

アポトーシスシグナル伝達の分子機構

梶原隆太郎*、田邊香野*、森明日華*、乾誠治*

The molecular mechanism of the apoptotic signal transduction pathways

Ryutaro Kajihara*, Kano Tanabe*, Asuka Mori*, Seiji Inui*

Key words : apoptosis, death-receptor, Fas, TRAIL, TNF α

I. はじめに

アポトーシスとは、多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種で、特徴的な形態学的・生化学的性質をもっている。すなわち、アポトーシスは細胞膜の膨化、クロマチンの凝集、ゲノムDNAの断片化、細胞膜上にファゴサイトーシスシグナル分子の発現などの特徴を有しており、血行不良・外傷などによる細胞内外の環境の悪化によって起こる細胞死であるネクローシス（壊死）とは異なっている。ネクローシスを起こした細胞は免疫系によって異物として認識され炎症を引き起こすのに対し、アポトーシスを起こした細胞は秩序よく排除される。通常、多細胞生物のほとんどの細胞はアポトーシスによって死んでおり、アポトーシスは器官・四肢の形成や造血系・免疫系などの維持に重要な役割をもっている。したがって、アポトーシスの異常は、神経変性疾患や、発癌、自己免疫疾患へとつながる。

これまでに、アポトーシスを制御する分子メカニズムの研究が盛んになされており、現在では多くのアポトーシス制御タンパク、酵素が見つっている。通常、アポトーシスが起きる時には細胞

内のカスパーゼとよばれる一連のプロテアーゼが活性化され、これらの分子が細胞の自己破壊を引き起こす。カスパーゼはプロカスパーゼと呼ばれる不活性前駆体として存在し、切断をうけることによって活性型となる。この切断部位はカスパーゼのC末端側のアミノ酸モチーフ、X-X-X-Asp (Xはすべてのアミノ酸) であることが知られている。活性型となったカスパーゼは細胞内・細胞膜上の多様な基質を切断し、その結果、細胞を崩壊へと導く。

哺乳類細胞のアポトーシス経路は大きく分けて二つに分けられる。一つはデスレセプターより始まる経路 (extrinsic pathway)、もう一つはミトコンドリアを介して起こる (intrinsic pathway) である (図1)。extrinsic pathway は細胞表面上のデスレセプターに、デスリガンドと呼ばれる細胞外メディエーターが結合することによって開始される。一方、intrinsic pathway は細胞内のシグナル (放射線によるDNAダメージ、酸化ストレス、様々な化学療法剤などによる) に反応し、ミトコンドリアからアポトーシス関連因子を放出させてアポトーシスを誘導する。

*熊本大学大学院保健学教育部・検査技術科学分野・病態情報解析学領域
投稿責任者 (Corresponding author) : 乾誠治・inui@kumamoto-u.ac.jp

