. Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22, 155–156
 15. Jacques C, Fontaine JF, Franc B, Mirebeau-Prunier D, Triau S, Savagner F, Malthiery Y (2009) *Br J Cancer* 101, 132–138
 16. Karin M, Gallagher E (2009) TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev* 228, 225–240
 17. Kim HR, Chae HJ, Thomas M, Miyazaki T, Monosov A, Monosov E, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC (2007) Mammalian *dap3* is an essential gene required for mitochondrial homeostasis *in vivo* and contributing to the extrinsic pathway for apoptosis. *FASEB J* 21, 188–196
 18. Kissil JL, Cohen O, Raveh T, Kimchi A (1999) Structure–function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF- α - and Fas-induced cell death. *EMBO J* 18, 353–362
 19. Kissil JL, Deiss LP, Bayewitch M, Raveh T, Khaspekov G, Kimchi A (1995) Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon- γ -induced cell death. *J Biol Chem* 270, 27932–27936
 20. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 532–542
 21. Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11, 725–730
 22. Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* 20, 257–259
 23. Lee KY, Chang W, Qiu D, Kao PN, Rosen GD (1999) PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor- α to induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 274,

13451–13454

24. Li HM, Fujikura D, Harada T, Uehara J, Kawai T, Akira S, Reed JC, Iwai A, Miyazaki T (2009) IPS-1 is crucial for DAP3-mediated anoikis induction by caspase-8 activation. *Cell Death Differ* 16, 1615–1621
25. Lorz C, Mehmet H (2009) The role of death receptors in neural injury. *Front Biosci* 14, 583–595
26. Mariani L, Beaudry C, McDonough WS, Hoelzinger DB, Kaczmarek E, Ponce F, Coons SW, Giese A, Seiler RW, Berens ME (2001) Death-associated protein 3 (Dap-3) is overexpressed in invasive glioblastoma cells in vivo and in glioma cell lines with induced motility phenotype in vitro. *Clin Cancer Res* 7, 2480–2489
27. Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lächelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Fröhlich KU (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911–917
28. Miyazaki T, Reed JC (2001) A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol* 2, 493–500
29. Miyazaki T, Shen M, Fujikura D, Tosa N, Kim HR, Kon S, Uede T, Reed JC (2004) Functional role of death-associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem* 279, 44667–44672
30. Murata Y, Wakoh T, Uekawa N, Sugimoto M, Asai A, Miyazaki T, Maruyama M (2006) Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response. *FEBS Lett* 580, 6093–6099
31. Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tanaka A, Nomura N (1996) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. V. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0161–KIAA0200) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 (supplement). *DNA Res* 3, 43–53
32. Nakamura T, Lipton SA. (2009) Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis* 14, 455–468

33. Opferman JT (2008) Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 15, 234–242
34. Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267–271
35. Reed JC, Doctor KS, Godzik A (2004) The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci STKE* 239, re9
36. Saveanu C, Fromont–Racine M, Harington A, Ricard F, Namane A, Jacquier A (2001) Identification of 12 new yeast mitochondrial ribosomal proteins including 6 that have no prokaryotic homologues. *J Biol Chem* 276, 15861–15867
37. Strasser A, Jost PJ, Nagata S (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180–192
38. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H, Okumura K. (2001) Involvement of tumor necrosis factor–related apoptosis–inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7, 94–100
39. Takeda S, Iwai A, Nakashima M, Fujikura D, Chiba S, Li HM, Uehara J, Kawaguchi S, Kaya M, Nagoya S, Wada T, Yuan J, Rayter S, Ashworth A, Reed JC, Yamashita T, Uede T, Miyazaki T (2007) LKB1 is crucial for TRAIL–mediated apoptosis induction in osteosarcoma. *Anticancer Res* 27, 761–768
40. Tanaka M, Miyake Y (2007) Apoptotic cell clearance and autoimmune disorder. *Curr Med Chem* 14, 2892–2897
41. Thorburn A (2004) Death receptor–induced cell killing. *Cell Signal* 16, 139–144
42. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real–time quantitative RT–PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.1–0034.11
43. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2004) Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84, 627–639

44. Weber CH, Vincenz C (2001) The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci* 26, 475–481
45. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673–682
46. Wilson TR, Johnston PG, Longley DB (2009) Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 307–319
47. Zhu H, Zhang L, Huang X, Davis JJ, Jacob DA, Teraishi F, Chiao P, Fang B (2004) Overcoming acquired resistance to TRAIL by chemotherapeutic agents and calpain inhibitor I through distinct mechanisms. *Mol Ther* 9, 666–673

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導賜りました北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターバイオリソース部門の宮崎忠昭教授、岩井淳講師、藤倉大輔研究員に感謝致します。また、本論文をご校閲いただいた北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター国際協力部門の杉本千尋教授、梶野喜一准教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたり、KIAA0141 cDNAをご提供いただいた財団法人かずさDNA研究所およびA549細胞株をご提供いただいた東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターの方々に感謝致します。また、ご助言およびご協力いただきました北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの皆様にも感謝いたします。