

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

神経変性疾患におけるイニシエーターカスパーゼ  
活性化の分子機構と非ペプチド性阻害剤の開発  
に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 桃井 隆

平成13(2001)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告書

神経変性疾患におけるイニシエーターカスパーゼ活性化の分子機構と  
非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究-----1

桃井隆

### II. 分担研究報告書

1. カスパーゼ並びに脳機能にかかわるプロテアーゼの阻害剤の探索及び  
創製に関する研究-----9

橋本祐一

2. カスパーゼの立体構造に関する研究-----10

田之倉優

3. 虚血性神経細胞死における CAD (caspase-activated DNase) と DNase II の関  
与に関する研究-----13

山嶋哲盛

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----17

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----18

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
総括研究報告書

神経変性疾患におけるイニシエーターカスパーゼ活性化の分子機構と  
非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究

主任研究者 桃井 隆 国立精神神経センター 神経研究所 疾病研究第5部 室長

研究要旨 1) ポリグルタミン蓄積を原因とする神経変性疾患における神経細胞死でカスパーゼ8の活性化が核内ポリグルタミン凝集とともに起こり、カスパーゼ8の活性型断片がポリグルタミンと共凝集することを、作製したカスパーゼ8の活性型抗体を用いて証明することができた。2) カスパーゼ8、9の活性を著明に阻害する成分を生薬の抽出成分中に見い出した。3) 変異蛋白の蓄積がもたらすERストレスによりカスパーゼ12の318番目のアスパラギン酸が切断され活性化されることが明らかとなった。

研究組織

分担研究者

(1) 東京大学細胞分子生物学研究所

橋本祐一 教授

(2) 東京大学大学院農学生命科学研究科

田之倉優 教授

(3) 金沢大学医学部脳外科

山島哲盛 助教授

A. 研究目的

アルツハイマー病、ポリグルタミン蓄積病などの神経変性疾患における細胞死ではカスパーゼの活性化が原因として問題となっている。こうした神経変性疾患の治療を最終目的として、本研究では神経変性疾患に関与するカスパーゼを特定するとともに、細胞死に関与するカスパーゼの非ペプチド性阻害剤の開発をおこなうことを目的とした。

カスパーゼは線虫から哺乳類まで保存されており、細胞死を実行する分子として、現在までに12種類知られている。カスパーゼの活性化は、細胞死のシグナルにより上位に位置するイニシエーターカスパーゼから、下位に位置するエフェクターカスパーゼへと順に引き起こされ、いわゆるカスパーゼカスケードの活性化を介して細胞死を実行する。現在こうしたイニシエーターカスパーゼとしてカスパーゼ8、9、12が知られている。下位に位置するカスパーゼの活性化の抑制だけでは細胞死は阻害することはできず、また市販のペプチド性阻害剤では、カスパーゼ8、9、12の自己プロセッシングを阻止できないことから、様々な細胞死シグナルと接点をもつカスケードの最上位に位置するイニシエーターカスパーゼ（8、9、12）のオートプロセッシングに対する特異的な阻害剤（非ペプ

チド性およびペプチド性)の開発が必要である。

虚血などの非遺伝性変性疾患ではミトコンドリア障害によるカスパーゼ9の活性化が細胞死をもたらす。われわれは、これまでカスパーゼ3と9の活性型のみを特異的に認識する抗体を作成し、細胞死の機構をカスパーゼの活性化とTUNELとの二重染色法により解析してきた。CAGトリプレットリピートの伸張を原因とするハンチントン舞踏病、DRPLAなどの神経変性疾患では核内でのポリグルタミンの蓄積が観察される。最近、Yuanらのグループがポリグルタミンがカスパーゼ8と細胞質や核内で共凝集を引き起こすことを報告している。本研究ではポリグルタミンの凝集によりカスパーゼ活性化が細胞内のどこでおこるかをカスパーゼ8の活性型を特異的に認識する抗体およびICADの切断点に対する抗体を作成することにより解析した。また、カスパーゼ3、8、9のGST融合蛋白を用いて、酵素活性を阻害する因子を天然化合物とくに各種生薬成分の中で探索し、非ペプチド性阻害剤を探索するとともに、活性部位の解析に必要な結晶化にむけて、リコンビナントカスパーゼの大量調整をおこなった。