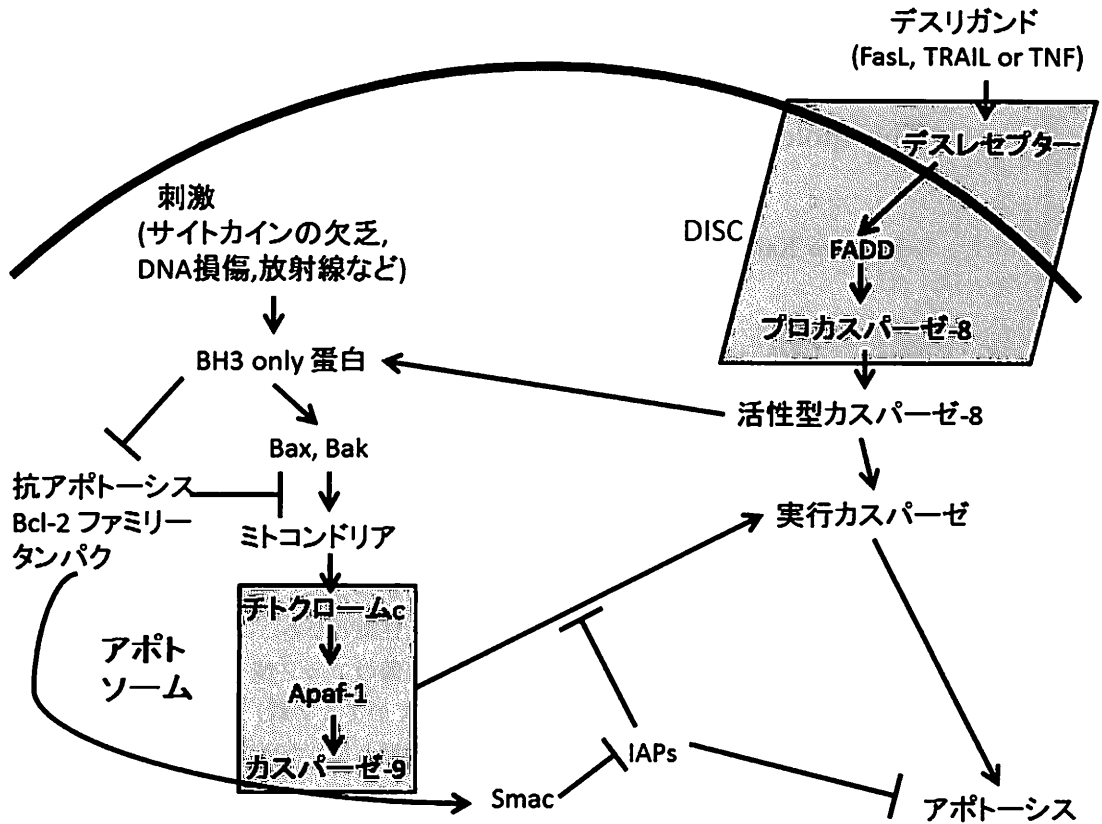


図1 アポトーシス伝達経路の概要

II. デスレセプターを介する経路 (extrinsic pathway)

extrinsic pathway は細胞表面上のデスレセプターに、それに特異的な細胞外デスリガンドが結合することによってデスレセプターのコンフォメーションが変化し、これが細胞内へとシグナルを伝達する。これらのデスレセプターは数秒のうちにカスパーゼを活性化し、数時間のうちに細胞をアポトーシスへと導く。大きく3つのデスレセプター/デスリガンドメンバーが知られており、これらすべてが Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TNFRSF) に属している：①Fas / Fas ligand (FasL)、②death receptor (DR4、

DR5) / TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)、③TNF α / TNF receptor (TNF-R1)。これらのレセプターはすべて細胞質内に約80アミノ酸からなる death domain (DD) とよばれるドメインを有しており、DDを介して下流のアダプター分子と結合する。

TNFRSFのデスレセプターは細胞膜上に三量体として存在している。デスレセプターによるアポトーシス誘導は、共通の転写/翻訳非依存性経路を介して行われる。すなわち、デスリガンドの結合は、DISC (death-inducing signaling complex) と呼ばれる複合体の形成を誘導し、これが開始カスパーゼ (カスパーゼ8または10) を切断・活性化する。引き続いて開始カスパーゼは、実行

カスパーゼ（カスパーゼ3または7）を切断し、活性化する。実行カスパーゼは最終的にアポトーシスのキーとなる細胞内の様々な基質を分解しアポトーシスを実行する。

1. Fas-FasL 経路（図2）

デスレセプターのなかでFasが最もよく研究されている。細胞膜結合型リガンドであるFasLのFasへの特異的な結合により、Fas三量体が会合してくる。このことにより、Fasの細胞質内部分にあるDDがDISCを効率よく動員できるようになる。DISCはFas、FADD (Fas-associated death domain)、プロカスパーゼ8により構成されている。FADDは、TNFRSFのDDを有するメンバーのシグナル伝達に共通のアダプター分子である¹⁾。FADDはN末端側にDED (death effector domain)を持ち、C末端側にDDが隣り合っている（図3）。Fas及びFADD中にみられるDDモチーフは高度に保存されており、Fas三量体の会合によって、両分子中のDD介した相互作用によりFADDが動員される。また、DDを介したFasとFADDの結合は、FADDのコンフォメーションを変化させDEDを露出させる。このことはプロカスパーゼ8を複合体中に動員させ、DISCを形成させる。DISCの形成によりプロカスパーゼ8は自己切断を受け活性化する。活性化型カスパーゼ8は下流のプロカスパーゼ3、6、7を切断する。活性化型カスパーゼ3はDNA修復酵素、細胞質内・核内構造タンパク質、エンドヌクレアーゼインヒビターなどの多種多様な分子を切断する。

Fasを介したアポトーシスには、FADDやプロカスパーゼ8以外の分子の関係も示唆されている。RIP (receptor-interacting protein)、RAIDD (RIP-associated ICH/CED-3-homologous protein with a DD)、プロカスパーゼ2はFADD-カスパーゼ8経路とは異なったシグナルカスケードを形成している。RIP-RAIDD経路はFADD-カスパーゼ8経路のバックアップとしての役割があるのかもしれない。しかし、通常は、この経路

