総	説
---	---

細胞の生と死の分子メカニズム

一條 秀 憲

東京医科歯科大学歯学部歯科理工学第二講座

Molecular Mechanisms for Cell Life and Cell Death

Hidenori Ichijo

Department of Biomaterials Science, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

はじめに

ヒトに生と死があるように、ヒトの身体を構成する約60兆個の細胞も生と死を繰り返しながら個体の恒常性を維持している。そしてヒトの一生に寿命という死の様式があるのと同様に、細胞にも生理的細胞死（細胞のもつ寿命による細胞死）と病理的細胞死が存在する。近年、細胞死研究の急速な進歩に伴い、細胞が「綺麗に死ぬ」ためには細胞自身がもつ秩序立った死のプログラムの遂行が必要であることが明らかにされるとともに、細胞死を司るメカニズムの異常がさまざまな疾患の原因となっていることが急速に解明されつつある。本稿では細胞死のシグナル伝達にかかわる分子群、特にMAPキナーゼ系を介したアポトーシスのシグナル伝達経路に焦点を当てて、細胞の生と死のメカニズムについて考察したい。

I. 細胞死の種類と分類（図1）

形態学的に細胞死にはアポトーシス (apoptosis) とネクローシス (necrosis, 壊死) という少なくとも2つの特徴的な「形態学的死に方」が存在することが1970年頃から知られていた¹⁾。ネクローシスは火傷や極度の炎症反応の結果誘導される病理的組織死のなかに多く認められる細胞死像であり、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の膨化、細胞質の膨化とその結果としての細胞膜破壊を形態学的特徴としており、細胞内物質の流出が要因と考えられる周囲組織での炎症を伴う。ネクローシス像では障害を受けた細胞が一群となって観察されることも特徴である。一方でアポトーシス細胞の形態変化は、細胞の縮小を特徴とし、核クロマチンの凝集、細胞質の狭小化とそれらに引き続くアポトーシス小体（細胞が細胞膜に包まれながら断片化したもの）の出現がみられる（図2）。生体内ではアポトーシス小体が近隣細胞もしくはマクロファージによって貪食され、その結果ほとんど炎症

図1 細胞死の種類と分類

図2 アポトーシス細胞の形態学的特徴

像を伴わないことも大きな特徴とされる。したがって通常の組織像ではアポトーシス細胞像がネクローシス細胞群のような一群の組織像として検出されることは少ない。すなわち死んだ後に何も残らないという点でアポトーシスは「綺麗な死に方」ということになる。

形態学的分類とは別に、細胞死はその機能的分類から生理的細胞死（細胞のもつ寿命による細胞死）と病理的細胞死に区分される。ここでいう生理的細胞死とは細胞内もしくは細胞外の生理的因子の指令によって寿命が決定される細胞死を意味する。生理的細胞死には個体発生過程における形態形成や神経回路形成、さらには免疫系の構築（リンパ球のレパトリー形成）過程や再生系臓器（造血組織、皮膚、精巣など）における老化細胞の除去過程などの局面においてみられる細胞死が含まれ、個体のボリューム、形、そして機能の維持に必須の役割をもつ。そして重要なことは、これまで知られているすべての生理的細胞死の形態学的様式はアポトーシスであり、ネクローシス像は認められないことである。すなわち、アポトーシスは個体が生存するための能動的かつ積極的な細胞死の様式として捉えられている。生理的細胞死のなかでも、特に発生過程において遺伝的プログラムに従って cell autonomous（細胞自律性）に細胞死（アポトーシス）が起きる場合をプログラム細胞死と呼ぶ（狭

義のプログラム細胞死）。プログラム細胞死という用語は、広義にはアポトーシスの同義語としても用いられるが、アポトーシスという言葉はあくまで形態学的実態に基づくものであり、本稿では「アポトーシス」を用語として優先的に用いる。