## B. 研究方法

1)カスパーゼ3、8、9の切断点を認識する抗体の作成

カスパーゼ3、9、8の活性型に特異的な抗体は、切断部位に対してN末端に担体に結合させるためのシステイン(C)を付加した計6ペプチドを合成し、ペプチドをKLH(Keyhole limpet hemocyanin;シグマ)に結合させたも

のをウサギに免疫して作成し、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

2)抗体の特異性の検討法

pFlag-CMV-2(コダック)を用いて、N端にFlagタグを付加したラットカスパーゼ2D394、マウスカスパーゼ6D162、マウスカスパーゼ8D387(DED領域欠損型)、マウスカスパーゼ9全長、D353およびD368はEcoRI断片を、Flag発現ベクターのEcoRIサイトにサブクローニングした。DNA配列はシーケンスにより確認した。

pEGFP(enhanced green fluorescent protein)-C1 vector(クローンテック)を用いて、N端にEGFPタグを付加したカスパーゼの発現系を作製した。マウスカスパーゼ-8全長、D387の断片は、pEGFP-C1のEcoRIサイトにサブクローニングした。培養細胞への遺伝子導入(トランスフェクション)はリン酸カルシウム法により行った。リン酸カルシウム法を用い、活性型のカスパーゼを認識する抗体の特異性をイムノプロットおよびEGFP融合タンパク質と蛍光標識抗体を用いた二重染色で検討した。

2)TUNEL法と活性型カスパーゼ抗体を用いた免疫染色による二重染色

pEGFP-C1 vectorに72リピートのCAGを導入し、P19EC細胞に導入発現させるとともに、作成したカスパーゼ3、8、9の活性型に対する抗体を用いて、テキサスレッド標識した免疫蛍光染色により二重染色、およびTUNEL染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡下でカスパーゼの活性化と局在および細胞死を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する倫理面については、当該研究所の倫理規定/指針に基づき十分に配

慮の上、実験の計画が立てられている。

### C. 研究成果

#### 1) 活性型カスパーゼ8に対する抗体(anti-m8D387)の作製と特異性

マウスカスパーゼ8の切断部位のN末端側のアミノ酸配列のペプチドを合成し、ウサギに免疫し、精製し、ペプチド抗体 anti-m8D387 とした。FLAG抗体と異なり、作製したカスパーゼ8の切断点に対する抗体(anti-m8D387)は、活性型のFLAG-カスパーゼ8D387と反応するものの、カスパーゼ8の全長には反応しなかった。カスパーゼ8のオートプロセッシングによる切断部位を anti-m8D387 を用いて調べた。COS細胞にマウスプロカスパーゼ8をトランスフェクションすると、ヒトプロカスパーゼ8同様、12時間後からオートプロセッシングによる切断が見られた。EGFP標識したカスパーゼ8をCOS細胞に発現させ、抗体との反応性を調べたところ、その発現の初期には抗体に反応しない細胞が観察されたが、発現が進行するにつれ、ほとんどの細胞がそれぞれの抗体に陽性となった。以上の結果より、anti-m8D387はオートプロセッシングによるマウスカスパーゼ8の断片を特異的に認識することが明らかとなった。この抗体は活性化されたマウスカスパーゼ8を免疫染色法により検出するのに有効であった。この抗体を用いた免疫染色で、CAGトリプレットリピート病の原因と考えられるポリグルタミン凝集による細胞死を調べたところ、核内で活性型カスパーゼ8がポリグルタミン凝集と共凝集して存在していることが明らかとなった。すなわち、ポリグルタミンの核内凝集過程で、カスパーゼ8が活性化し、共凝集したことが明らかとなった。