はFasを介したアポトーシスにおいて大きな役割は果たしていない。

Fasを介したアポトーシス経路は、すべてのステップにおいて制御されている。FasL遺伝子はほとんどの細胞で転写が不活化されている。FasLの発現調節は、CD4⁺T細胞のactivation-induced cell death (AICD)などのFasL/Fasを介した生物活性をコントロールすることになる。Fas発現の誘導には、TCRによるPKC活性化のみが必要なだけなのに対し、FasL発現はPKCの活性化とCa²⁺動員によるNFATの活性化が必要となる²⁾。膜結合型FasLによるFasの刺激は、可溶性decoyレセプターであるDcR3、可溶性不活性化型FasLなどによって阻害される。Fas-DISC複合体によるカスパーゼ8の活性化は主にFLIP (FLICE-like inhibitory protein)とよばれる阻害分子によって制御される。FLIPはカスパーゼ8に構造的に似たいくつかのアイソフォームとして存在するが、酵素活性を欠いている。FLIPがデスレセプターのDISCに介入すると、カスパーゼ8の活性化が阻害される。また、Fasを介したアポトーシスは、Bcl-2ファミリータンパクやIAP (inhibitor of apoptosis proteins)などのミトコンドリアを介した経路によってもコントロールされる。

T細胞におけるFasを介した細胞死はアポトーシスによるものだけではなく、ネクローシスによっても起きている。Fasを介したネクローシスでは、FADDとRIPが必要であるが、カスパーゼ8は必要でない様である。しかしながら、ネクローシスにおけるFas、FADD、RIPの分子的な相互の結びつきは未だよくわかっていない。