病理的細胞死にはアポトーシスとネクローシスがともに含まれる。ここでいう病理的細胞死とは外来性非生理的原因によって誘導される細胞死を指し、さまざまな疾患、特にウイルス感染、がん、神経変成、虚血性障害などに罹患した場合や細胞がさまざまな物理的・化学的ストレスを受けた場合、ならびに抗がん剤に代表されるさまざまな薬剤による疾患治療の過程などにみられる細胞死を意味する。病理的細胞死においてはアポトーシス細胞のみ、もしくはネクローシス細胞のみがみられる場合と、アポトーシスとネクローシスが混在して認められる場合がある。外来性刺激によって細胞が殺される場合、細胞は最も綺麗に細胞がなくなるという点で生体にとって有利なアポトーシスを選ぼうとするのかもしれない。しかしながら刺激やダメージを受ける細胞の種類によってはアポトーシスが実行されない細胞やむしろ死に方としてアポトーシスを選ばない細胞も出現した結果、ネクローシスが認められるとも考えられる。この点で、アポトーシスが能動的細胞死であることに対比してネクローシスを受動的と呼んでいいかどうかは疑問である。組織中の死細胞除去という観点からは、綺麗にクリアランスされるという点でアポトーシスに勝る死に方はないと考えられるが、個体の生体防御機構という観点からいえば、むしろ炎症がさらに誘導されるべきこともあり、また創傷の一時的修復過程では「とりあえずのバリアとなる」という意味でそこに細胞塊が残ったほうがよいこともあると考えられる。その意味ではネクローシスも決して消極的な細胞死とはかぎらず、アポトーシスのみが積極的死というよりは、アポトーシスは綺麗に死ぬことに関して能動的かつ積極的な細胞死として捉えられるべきと考えられる。いずれにせよアポトーシスとネクローシスの形態学的な違いがどのような生化学的現象の結果であるかを解析することが細胞死の分子メカニズムを知るうえで最も重要な課題となっている。

II. アポトーシスの実行におけるタンパク分解酵素とDNA分解酵素の役割

アポトーシス細胞の示す最も大きな生化学的特徴は、ヌクレオソーム単位での核DNAの断片化である²⁾。これはアポトーシス細胞で形態学的にみられる核クロマチンの濃縮とよく関連した現象である。断片化されたDNAが大量に出現するというアポトーシス細胞の特徴を利用すると、TUNEL法で細胞内のDNA末端を標識するこ

とによって簡単にアポトーシス細胞を検出することができる。DNA 断片化の生理的意義は、アポトーシス細胞が周囲の細胞に貪食されやすくするため、もしくは、たとえばウイルス感染細胞におけるアポトーシスなどでは感染ウイルス DNA も自身の DNA と一緒に断片化、不活性化されるべきためと考えられている。アポトーシスの最終段階としての細胞の断片化には、アポトーシスに特異的なタンパク分解酵素と DNA 分解酵素が活性化されることが必須と考えられる。特にアポトーシスの実行に重要な働きをもつタンパク分解酵素としてカスパーゼ (Caspase) と呼ばれる一群のシステインプロテアーゼのファミリーが存在することが知られている³⁾。カスパーゼがアポトーシスの実行因子として働くことは、もともと線虫 (*C. elegans*) を用いた遺伝学的解析によって線虫のアポトーシスに必須の遺伝子として単離された *ced-3* という遺伝子産物がシステインプロテアーゼであったことから明らかにされ⁴⁾、現在ではヒトのカスパーゼファミリーのメンバーは 12 種類以上存在することが知られている。カスパーゼファミリーの基質タンパク質としては、カスパーゼがアスパラギン酸残基 (D, Asp) の直後でタンパク質を切断するという特性から多様な分子がその基質となりうる。しかしながら基質特異性なしにはアポトーシスに特徴的な生物現象は起こりえないことからさまざまなアプローチでカスパーゼ特異的な基質の検索が行われている。その結果これまでに核内ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP), IL-1 β 前駆体 (プロ IL-1 β), Rb タンパク質, Rho ファミリータンパク質のインヒビターである D4-GDI, プロテインキナーゼ C δ (PKC δ), DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) など、アポトーシス機能に関連性のあるタンパク質が少なくともカスパーゼファミリーの一員によって切断を受け、不活性化もしくは活性化を受けることが知られている。また、構造タンパク質としては核膜の構成成分であるラミンや細胞骨格の主要な構成分子であるアクチンがやはりカスパーゼの良い基質となることが知られている。しかしながら、これまでのところ、これらの分子は必ずしもアポトーシス特異的なカスパーゼの基質としての必要十分条件を満たす形での証明はなされていない。最近、少なくともカスパーゼを介して DNA の分解に至る経路に非常に重要な働きをもつ一対の分子が同定された。それはカスパーゼのなかでも特にアポトーシスの実行に重要な働きをすると考えられているカスパーゼ 3 (CPP 32) もしくは CPP 32 様カスパーゼによって分解される ICAD [Inhibitor of CAD, 別名 DFF 45 (DNA Fragmentation Factor 45)] と DNA 分解酵素 CAD (Caspase-activated DNase) の複合体である⁵⁾。アポトーシス刺激を受けた細胞内では後述する何らかのシグ