P19EC細胞にGFP-tagを付加したpolyQ(CAG72リピート:Q72)をトランスフェクションしたところ、トランスフェクション後24~36時間でポリグルタミンの凝集が高頻度でおこり、36~48時間後にTUNEL陽性および形態的なアポトーシス像を誘導した。ポリグルタミン凝集した細胞でアポトーシスを引き起こしている細胞のパーセンテージは時間を追って上昇した。また、11リピートのCAGのGFP-tagを付加したpolyQ(Q11)も同様にトランスフェクションしたところ、凝集は見られず、細胞死も誘導されなかった。カスパーゼ8の活性化を確認するため、トランスフェクション後、48時間の細胞を固定し、カスパーゼ8の活性化抗体(anti-m8D387)で免疫染色を行った。P19EC細胞ではpolyQは高頻度で核内に凝集し(Q72/NA:46%)、核外凝集(Q72/CA)はほとんど観察されなかった(3%)。polyQ凝集によるカスパーゼ8の活性化は凝集が小さな時には検出されず、凝集が大きくなるとTNF処理した細胞に観察されるような細胞全体が染色される像とは異なり、polyQの凝集と一致してカスパーゼ8の活性化が見られた。次に、polyQ核内凝集と細胞死の関係を明らかにするため、P19EC細胞にEGFP-Q72をトランスフェクションしカスパーゼ8の活性化と細胞の形態的な変化を時間を追って観察した。トランスフェクション24時間後、polyQは小さな凝集を作り始めるが、カスパーゼ8の活性化はまだ見られなかったが、36時間後、polyQの凝集が大きくなるとカスパーゼ8の活性化が見られた。36-48時間後ではカスパーゼ8の活性化はpolyQの凝集にとどまっておらず、だんだんと細胞質領域が減少

し、細胞が丸くなってくるのが観察された。最終的にはカスパーゼ 8 の活性化は polyQ 凝集領域のみにとどまらず、細胞全体で活性化が観察された。そこで、polyQ の凝集形成とカスパーゼ 8 の活性化の関係を明らかにするため、P19EC 細胞に EGFP-Q72 をトランスフェクションし、30 時間後の細胞を固定し、カスパーゼ 8 の活性化抗体で免疫染色を行い、optical slice sectioning により、カスパーゼ 8 の活性化の様子を観察した。様々な大きさの polyQ 凝集が観察されたが、大きい凝集ではカスパーゼ 8 の活性化が観察されたが、小さい凝集では活性化は観察されなかった。以上のことからカスパーゼ 8 は polyQ の凝集過程で活性化すると考えられた。さらに、他のカスパーゼの活性化と polyQ による細胞死との関係を調べるため、P19EC 細胞に EGFP-Q72 をトランスフェクションし 48~60 時間後の細胞を固定し、カスパーゼ 3, 9 の活性化抗体を用いて免疫染色を行い、観察を行った。カスパーゼ 3 は活性型の凝集が観察されたが、カスパーゼ 9 の活性型断片の凝集は観察されなかった。また polyQ 凝集によるチトクローム C の放出も観察されなかった。また、カスパーゼ 3, 8 の活性化は z-VAD の添加により著しく抑制され polyQ による細胞死では、カスパーゼの活性化と共に、DNA の断片化も観察された。そこで、polyQ による細胞死と、カスパーゼ、DNA の断片化の関係を調べるため、P19EC 細胞に EGFP-Q72 をトランスフェクションし 48~60 時間後の細胞を固定し、TUNEL 法、PI 染色および ICAD の抗体 (mICAD224) で免疫染色を行い、観察を行った。polyQ 凝集がみられたほとんどの細胞は mICAD224

抗体陽性で、同時に TUNEL 陽性細胞であり、形態的にも細胞死を起こしていた。z-VAD を添加したところ、ICAD の切断および TUNEL は抑制されたが、形態的な死は部分的にしか抑制されなかった。(桃井)

2) 我々はカスパーゼ 3, 8, 9 の活性型 GST 融合蛋白の作製をおこない、高感度、簡便な阻害剤のスクリーニング系を確立することができた。調整したカスパーゼ 3, 8, 9 の基質特異性を各種合成ペプチドの切断を指標として調べたところ、カスパーゼ 3 は Ac-DEVD-MCA に強い特異性をしめし、またカスパーゼ 8, 9 は Ac-IETD-MCA と Ac-LEHD-MCA に特異性をしめした。そこでこれら蛍光合成ペプチドに対する阻害活性を測定することによってマスキングし、各種生薬の抽出液中でのカスパーゼ 3, 8, 9 の酵素活性の阻害を調べた。その結果、ほうじ茶、紅茶など各種茶の成分中にカスパーゼ 3, 8, 9 に対して、共通の阻害活性を有するものと、それぞれの酵素に特異的な阻害活性をもつ成分が存在することを見いだした。現在、成分の精製、同定を行っているが、さらにキノコ、海綿、などさまざまな動植物の成分を探索し、カスパーゼ 8, 9 に対し特異性の高い成分を見いだすべく、探索を続行していきたい(桃井)。