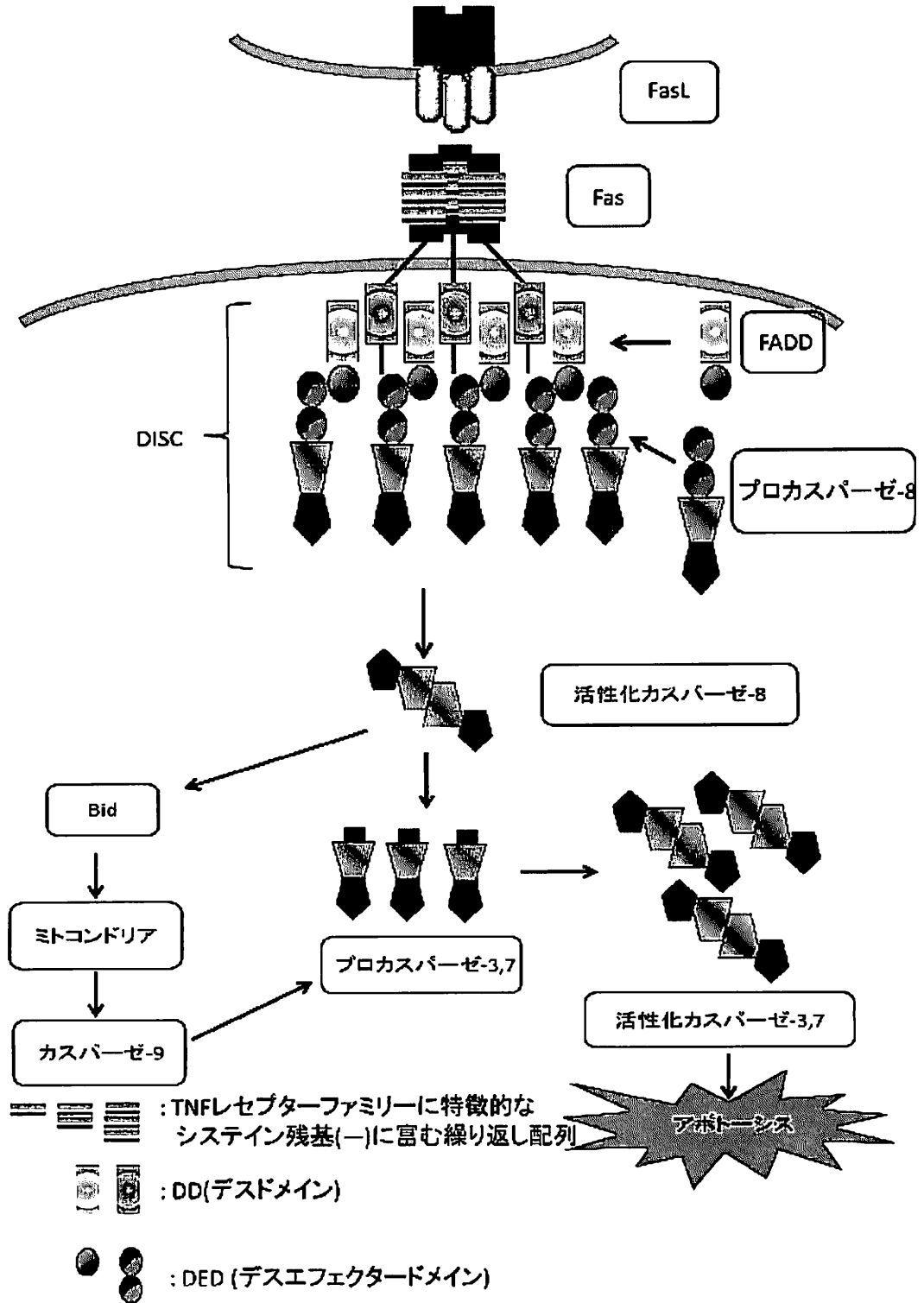


図2 Fasを介するアポトーシスシグナル経路

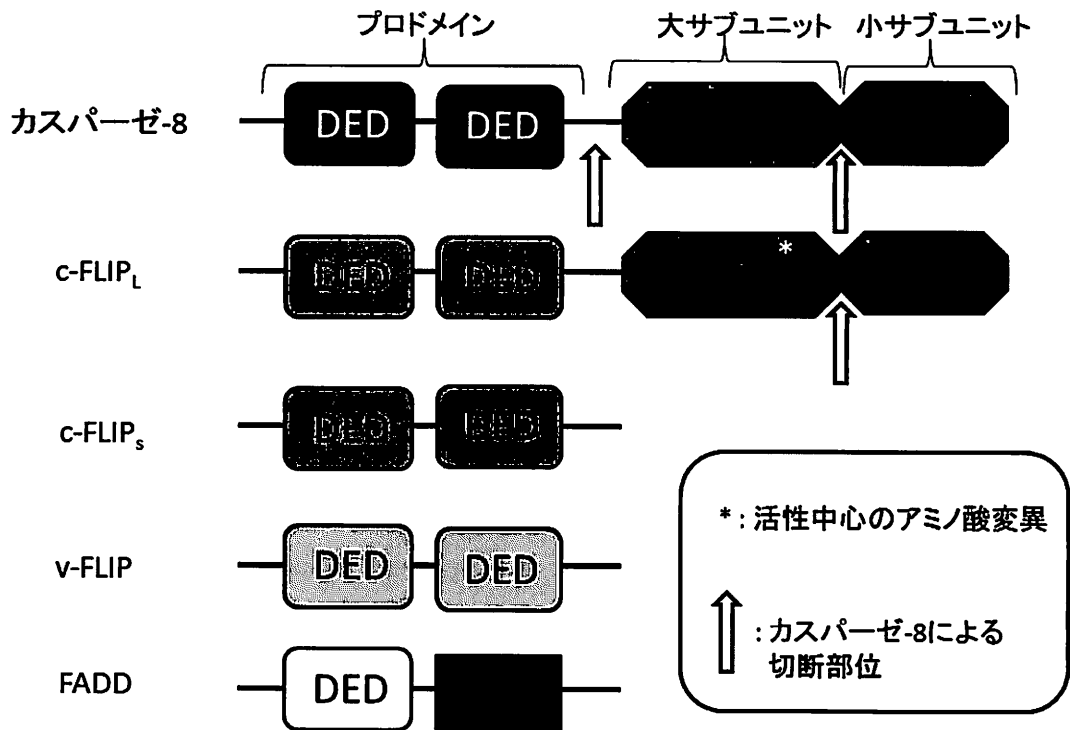


図3 DEDをもつシグナル分子の構造

2. TRAIL-DR経路

ヒト、マウスともにリガンドである TRAIL に対して death-inducing レセプター DR4、DR5 と decoy レセプター DcR1、DcR2、OPG (osteoprotegerin) の5つのレセプターが存在している。これらのレセプターのなかで DR4、DR5 のみがDDを有しておりアポトーシスを誘導するのに対して、decoyレセプターはDDを有していない。DcR1は膜貫通ドメインとDDの両方を欠失しており、GPI(glycophosphatidyl inositol)によって膜にアンカーされている。DcR2はDDが一部分欠失しており機能していない。OPGは可溶性二量体として分泌され、RANKLと結合することもできる。これらの decoy レセプターは TRAIL と結合することができるが、細胞内にシグナルを伝達しない。したがって、これらは機能的デスレセプター三量体の形成を阻害す