ナルによってカスパーゼが活性化され、細胞質内に存在する DNA 分解酵素複合体 (CAD/ICAD) がその作用を受けた結果、DNA 分解酵素阻害因子である ICAD が分解され、CAD が ICAD から開放される。そして核移行シグナルをもつ CAD は核内に移行して最終的に核 DNA を分解・断片化するというものである。この発見により、これまで大きな謎であったカスパーゼと DNA 分解酵素の分子レベルでのメカニズムの一つが明らかになった。一方で、CAD が活性化されて核 DNA が断片化されるだけでは形態学的アポトーシスの誘導が不完全であることも明らかになってきている。すなわち、アポトーシス細胞において認められる DNA 断片化以外の形態学的特徴は CAD の活性化より上流ですでに別の分子メカニズムを介して行われている可能性が強く示唆されている。ではそこにはどのような分子メカニズムが存在するのか、また細胞外からのアポトーシス誘導刺激がどのようにしてカスパーゼの活性化に変換されるのであろうか?

III. アポトーシスのシグナル伝達

1. プロテアーゼカスケードによるアポトーシスシグナル伝達

カスパーゼ活性化のメカニズムを考えるうえで重要なことは、カスパーゼ自身が別のカスパーゼまたは自身のプロテアーゼ活性によって前駆体が切断、活性化されることである。すなわち、細胞内で上流のカスパーゼから下流のカスパーゼへのカスパーゼファミリーによるシグナル伝達が存在するということである。実際、Fas や TNF レセプターの活性化に伴うアポトーシスのシグナル伝達の主要な経路の一つとして、これらのレセプターからアダプター分子を介した物理的会合によって送られるシグナルがカスパーゼファミリーによるプロテアーゼカスケードを構成し、シグナル伝達経路を形成している (図 3)。果たしてこのプロテアーゼカスケードが直接 ICAD の分解を行う CPP 32 様カスパーゼの活性化につながるのか、それともプロテアーゼカスケードがいったん別のシグナル伝達系に変換されてから再度 CPP 32 様カスパーゼの活性化を引き起こすのかについては明らかではないが、アポトーシス誘導因子の種類によっては両者が使われている可能性もある。後者のメカニズムに関しては、実際上流のカスパーゼカスケードが何らかの活性 (プロテアーゼなのかほかのシグナルなのかは不明) によっていったんミトコンドリア膜電位の異常ならびにシトクローム c の漏出を引き起こすことが知られている^{6,7)}。抗アポトーシス活性をもつ Bcl-2/Bcl-XL のファミリーはそのミトコンドリア上での局在からもカスパーゼカスケードからのアポトーシスシグナルをミトコンドリア上もしくはその近傍で防ぐことによってミトコンド

リア以降にアポトーシスシグナルが伝達されなくすることがその作用機序の一つと考えられている³⁾ (図4)。そして下流のカスパーゼとして考えられているカスパーゼ3は細胞質内に漏出してきたシトクロームcによって活性化を受け、さらに下流へとアポトーシスのシグナルが伝達される。すなわち、アポトーシスのシグナル伝達経路においてミトコンドリアは核と並んで最も重要な細胞

図3 Fasからのアポトーシスシグナルとカスパーゼカスケード

内標的器官と考えられる。そしてアポトーシスを引き起こすさまざまな刺激は、シグナル伝達経路上に存在する多種多様な分子を一部は共有し一部は固有のターゲットとして用いることにより刺激特異性をもつものと考えられる。ではカスパーゼカスケード以外にはどのようなアポトーシスシグナル伝達経路が存在するのであろうか？

2. アポトーシスシグナル伝達系としてのMAPキナーゼカスケード

紫外線、放射線、浸透圧、活性酸素、重力そしてさまざまな薬品類などの物理化学的刺激（ストレス）はある一定の限度を越えると細胞を殺してしまう。また細胞は、その種類や分化程度によって同じ刺激に対して異なる反応を示し、場合によっては死んでしまう。ではどのような細胞がどのような状態のときにどのような刺激をストレスと感じ、それにいかにして対処しているのか？ ストレスの細胞内シグナル伝達、特にストレスによる細胞死のシグナル伝達にはMAPキナーゼファミリー分子が重要な働きをもつことが最近急速に明らかにされてきた。