3) 一方、カスパーゼ 8, 9 と同様イニシエーターカスパーゼであると考えられているカスパーゼ 1 2 は、現在までその酵素活性の測定系がイムノプロットや免疫染色法以外で確立されていないため、カスパーゼ 1 2 のプロセッシング部位の同定試み、蛍光合成基質を作成を目指した。カスパーゼ 1 2 の活性化に必要なオートプロセッシン

グの部位を解析し、318番目のアスパラギン酸で切断されることが明らかになった(桃井)。

4) カスパーゼファミリーは互いに配列の相同性があり、立体構造のフォールディングパターンもほぼ同じと考えられる。現在までに立体構造の解かれているカスパーゼ-1、3、8のフォールディングを解析したところ、活性部位付近にはかなりの違いが見られる。カスパーゼ1に比べ、カスパーゼ3はループ1が3残基長く、カスパーゼ8は10残基長くなっており、この領域はカスパーゼ8では短いヘリックスを形成している。ループ3はカスパーゼ1はカスパーゼ3やカスパーゼ8よりも6残基長い。ループ5はカスパーゼ1が最も短い。カスパーゼ8はこれより5残基長く、カスパーゼ3は10残基長いことがわかった。これらのループは基質結合部位を形成しており、各カスパーゼの基質特異性を決定していることが推測された(田之倉)。

5) 一方、カスパーゼの阻害剤の骨格をなす、リーディング化合物を決定するため、プロテアーゼであるアミノペプチダーゼに対する阻害活性をめやすとして、ピューロマイシン、ベスタチン、サリドマイドを設定し、構造の重ね合わせ思考実験から、環状イミド構造を抽出し、系統的に構造展開をおこない、ホモフタルイミドが非ペプチド小分子プロテアーゼ阻害剤のファルマコアになることが明らかになった。今後ホモフタルイミドを骨格を基盤として構造展開、探索研究により目的とする非ペプチド型カスパーゼ阻害剤の開発、創製を行う予定である(橋本)。

5) 虚血性神経細胞死のメカニズムを解明するために、ニホンザルを用いて一過性全脳虚血モデルを作成した。同モデルを用いて海馬CA1領域でのアポトーシス経路の最下流の実行因子であるcaspase-activated Dnase (CAD)、およびライソゾーム酵素のDNase IIの発現と細胞内局在を検索し、虚血性神経細胞死のメカニズムを調べたところCADの活性化によるアポトーシスによる細胞死とともに、ネクローシスによる細胞死像がみられた(山嶋)。

#### D. 考察

カスパーゼ8の活性型のみを認識する抗体を作成し、CAGトリプレットリピート病におけるポリグルタミン凝集がカスパーゼ8の活性化とその凝集をもたらす、結果としてカスパーゼ8-3のカスケードを特異的に活性化し、ICADおよびDNA断片化をともなす細胞死を誘導した。しかし、既知カスパーゼ阻害剤では完全に細胞死を阻害できないことから、より強力な特異的なカスパーゼ阻害剤の開発が要求された。また別の可能性としてカスパーゼ依存性の細胞死はポリグルタミンによる細胞死の一部であり、形態的な細胞死にはカスパーゼ以外の経路が存在する可能性も考えられる。

こういった観点から、変異蛋白凝集がもたらす、ERストレスによる新規カスパーゼ12の活性化機構の解明と阻害剤の開発の必要であるとの認識をもっている。今後、カスパーゼ12の切断部位に特異的に反応する抗体を作製し、変異蛋白の蓄積が観察される神経変性疾患でカスパーゼ12が活性化について検討する予定である。