ることによって、TRAILを介したアポトーシスから細胞を守ることになる。DR4、DR5の下流のDISCの形成は、Fasを介したアポトーシスのそれと同様である。すなわち、TRAILはDR4またはDR5のクラスター化を引き起こし、FADDとプロカスパーゼ8を動員させDISCを形成させる。そして活性型カスパーゼ8は実行カスパーゼを次々と活性化する。

膜結合型 TRAIL と遺伝子工学的に作成した可溶性 TRAIL はともに、多種多様な起源の腫瘍細胞に対して強力にアポトーシスを誘導する。正常細胞は decoy レセプターを発現しているのに対して、腫瘍細胞は発現していないことから、TRAIL は特異的に腫瘍細胞を殺すことができると考えられているが、これには議論の余地がある。また、TRAIL療法は肝障害を引き起こすとの報告があり^{4,5)}、recombinant TRAILは肝細胞に

アポトーシスを誘導するということから腫瘍治療への応用には至っていない⁵⁾。

3. TNF α -TNFR1経路(図4)

TNF α は様々な機能をもつ炎症性サイトカインである。このサイトカインは157アミノ酸ペプチドからなるホモ三量体として存在する。TNF α は2種類のレセプターを介してその機能を発揮する。一つは、DDを有しているTNFR1であり、もう一つは、DDを欠如しているTNFR2である。TNFR1シグナル伝達の最初の段階では、TNF三量体がTNFR1の細胞外ドメインに結合することにより、阻害分子である silencer of death domain がTNFR1の細胞質内ドメインから解離する。その結果、TNFR1の細胞内ドメイン同士が会合し、アダプター分子である TRADD (TNF receptor-associated death domain) に認識される。TRADDはRIP、TRAF2 (TNF-R-associated factor 2) およびFADDを動員させる。動員されたこれらの分子は、TNFR1シグナル伝達の開始に必要な酵素群を集合させる。FADDはカスパーゼ8をTNFR1複合体に動員し自己切断を起こさせ、カスパーゼカスケードを開始させアポトーシスを誘導する。TRAF2はcellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP-1) とcIAP-2を動員させる。TRAF2はまた、extracellular signal-regulated kinase kinase kinase (MEKK1) やASK1などのMAPKKKを活性化させ、キナーゼカスケードにより最終的にJNKを活性化させると考えられている。プロテインキナーゼRIPは転写因子NF- κ Bの活性化に重要である。

TNFR1を介したアポトーシスでは、2つの連続したシグナル伝達複合体がかかわっている。まず始めに、TNFのTNFR1の結合により、TRADD、RIP1、TRAF2を動員させ、plasma membrane bound complex (複合体I; TNFR1、TRADD、RIP1、TRAF2) が形成される。複合体Iは迅速にNF- κ Bを活性化させる。複合体I形成後、TRADDとRIP1は修飾を受けTNFR1

から解離し、TRADD(またはRIP1)はFADDと結合、これにさらにカスパーゼ8/10が動員しcytoplasmic complex (複合体II; TRADD、RIP1、FADD、カスパーゼ8/10)を形成する。これによって最終的にアポトーシスが引き起こされる。複合体IIが形成されるか否かは抗アポトーシス分子FLIPの量によって規定される。複合体IによってNF- κ Bが十分に活性化されていると、それによってFLIP発現レベルが高くなり、FLIPが複合体IIの形成を阻害しアポトーシスを抑制する。逆に複合体IによるNF- κ Bの活性化が不十分であると、複合体IIはアポトーシスを引き起こす⁶⁾。

TNF α の最終的な生物学的結果は、NF- κ BとJNK経路のバランスによって決定する。NF- κ Bは細胞の生存を促進するのに対し、JNKは細胞死を増強する。TNF α によるJNKの活性化は、NF- κ Bによって誘導される抗アポトーシスタンパクc-FLIPのターンオーバーを加速させる。JNKはE3ユビキチンリガーゼItchをリン酸化・活性化し、Itchはc-FLIPを特異的にユビキチン化し、プロテアソームによる分解を引き起こす。JNK1、Itch欠失マウスまたはJNK阻害剤で処理したマウスは、TNF α による急性肝不全に対して耐性となることが知られており、これらのマウスから採取した細胞ではc-FLIPのユビキチン化および分解は見られない⁷⁾。