1) MAPキナーゼスーパーファミリー

MAPキナーゼスーパーファミリーが構成するキナーゼカスケードは、真核細胞において、細胞内外の環境変化（時と場合によってはストレス）が主に核内への情報に変換、伝達されるためのシグナル伝達機構である（図5）。多細胞生物のMAPキナーゼ、特に古典的MAPキナーゼと呼ばれるファミリーは、主に増殖因子刺激のシグナル伝達系としての機能が詳細に解析され、増殖ならびに分化に及ぼす役割が研究されてきた。その構成は、RAFと呼ばれるMAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK), MEKと呼ばれるMAPキナーゼキナーゼ(MAPKK), そしてERKと呼ばれるMAPキナーゼ(MAPK)の3種類のキナーゼを1組の機能単位として働いている⁸⁾ (図6)。図5に示すように、MAPKKKは

図4 Bcl-2ファミリーメンバー

図5 MAP キナーゼカスケードの活性化機序

MAPKK のキナーゼ領域に存在する 2 カ所のセリン/スレオニン残基をリン酸化することにより MAPKK を活性化する。活性化された MAPKK は、MAPK のキナーゼ領域に存在するスレオニンならびにチロシン残基をリン酸化し活性化する。そして活性化された MAPK は核内に移行し、さまざまな転写因子のリン酸化を介して遺伝子発現の調節を行う。

近年 MAP キナーゼの新しいメンバーが複数同定され、その機能の解明に伴って、それらが独立したカスケードを構成していることが明らかになってきた⁹⁾。哺乳類の MAP キナーゼカスケードには古典的 MAP キナーゼカスケードのほかに、MAPK レベルのものとして、JNK (c-Jun N-terminal kinase)/SAPK (stress-activated protein kinase) と p38 MAP キナーゼという少なくとも 2 つの MAP キナーゼに集約されるシグナル伝達カスケードが存在することが知られるようになった (図 6)。これらのカスケードはそれぞれに異なった MAPKKK, MAPKK, MAPK のタンパク質から構成されている (図 6)。MAPK ファミリーには、ERK 1/ERK 2 に加えて、JNK 1/JNK 2/JNK 3 と p38 α /p38 β /p38 γ /p38 δ の 2 つのサブファミリーが存在する。MAPKK ファミリーには、MEK 1 (MKK 1)/MEK 2 (MKK 2) に加えて MKK 4 (SEK 1, JNKK 1), MKK 7 (JNKK 2), MKK 3, MKK 6 などがあり、MAPKKK ファミリーには Raf のほかに Mos, MEKK 1/MEKK 2/MEKK 3, Tpl 2, MUK (DLK, ZPK), MLK 2 (MST 1), MLK 3,

図6 MAP キナーゼスーパーファミリーのメンバーとキナーゼカスケード

TAK 1, MTK 1 (MEKK 4) ならびに ASK 1 (MAPKKK 5) が属している⁹⁾。MEKK 1/MEKK 2/MEKK 3, MUK, MLK 2, MLK 3, TAK 1, MTK 1 ならびに ASK 1 は JNK カスケードの MAPKKK として、さらに TAK 1, MTK 1 と ASK 1 は、p38 カスケードの MAPKKK としても作用する。重要なことは、これら JNK に至る MAP キナーゼカスケードと p38 に至る MAP キナーゼカスケードが古典的 ERK MAP キナーゼカスケードとは大きく異なり、主に細胞障害性サイトカインや浸透圧、放射線、活性酸素などの物理化学的ストレスの情報伝達系として機能することである。さらにこれらのカスケードは細胞死 (アポトーシス) の情報伝達にも重要な位置を占めることが示唆されている。

2) アポトーシス刺激と JNK, p38 MAP キナーゼカスケード活性の相関性

物理化学的ストレス (放射線、紫外線、高浸透圧、熱、活性酸素、リポ多糖、抗がん剤、タンパク合成阻害剤、RNA 合成阻害剤、血清除去、増殖因子除去など) は、ある程度以上細胞に作用させるとアポトーシスを誘導するが、これら物理化学的ストレスの多くは JNK, p38 を強く活性化する。また TNF- α , 抗 Fas 抗体などのアポトーシス誘導因子によっても JNK, p38 が活性化される。これらの事実は、JNK と p38 の MAP キナーゼカスケードが、アポトーシスならびにストレスのシグナル伝達に何らかの役割をもつ可能性を示唆する。一方でこれらの結果は、必ずしも JNK や p38 の活性化がアポトーシスを誘導することを意味せず、むしろアポトーシスが誘導された結果としての活性化である可能性や、アポトーシス以外の生物活性を発揮するためのストレスシグナル伝達系として利用されている可能性もある。JNK や p38 のカスケードが、果たしてアポトーシスを誘導できるかどうかは、カスケード上のそれぞれの分子の構成的