また、酵素活性の特異性がすでに明らかにされているカスパーゼ3、8、9につい

ては、新規阻害剤探索のためのアッセイ系を確立し、阻害活性の存在を見出すことができたが、酵素活性が未同定なカスパーゼ12については、活性化に必要な切断部位を同定することができたので、今後蛍光性プロセッシング部位のアミノ酸配列を基に蛍光合成基質を作成し、カスパーゼ12の測定系を確立し、カスパーゼ12に対する阻害剤をもスクリーニングする計画を予定している。

また、カスパーゼ12の結晶化し、これまで報告されているカスパーゼファミリーの結晶解析のデータとあわせ、構造機能相関を考え、得られた立体構造を元に特異的なリガンドをデザインし、アポトーシスを効果的に抑制する阻害剤の開発を行う予定である。

#### E. 結論

カスパーゼ8の活性型のみを認識する抗体を作成し、ポリグルタミン凝集がカスパーゼ8の活性化とその凝集をもたらすことが明らかとなった。ER ストレスに關与する新規カスパーゼ12の活性化に必要な切断部位を同定することができた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Fujita, E., Egashira, J., Urase, K., Kuida, K., and Momoi, T. Caspase-9 processing via feedback amplification loop in vivo. Cell Death and

Differentiation 8, 335-344 (2001).

2. Takahashi, K., Kamiya, K., Urase, K., Fujita, E., Suga, M., Mori, H., Yoshikawa, Y., Ichimura, K., Kuida, K., and Momoi, T. Requirement of caspase-3 in the adult auditory system. Brain Res 894, 359-367 (2001)

4. Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H., Miura, M. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. J. Exp. Med. 193, 111-122 (2001)

5. Kouroku, Y., Fujita, E., Urase, K., Tsuru, T., Setsuie, R., Kikuchi, T., Yagi, N.-Y., Miyata, N., Momoi, Y.M., and Momoi, T. Caspases, which are activated during generation of nuclear polyglutamine aggregates, are necessary for DNA fragmentation, but not sufficient for cell death. J. Neurosci. Res. 62, 547-556 (2000)

6. Zheng, Kuida, K., Momoi, T., Nicholson, Y., Lezbeck, Fravelli, Deficiency of caspase-9 or caspase-3 induces the compensation of caspase. Nature Medicine 6, 1241-1247 (2000)

7. Ijiri, R., Tanaka, Y., Kato, K., Misugi, K., Nishihira, H., Toyoda, Y., Kitagawa, H., Nishi, T., Takeuchi, M., Aida, N., Momoi, T. Clinicopathologic study of mass-screened neuroblastoma



- with special emphasis on untreated observed cases. *Am. J. Surgical Pathology*. 24, 807-815 (2000)
8. Fujita, E., Urase, K., Egashira, J., Isahara, K., Uchiyama, Y., Motoyama, N., Kuida, K., and Momoi, T. Activation of caspase-9 in the nervous system of Bcl-xL deficient mice embryos. *Dev. Brain Res.* 122, 135-147 (2000)
9. Tanaka, M., Momoi, T., Marunouchi, T. In situ detection of activated caspase-3 apoptotic granule neurons in the developing cerebellum in slice culture and in vivo. *Dev. Brain Res.* 121, 223-228 (2000)
10. Kouroku, Y., Fujita, E., Mukasa, T. Momoi, M.Y., and Momoi, T. Localization of active form of caspase-8 in mouse L929 cells induced by TNF and polyglutamin. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 270, 972-977 (2000)
11. Ikezoe, K., Yan, C., Momoi, T., Imoto, C., Minami, M., Ariga, M., Nihei, K., and Nonaka, I. A novel congenital myopathy with apoptotic changes. *Acta Neurology* 47, 531-536 (2000)
12. Hisahara S, Araki T, Sugiyama E, Yagami Ki, Suzuki M, Abe K, Yamamura Ki, Miyazaki Ji, Momoi, T., Saruta T, Bernard CC, Okano H, and Miura M. Targeted expression of baculovirus p35 caspase inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. *EMBO J* 19, 341-3348 (2000)
13. Komoda M, Kakuta H, Takahashi H, Fujimoto Y, Kadoya S, Kato F, Hashimoto Y. Specific inhibitor of puromycin-sensitive aminopeptidase with a homophthalimide skeleton: identification of the target molecule and a structure-activity relationship study. *Bioorg Med Chem.* 9, 121-131 (2001)
14. Hashimoto Y. Bioprobes recognizing nucleic acids and signal transduction factors. *Recent Res. Develop. Org. Chem.*, 4,87-120 (2000)
15. Rokudai S, Fujita N, Hashimoto Y., Tsuruo T. Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *J Cell Physiol.* 2000 Feb;182, 290-296 (2000)
16. 高橋裕保、篤田正人、加来田博貴、橋本祐一。環状イミド構造を有する特異的アミノペプチダーゼ阻害剤リードの創製。薬学雑誌、120, 909-920 (2000)
2. 学会発表
- 1) 神保敦、高鹿依子、藤田恵理子、江頭潤、桃井隆：  
ポリグルタミン凝集による細胞死とカスパーゼの活性化の解析  
第23回日本神経科学大会、横浜、9.5, 2000
- 2) 藤田恵理子、祖山晃子、神保敦、浦瀬香子、桃井隆：  
神経細胞におけるカスパーゼ1,2の活性化