アポトーシスの誘導という機能は、生理学的にTNF α の主要な役割ではない。TNF α はNF- κ Bやc-Junなどの転写因子の活性化を介して炎症反応や免疫制御を行う。TNF α の過剰産生やTNFR経路の持続的な活性化は、多発性硬化症、関節リウマチなどの自己免疫疾患の病態形成に深く関与している⁸⁾。現在、抗TNF α 療法は、これらの自己免疫疾患に対して有効な方法として利用されている。

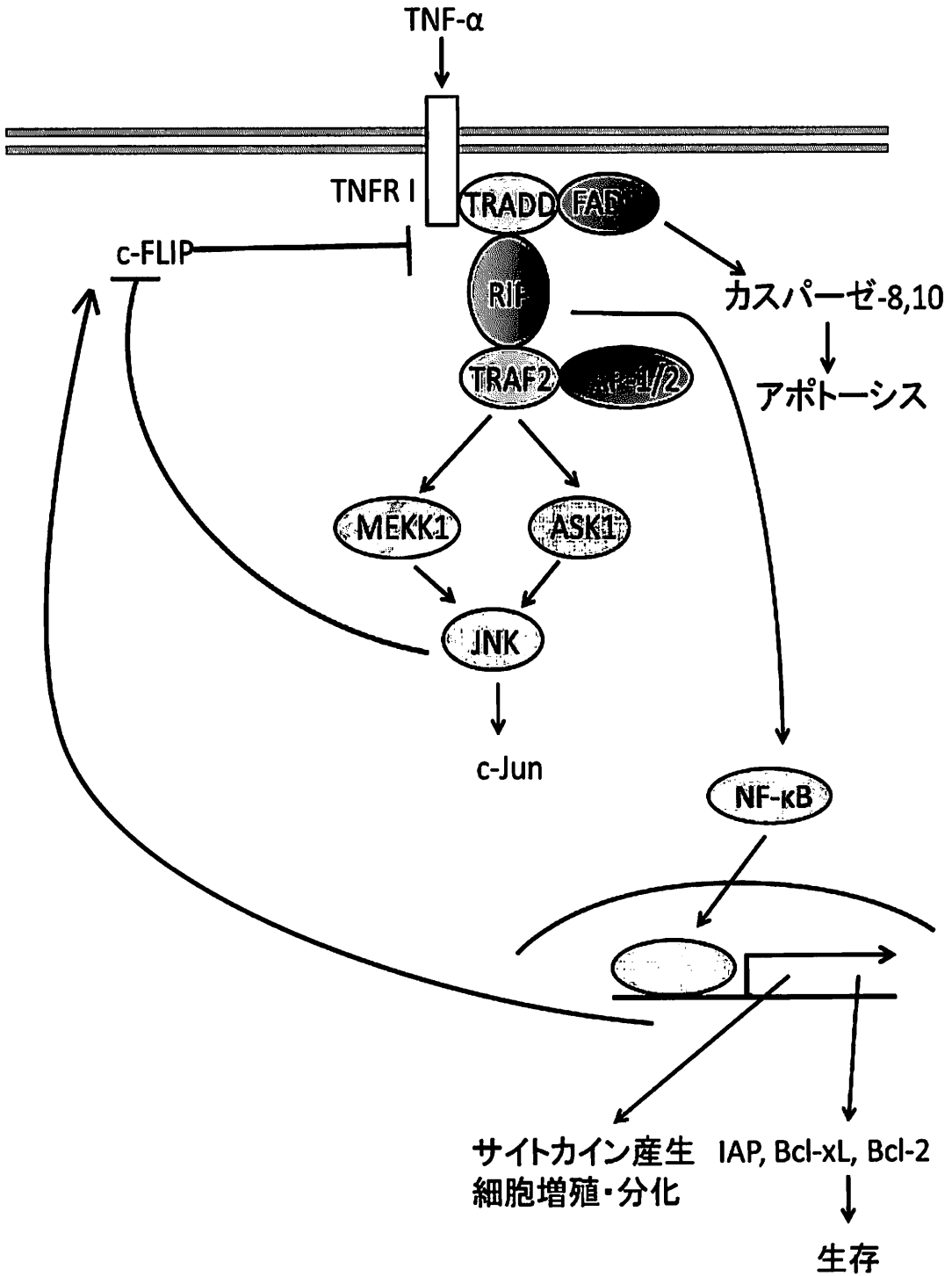


図4 TNF α -TNFR1経路

Ⅲ. ミトコンドリアを介する経路 (intrinsic pathway) (図1)