活性型 (constitutively active form) を細胞に導入することによってその十分性が検討されている。MEKK 1 は、N 末端の制御領域を欠失させると構成的活性型のキナーゼとなり、SEK 1/MKK 7-JNK カスケードを活性化するとともに線維芽細胞に発現させるとアポトーシスを誘導する¹⁰⁾。活性型の MKK 3¹¹⁾や MKK 6¹²⁾、さらに ASK 1¹³⁾や TAK 1¹⁴⁾が、それぞれ異なる系でアポトーシスを誘導することが報告されている。このように JNK や p 38 のカスケードに存在するメンバーの少なくとも一部は、アポトーシス誘導能があることが明らかにされている反面、JNK や p 38 のカスケードの活性化がアポトーシス誘導に関係ない場合もあることを示す結果も得られている。たとえば活性型 ASK 1 の過剰発現によるアポトーシスに抵抗性の細胞も存在するし (Saitoh, M. *et al.* 未発表)、前述の物理化学的ストレスは、JNK や p 38 を十分活性化する強さにおいて必ずしも、すべての刺激がアポトーシスを誘導するわけではない。これらは、細胞や刺激の種類によってアポトーシスに必要な JNK や p 38 カスケード活性化の強さもしくは持続時間が異なるか、または刺激の種類によっては、NF- κ B を介した抗アポトーシス活性をもつ分子の発現誘導などのプロテクティブな機構が同時に活性化される可能性などを示唆する。さらには実際、細胞や刺激の種類によって ASK 1-p 38 カスケードの活性が生存シグナル (抗アポトーシスシグナル) として働いている可能性も示唆されている (Takeda, K. *et al.* 未発表)。

いずれにせよ、強制発現系を用いてアポトーシス誘導能を観察するという方法は、本当にアポトーシスの生理的シグナル伝達を反映した結果なのかという強い疑問の原因となる。要するに、何だって過剰発現させれば細胞は死んでしまうだろうという疑いの元になる。これらの疑問に答えるために、JNK, p 38 カスケードをさまざまな方法 (ドミナントネガティブフォームやアンチセンス発現による内在性カスケードの不活化、ならびにノックアウトマウス作成など) によって不活性化することによって、アポトーシス誘導をブロックできるかどうかを検討されている。

セラミドは、放射線、紫外線、活性酸素、TNF- α などの刺激により生成され、ストレスシグナルの伝達物質の一つと考えられている。生理的セラミドの膜透過性アナログである C 2-セラミドは一部の血球系細胞に投与すると、アポトーシスを誘導するが、SEK 1 のドミナントネガティブフォームを発現させることにより、C 2-セラミド、TNF- α によるアポトーシスが抑制される¹⁵⁾。紫外線ならびに γ 線照射によるアポトーシスはドミナントネガティブ p 38 では抑制されないが、ドミナントネガティブ JNK によって抑制される¹⁶⁾。また神経細胞培養

図 7 ヒト ASK 1 の構造 (1375 AA)

液から神経成長因子 (NGF) を除去することにより誘導されるアポトーシスでは、c-Jun, SEK 1, MKK 3 の各ドミナントネガティブフォーム¹¹⁾ならびに、抗 c-Jun 抗体¹⁷⁾がアポトーシスを抑制することが知られており、JNK, p 38 のカスケードが NGF 除去というストレスによって誘導される神経細胞死に必要であることが示唆されている。抗がん剤 (エトポシド) によって誘導されるアポトーシスは、JNK のアンチセンスオリゴヌクレオチドで抑制される¹⁸⁾。また上皮細胞の浮遊培養によるアポトーシス (Anoikis) が SEK 1 のドミナントネガティブで¹⁹⁾抑えられること、ならびにその活性化機構として Caspase 7 による MEKK 1 N 末端制御領域の切断による活性型 MEKK 1 の産生が関与するとされている²⁰⁾。JNK 3 の遺伝子を破壊したノックアウトマウスではカイニン酸による海馬神経細胞のアポトーシスが抑制される²¹⁾。一方で SEK 1 ノックアウトマウス由来の細胞においては、むしろ Fas 誘導性アポトーシスの増強が起きる²²⁾。TNF- α レセプターに直接結合し TNF- α から JNK へのシグナルを下流に伝達するアダプター分子、TRAF 2 のノックアウトマウス由来の細胞においても、TNF- α による JNK の活性化がなくなっているにもかかわらず TNF- α によるアポトーシスはむしろ増強されている²³⁾。これらの結果の食い違いは、(1)刺激の種類、(2)細胞の種類によって JNK ならびに p 38 MAP キナーゼ系がアポトーシスシグナルにもそしてむしろ生存シグナルにも関与することを強く示唆する。