と ER ストレス

第 23 回日本神経科学大会, 横浜, 9.5, 2000

3) 高鹿依子, 藤田恵理子, 浦瀬香子, 桃井隆 :

ポリグルタミン蓄積によるカスパーゼの共凝集および活性化の解析

第 73 回日本生化学会, 横浜, 10.12, 2000

4) 江頭潤, 高鹿依子, 浦瀬香子, 辻勉, 桃井隆 :

ICAD 切断部位を特異的に認識する抗体を用いてのカスパーゼ 3 非依存性細胞死の解析

第 73 回日本生化学会, 横浜, 10.12, 2000

H. 知的財産権の出願、登録状況

特になし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

カスパーゼ並びに脳機能にかかわるプロテアーゼの阻害剤の探索及び創製に関する研究

分担研究者 橋本 祐一 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

研究要旨：非ペプチド型の小分子カスパーゼ阻害剤の探索・開発に当たり、プロテアーゼの機能阻害にかかわる活性最小構造単位を求め、脳機能にかかわるピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼを対象に構造展開研究を行った。その結果、N-フェニルホモフタルイミド骨格が有望なファルマコフォアたり得ることを示すことができた。

A. 研究目的

カスパーゼの生理機能並びにその活性化の機構を分子レベルで理解するためのプローブとして、非ペプチド型の小分子阻害剤の発見・開発が望まれる。本年度は、その手始めに、プロテアーゼの阻害にかかわる最小必須構造単位を見いだすことを目的として研究を行った。

B. 研究方法

活性最小構造単位の探索の指標として、エンケファリンの分解酵素として脳機能に関与するとされるピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼに対する阻害活性を選択した。リード化合物にはピューロマイシン、ベスタチンに加え、レム睡眠をも延長させる活性を持つ催眠薬としてユニークかつ有名なサリドマイドを設定した。構造の重ね合わせ思考実験から、環状イミド構造を抽出し、系統的に構造展開を行った。

C. 研究結果

いくつかのN-フェニルフタルイミド誘導体及びいくつかのN-フェニルフタルイミド誘導体に強力なピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ阻害活性を引き出すことに成功した。前者は、本酵素のみならず、ペプチジルペプチダーゼにも阻害活性を示す選択性の低いものであったが、後者は類縁の他のアミノペプチダーゼ（アミノペプチダーゼN等）には全く活性を示さず、高い特異性を持つものであった。最も強力な化合物として、N-(2,6-ジエチルフェニル)ホモフタルイミドの創製に成功し、本化合物はベスタチンやピューロマイシンにはるかに勝る活性を有していた。

酵素化学的解析により、本化合物は、標的酵素に対して非競合的に阻害活性を示すものであることを明らかにした。

D. 考察

ホモフタルイミドは、非ペプチド性小分子プロテアーゼ阻害剤の良好なファルマコフォアになると考えられる。本骨格を基盤にした構造展開並びに探索研究により、目的とする非ペプチド型のカスパーゼ阻害剤の開発・創製に向けての第1歩が開けたと考える。

E. 結論

ホモフタルイミド骨格を有する。強力かつ特異的なピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼの創製に成功した。