哺乳類細胞において、ミトコンドリアを介するアポトーシス経路は最終的にMOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization)と呼ばれるミトコンドリア膜透過性変化に集約してくる。MOMPによってミトコンドリア膜間腔から放出された分子はカスパーゼカスケードを活性化させ、不可逆的にアポトーシスへと導く。

MOMPは通常、Bcl-2ファミリータンパクのうちのアポトーシス抑制タンパクによって起こらないように阻止されている。Bcl-2ファミリーに属しているタンパクは最大で4つのBcl-2 homology domain (BH 1 からBH 4) を共有している。Bcl-2ファミリーは、アポトーシスにおけるその役割と共有しているBHの種類から主に3つのサブファミリーに細分される。アポトーシス抑制タンパクであるBcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、Bcl-B⁹、A1、Mcl-1は共通して3~4つのBHを有しており、Bcl-2サブファミリーと呼ばれる。アポトーシス促進タンパクのうち片方のメンバーであるBax、Bak、Bcl-Xs、Bok、Bcl-Gl¹⁰はBaxサブファミリーと呼ばれ2~3つのBHを有している。アポトーシス促進タンパクのもう片方のメンバーはBH 3-onlyタンパクと呼ばれ、Bad、Bid、Bim、Bik、Noxa¹¹、Puma¹²、Bcl-Gs¹⁰、Blk、Bmf¹³、Hrkなどが属し、BH 3のみを共通に有している。これら3つのグループのうち、BH 3-onlyタンパクはBcl-2サブファミリーやBaxサブファミリーの上流に位置し、これらの分子と直接結合することによって、その機能をそれぞれネガティブ、ポジティブに調節している。すなわち、上流のアポトーシスシグナルをミトコンドリアに伝えるシグナル伝達分子として機能している。たとえば、サイトカインの枯渇などによってBH 3-onlyタンパクが活性化すると、BH 3-onlyタンパクはBaxやBakと結合しそれら

を活性化させ、Bcl-2と結合しそれを不活化させる。

MOMPが起これると、膜間腔のタンパクはサイトゾル内に放出される。このタンパクの一つであるシトクロムcはサイトゾル内に存在する単量体Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)に結合する。このシトクロムcの結合により、Apaf-1はコンフォメーションが変化し、Apaf-1のオリゴマー形成を促進する。これは、intrinsic pathwayの開始カスパーゼであるプロカスパーゼ9を動員・オリゴマー化させ、活性型カスパーゼ9に変換する。このシトクロムc、Apaf-1、カスパーゼ9の複合体はアポトソーム (apoptosome)と呼ばれている。続いてカスパーゼ9はカスパーゼ3/7などの実行カスパーゼを切断し活性化させる。

MOMP下流のアポトーシスシグナルの過程は、アポトソームおよびその下流のカスパーゼのレベルで制御されている。カスパーゼの活性は、IAP (inhibitor of apoptosis)ファミリーの分子がカスパーゼに結合することによって調節される。たとえば、ヒトX-linked IAP (XIAP)は少なくともカスパーゼ3と7に直接結合する。XIAPやsurvivinなどのこのような生存タンパクは、多くの腫瘍細胞で過剰発現していることが知られている。加えて、これらのカスパーゼインヒビターは、アポトーシス促進タンパクであるSMAC/DIABLO (second mitochondrial-derived activator of caspase / direct IAP-binding protein with low pI)によって拮抗されている^{14, 15)}。SMAC/DIABLOは活性型カスパーゼ3からXIAPの結合をはずし、アポトーシスを促進する。このように、カスパーゼの活性化および機能は、多種にわたる結合タンパクによって調節されている。

その他のミトコンドリアタンパクでアポトーシス制御因子作用をもつ分子にはAIF (apoptosis inducing factor)がある。AIFはbacterial oxidoreductaseにホモロジーがあり、通常はミ

トコンドリア内に局在しているが、アポトーシス時には細胞質に移行してくる。AIFによるアポトーシスはカスパーゼ阻害剤では阻止することができず、その他のアポトーシス促進因子に非依存的に核の濃縮・断片化を引き起こす。興味深いことに、AIFのレドックス活性領域はアポトーシス抑制作用があり、細胞の生存と死の両方に関係する。カスパーゼ非依存アポトーシスの詳しいメカニズムはよくわかっていない。