3. アポトーシスシグナル伝達系としての ASK 1 (MAPKK) カスケード

1) ASK 1 (MAPKKK) カスケードとアポトーシス
著者らは昨年、構造上 MAPKKK ファミリーに属する新規のセリン/スレオニンキナーゼ、ASK (Apoptosis Signal-regulating Kinase) 1 を単離した¹³⁾。ヒト¹³⁾ならびにマウス²⁴⁾の ASK 1 はそれぞれ 1,375 個、1,379 個のアミノ酸からなり、分子中央部付近から始まる 1 カ所のセリン/スレオニンキナーゼ領域をもつ (図 7)。N 末端と C 末端に 1 カ所ずつコイルドコイル領域があり、N 末端中央部には FKBP 様のイソメラーゼモチーフが認められ、それぞれタンパク間の相互作用に関与することが示唆されるが、現在までのところその機能については不明である。ASK 1 相同遺伝子は線虫、ショウジョウバエ

イーストならびに293細胞内での
ASK1とチオレドキシンとの結合

図8 ASK1構造変異体とチオレドキシンとの結合

にも存在する。キナーゼ領域の配列は MAPKKK ファミリーに最も近く、なかでも MEKK ファミリーに比較的同源性が高く、前述のように ASK1 は SEK1-JNK カスケードならびに MKK3/MKK6-p38 カスケードを選択的に活性化する。ASK1 を低血清濃度下で上皮細胞に発現させるとアポトーシスが誘導される。ASK1 は、TNF- α ¹³⁾、過酸化水素²⁵⁾、血清除去²⁵⁾、抗 Fas 抗体、セラミド、高浸透圧、タンパク合成阻害剤などのサイトカイン、ストレスによって活性化される。さらに最近、ASK1 がタキソール、タキソテル、ビンブラスチン、ビンキュリスチン、ノコダゾール、コルヒチンなどの抗がん剤、微小管阻害剤によっても強く活性化されるとともにドミナントネガティブ ASK1 (キナーゼ不活性化型変異体 ASK1 (K709R)) を用いた実験から、これらの抗がん剤による JNK の活性化機序の少なくとも一部は ASK1 が仲介していることが明らかになった²⁶⁾。また、ドミナントネガティブ ASK1 を Jurkat 細胞に高発現させると、TNF- α によって誘導されるアポトーシスも抑制された¹³⁾。これらの結果から、ASK1 は TNF- α やストレスによるアポトーシスシグナル伝達機構の一部を形成していると考えられている。TNF- α による JNK の活性化がドミナントネガティブ MEKK1 で抑制されるが、ASK1 (K709R) で抑制できないとの報告もあり、細胞の種類や条件によっては TNF- α から JNK へのシグナル伝達に MEKK1 をはじめとする ASK1 以外の MAPKKK が関与するものと考えられるが、ASK1 (K709R) よりもドミナントネガティブ効果の強い ASK1 (K709M) を用いると、293 細胞における TNF- α による JNK の活性化はほぼ完全に抑制される (Nishitoh, H. *et al.* 未発表)。ASK1 の発現は、皮膚、毛嚢、肺、心臓、軟骨、骨などに部位、時期に特異的に認めらる²⁴⁾。また、粘膜上皮の創傷治癒過程において ASK1 の強い発現誘導が観察され²⁷⁾、発生や組織の修復過程における ASK1 活性制御機構の一つのメカニズムとして ASK1 タンパク質の発現量の変化による制御が

示唆される。

2) ストレスによる ASK1 の活性化機構

前述のように、MAPKK と MAPK の直接的な活性化機序はリン酸化によるものと考えられているが MAPKKK の活性化機序についてはまだ不明な点が多い。その理由としては、一般に MAPKKK の活性化の程度が比較的微細で測定が難しいこと (MAP キナーゼカスケードでは下流にシグナルが伝達されるに従ってシグナルが増幅されるため同じカスケード上の刺激でも MAPK レベルの活性が MAPKKK レベルの活性に比べて計測しやすい)、さらに重要なことは、MAP キナーゼカスケードを活性化する刺激、特に JNK カスケードならびに p38 カスケードを活性化する刺激の種類が非常にバラエティーに富んでおり、質的に異なるさまざまなストレス刺激を認識するための多様な活性化機構が MAPKKK に存在する可能性があるためと考えられる。