F. 研究発表

1. M. Komoda, H. Kakuta, H. Takahashi, Y. Fujimoto, S. Kadoya, F. Kato, Y. Hashimoto: Specific inhibitor of puromycin-sensitive aminopeptidase with a homophthalimide skeleton. Identification of the target molecule and a structure-activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem.*, 9: 121-131 (2001).
2. Y. Hashimoto: Bioprobes recognizing nucleic acids and signal transduction factors. *Recent Res. Develop. Org. Chem.*, 4: 87-120 (2000).
3. S. Rokudai, N. Fujita, Y. Hashimoto, T. Tsuruo: Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, 182: 290-296 (2000).
4. 高橋裕保、薦田正人、加来田博貴、橋本祐一: 環状イミド構造を有する特異的アミノペプチダーゼ阻害剤リードの創製. *薬学雑誌*, 120: 909-920 (2000).

## カスパーゼの立体構造に関する研究

田之倉 優

カスパーゼはアポトーシスの実行を担う因子として知られている。カスパーゼはシステインプロテアーゼであり、12種類のカスパーゼがカスパーゼカスケードを構成している。このカスケードでは上位のカスパーゼが自己プロセッシングにより活性化することでカスケードのスイッチが入り、下位のカスパーゼが逐次プロセッシングされて活性化する。カスケードの最上位に位置するイニシエータカスパーゼ8、9、12はアポトーシスの原因となるシグナルによって自己プロセッシングを開始するが、アポトーシスを抑制するにはこれらの自己プロセッシングを阻害し、カスパーゼカスケードのスイッチを入れさせないことが有効な方法と考えられる。

本研究は、カスパーゼの立体構造を解明し、それに基づいて阻害剤をデザインすることを目的とする。今年度は構造が決定されているカスパーゼについてその特徴を調べる。

カスパーゼファミリーは互いに配列の相同性があり、立体構造のフォールディングパターンもほぼ同じと考えられる。実際、現在までに立体構造の解かれているカスパーゼ-1、3、8のフォールディングはほぼ同じである(図1)。一方、活性部位付近にはかなりの違いが見られる。カスパーゼ1に比べ、カスパーゼ3はルー

プ1が3残基長く、カスパーゼ8は10残基長くなっており、この領域はカスパーゼ8では短いヘリックスを形成している。

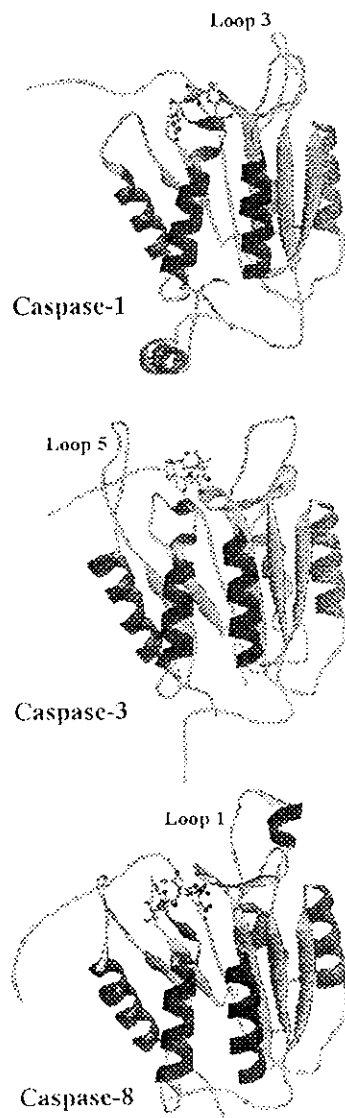


図1 カスパーゼの立体構造  
PDB ID カスパーゼ-1: 1ICE, カスパーゼ-3: 1GFV, カスパーゼ-8: 1QTN

ループ3はカスパーゼ1はカスパーゼ3やカスパーゼ8よりも6残基長い。ループ5はカスパーゼ1が最も短い。カスパーゼ8はこれより5残基長く、カスパーゼ3は10残基長い。これらのループは基質結合部位を形成しており、各カスパーゼの基質特異性を決定していると考えられる。したがって、本研究の標的タンパク質の1つであるカスパーゼ-8の基質結合部位の特異性をカスパーゼ1、3と比較し、基質結合部位を構成するアミノ酸残基や表面電荷の分布(図2)などから、合理的な阻害剤のデザインを行える。