便宜上、intrinsic pathwayとextrinsic pathwayに大別したが、実際はこれらの経路は互いにクロストークしている。細胞の種類、刺激、その他の環境要因によって、異なった経路が異なった役割を果たしている。たとえば、細胞内に、実行カスパーゼを直接切断・活性化できないくらいの量しかカスパーゼ8が存在しない場合、カスパーゼ8によってBH3-onlyタンパクであるBidの切断が起こり、この経路が主となる(図1)。Bidの切断によりt-Bidが生成され、これがミトコンドリアからシトクロムcを放出させカスパーゼ9を活性化する。さらに、カスパーゼ9はカスパーゼ8を切断し、ポジティブフィードバックループを形成することによって、もともとのカスパーゼ8からのシグナルを増強する。

IV. その他のアポトーシス経路

セリンプロテアーゼの一種グランザイムは、カスパーゼとは異なった経路で細胞死を引き起こす。T細胞とNK細胞は、ウイルス感染細胞の除去に、顆粒-エキソサイトーシス経路を利用している。この細胞障害性顆粒によって標的細胞にパーフォリンとグランザイムを伝達する。アポトーシスシグナル伝達過程は、各々のグランザイムの種類によって若干異なっている。グランザイムBはカスパーゼ依存・非依存メカニズムによってアポトーシスを誘導する。グランザイムBはカスパーゼ3、カスパーゼ8を切断する他に、Bidなどの他の基質や、ICAD (inhibitor of caspase-activated

deoxyribonuclease) を分解し、CADエンドヌクレアーゼを活性化させる。グランザイムAは、片方のDNA鎖にニックを入れることによって、カスパーゼ非依存的メカニズムによってアポトーシスを誘導する。グランザイムAはSET複合体(270~420kDaの小胞体結合複合体)のいくつかのコンポーネントを分解することによって、NM23-H1 DNaseを遊離させ、片方のDNA鎖にニックを入れる¹⁶⁾。

システインプロテアーゼの一種カルパイン(calcium-activated neutral protease)は、もう一つのアポトーシス経路を形成している。哺乳類のカルパインは、ユビキタスに発現しているCAPN1、CAPN2、2種類の胃特異的カルパイン、筋特異的なCAPN3が存在している。カルパインはカスパーゼと基質のいくつかを共通にしている¹⁷⁾。最近になって、カルパインとカスパーゼは互いにクロストークしていることが示されている^{18, 19)}。プロテアーゼを介したアポトーシスのさらなる解明は、カスパーゼ非依存アポトーシスのメカニズムを解き明かすことになるであろう。

V. おわりに

劇症肝炎、エイズ、神経組織や筋組織の変性性疾患など細胞死が病態形成や病因に本質的に関わっている疾患は数多い。逆に自己免疫疾患や癌の様に起きるべき細胞死が起きないために引き起こされる病気もある。このような疾患に対しアポトーシスをコントロールすることにより治療する試みが行われている。

文 献

- 1) Kabra NH, et al. T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:6307-6312.
- 2) Wang R, et al. Differential regulation of the expression of CD95 ligand, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), TNF-related apoptosis-

- inducing ligand (TRAIL), and TNF- α during T cell activation. *J Immunol* 2001; 166:1983-1990.
- 3) Holler N, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000; 1:489-495.
 - 4) Nagata S. Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nat Med* 2000; 6:502-503.
 - 5) Jo M, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6:564-567.
 - 6) Micheau O, et al. Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114:181-190.
 - 7) Chang L, et al. The E3 ubiquitin ligase Itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 2006; 124:601-613
 - 8) Abe T, et al. Rheumatoid arthritis and tumor necrosis factor α . *Autoimmunity* 2001; 34:291-303.
 - 9) Ke N, et al. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 2001; 276:12481-12484
 - 10) Guo B, et al. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 2001; 276:2780-2785
 - 11) Oda E, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288:1053-1058.
 - 12) Yu J, et al. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7:673-682.
 - 13) Puthalakath H, et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science (New York, NY)* 2001; 293:1829-1832.
 - 14) Chai J, et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406:855-862.
 - 15) Verhagen AM, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.
 - 16) Fan Z, et al. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003; 112:659-672.
 - 17) Gil-Parrado S, et al. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem* 2002; 277:27217-27226.
 - 18) Neumar RW, et al. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278:14162-14167.
 - 19) Nakagawa T, et al. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150:887-894