最近著者らは、ASK1 活性化の分子機構を明らかにする目的で、酵母 two-hybrid システムを用い ASK1 結合タンパク質の解析を行ったところ、酸化還元 (レドックス) タンパク質、チオレドキシン (Trx) が ASK1 の N 末端に直接結合することを見いだした²⁵⁾ (図8)。ヒトチオレドキシンは、成人 T 細胞白血病由来因子 (ADF) と同一物質であり、その活性中心 (WCGPC) に存在する 2 つのシステイン残基によって、還元能、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) 消去能をもつことが知られている^{28,29)}。さらにチオレドキシンは、TNF- α やシスプラチンなどの抗がん剤によって誘導される細胞死を抑制する活性をもつことが報告されている^{30,31)}。放射線、紫外線、シスプラチンなど多くの物理化学的ストレスは、細胞内に活性酸素種を誘導する酸化的ストレスとしても細胞に作用する。また TNF- α を含む細胞障害性サイトカインや血清除去、増殖因子除去なども活性酸素種を誘導する³²⁾。TNF- α によるアポトーシスのメカニズムにおいて、活性酸素種の産生上昇の重要性については意見の分かれるところであるが、抗酸化剤としての作

図9 酸化刺激によるASK1活性化のメカニズム

用をもつ N-acetyl cysteine (Nac) が, TNF- α や過酸化水素による細胞死を効率よく抑制することも知られている。TNF- α や過酸化水素, さらに血清除去による ASK1 の活性化も Nac によって抑制される。これらのことから, チオレドキシンが ASK1 の抑制性制御因子であることが示唆された。そこで, ASK1 の活性に及ぼすチオレドキシンの影響を検討したところ, チオレドキシンの濃度依存的に ASK1 活性が抑制され, 血清除去によって誘導される ASK1 活性化依存性のアポトーシスもチオレドキシンによって抑制された。そのメカニズムとして以下の3つの可能性が考えられた。(1) ASK1 自身が酸化による活性化を受けるレドックスタンパク質であり, チオレドキシンが直接酸化型 ASK1 を還元して不活化する, (2) ASK1 自身がやはりレドックスタンパク質であり, チオレドキシンがストレスによって生じる細胞内活性酸素種を直接還元消去することにより ASK1 の活性化を抑制している, (3) ASK1 自身はレドックス制御を受けず, チオレドキシンは ASK1 との物理的会合を介して ASK1 の活性を抑制しており, チオレドキシンが酸化されることにより, その会合が外れ, ASK1 が活性化される。これらの可能性を検討するために, 過酸化水素を含むさまざまな酸化剤で直接リコンビナント ASK1 を処理した後, ASK1 の活性を測定したが, 変化が認められなかった。そこで(3)の可能性を検討するために, *in vitro* で ASK1 とチオレドキシンの結合能を検討したと

ころ, チオレドキシンは DTT 存在下の還元条件でのみ ASK1 に結合し, チオレドキシンの活性中心のシステインに変異を入れたものでは ASK1 との結合が全く認められなかった。細胞を用いて TNF- α や過酸化水素による刺激を加え, ASK1 とチオレドキシンの結合の変化を *in vivo* で解析すると, 用量依存的にチオレドキシンが ASK1 から解離するとともに ASK1 の活性化を認め, さらに Nac がこれらの作用を抑制した。チオレドキシンがレドックス制御を受けやすいタンパク質であることを考慮すると, (3)の可能性が最も高いのではないかと考えられる。さらに ASK1 の N 末端側のチオレドキシン結合領域を欠失させた ASK1 は, 細胞内で構成的活性型となり, さまざまな細胞で強いアポトーシス誘導活性をもつことが明らかになった。またチオレドキシンのアンチセンスオリゴを用いて内在性チオレドキシンの発現を抑制すると, ASK1 が活性化され, チオレドキシンが ASK1 活性の抑制に必要であることも示唆された。これらの結果から, 現在われわれは, チオレドキシンが ASK1 の特異的抑制因子として活性酸素種による ASK1 活性化を介したアポトーシスにおける負の制御機構に寄与している可能性があるものと考えている (図9)。果たして TNF- α による ASK1 を介したアポトーシスに活性酸素種がレセプター活性化後の一次シグナルとしてどの程度重要な役割をもつかは不明であるが, 少なくともアポトーシスの結果, ミトコンドリアの機能破綻等によって蓄積される細胞質内活性酸素種がチオレドキシン-ASK1 系にフィードバックされ, ポジティブなループを形成しているのではないかと考えられる。いずれにせよ, チオレドキシン-ASK1 系はレドックスシグナルのキナーゼシグナルへの変換の分子スイッチ機構として機能している可能性が強く示唆された。

さらに最近, Fas ならびに TNF からの ASK1 活性化に至る新しいメカニズムが分子レベルで明らかにされつつある (Nishitoh, H. *et al.* 未発表)。ASK1 ノックアウトマウスの作成・解析, ASK1 発現制御機構, JNK/p38 活性化以外の ASK1 活性の検討, メカニカルストレスを含めた ASK1 活性化刺激の特異性等々, ASK1 をめぐる分子細胞生物学的興味は尽きないところである。これら細胞内シグナル伝達経路の解析が, 単に学問的/知的好奇心を満たすのみならず, 多くの疾患の診断, 治療に応用されることが強く期待される。

おわりに

細胞の生と死のシグナル伝達系の解析は, プログラム細胞死もしくは生理的細胞死という概念がアポトーシスという形態学的実態として記載されてから日が浅いこともあり, まだ研究の端緒についたばかりである。一方で

この分野はその生物学的興味深さのみならずさまざまな疾患との関連性から、爆発的な勢いで研究が進歩していることも事実である。本総説が現時点での細胞死メカニズムの理解ならびに今後の顎顔面口腔研究発展の一助となることを祈念する。

文 献

- 1) Kerr, J. F. R., *et al.* : Br. J. Cancer 26 : 239-257, 1972.
- 2) Cohen, J. J. : Immunol. Today 14 : 126-130, 1993.
- 3) 辻本賀英 : 実験医学 9 : 1996.
- 4) Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. : Cell 75 : 641-652, 1993.
- 5) Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. : Nature 391 : 43-50, 1998.
- 6) Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. : Cell 90 : 405-413, 1997.
- 7) Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. and Newmeyer, D. D. : Science 275 : 1132-1136, 1997.
- 8) 西田栄介 : 実験医学 12 : 1996.
- 9) Minden, A. and Karin, M. : Biochem. Biophys. Acta 1333 : F 85-F 104, 1997.
- 10) Johnson, N. L., Gardner, A. M., Diener, K. M., *et al.* : J. Biol. Chem. 271 : 3229-3237, 1996.
- 11) Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., *et al.* : Science 270 : 1326-1331, 1995.
- 12) Huang, S., Jiang, Y., Li, Z., *et al.* : Immunity 6 : 739-749, 1997.
- 13) Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., *et al.* : Science 275 : 90-94, 1997.
- 14) Shibuya, H., Iwata, H., Masuyama, N., *et al.* : EMBO J. 17 : 1019-1028, 1998.
- 15) Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., *et al.* : Nature 380 : 75-79, 1996.
- 16) Chen, Y. R., Wang, X. and Templeton, D. : J. Biol. Chem. 271 : 31929-31936, 1998.
- 17) Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., *et al.* : Neuron 14 : 927-939, 1995.
- 18) Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M. and Tsuruo, T. : J. Biol. Chem. 272 : 4631-4636, 1997.
- 19) Frisch, S. M., Vuori, K., Kelaita, D. and Sicks, S. : J. Cell Biol. 135 : 1377-1382, 1996.
- 20) Cardone, M. H., Salvesen, G. S. and Widmann, C. : Cell 90 : 315-323, 1997.
- 21) Yang, D. D., Kuan, C. Y. and Whitmarsh, A. J. : Nature 389 : 865-870, 1997.
- 22) Nishina, H., Fischer, K. D. and Radvanyi, L. : Nature 385 : 350-353, 1997.
- 23) Yeh, W. C., Shahinian, A. and Speiser, D. : Immunity 7 : 715-725, 1997.
- 24) Tobiume, K., Inage, T. and Takeda, K. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 239 : 905-910, 1997.
- 25) Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., *et al.* : EMBO J. (in press) 1998.
- 26) Wang, T. H., Wang, H. S., Ichijo, H., *et al.* : J. Biol. Chem. 273 : 4928-4936, 1998.
- 27) Funato, N., Moriyama, K., Saitoh, M., *et al.* : Lab. Invest. (in press) 1998.
- 28) Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., *et al.* : EMBO J. 8 : 757-764, 1989.
- 29) Mitsui, A., Hirakawa, T. and Yodoi, J. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 186 : 1220-1226, 1992.
- 30) Hayashi, T., Ueno, Y. and Okamoto, T. J. : Biol. Chem. 268 : 11380-11388, 1993.
- 31) Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., *et al.* : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 : 3633-3638, 1997.
- 32) Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A. : Immunol. Today 15 : 7-10, 1994.