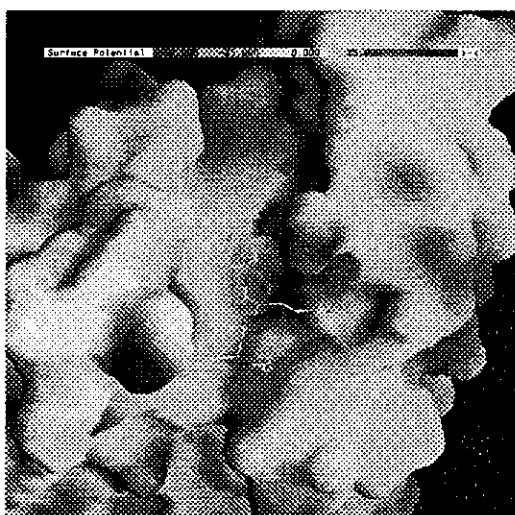


図2 カスパーゼ-8の活性部位付近の分子表面と電荷分布

しかしながら、これらの立体構造はいずれもプロセッシング後のカスパーゼのものである。仮にこれらの立体構造を元に阻害剤を開発すると、それぞれ下位のカスパーゼのプロセッシングを阻害するものとなるが、むしろ、各カスパーゼの自己プロセッシング自体を阻害する方が有効な戦略となると考えられる。現在ま

でに立体構造の知られているプロセッシング前のプロカスパーゼは、プロカスパーゼ-9のN末端側112残基のプロドメインのみである(図3)。プロカスパーゼ-9のプロドメインは主に静電相互作用によってプロテアーゼ活性化因子Apaf-1と結合している(図4)。プロカスパーゼ-9の相互作用部位の分子表面は正電荷に富んでおり、負電荷を持つペプチドあるいは非ペプチド性の化合物をデザインすることで、活性化を抑制できるものと考えられる。

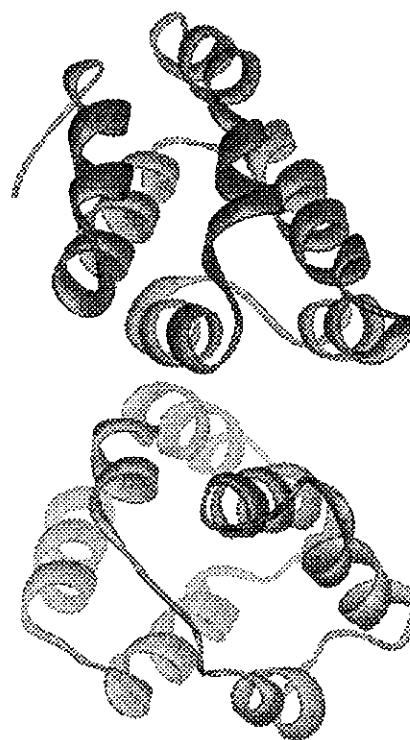


図3 カスパーゼ9のプロドメイン(橙)と活性化因子 Apaf-1(緑)の複合体  
PDB ID: 3YGS

我々のグループでは今後カスパーゼ-9、12およびプロカスパーゼ-8、12の立体構造解析を行う。これにより、カスパーゼ

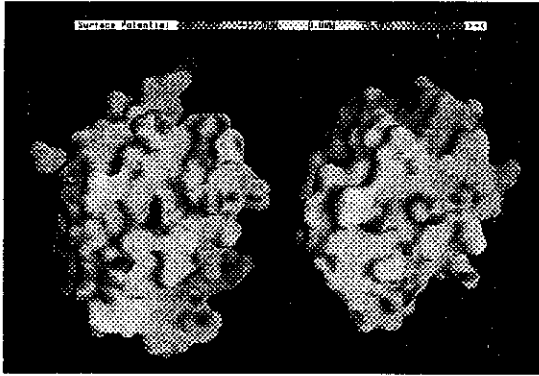


図 4 プロカスパーゼ-9(左)と Apaf-1(右)の相互作用部位

ファミリーの構造機能相関がより明確になると考えている。さらに、得られた立体構造を元にカスパーゼカスケードの上位に位置するこれら 3 つのカスパーゼに結合するリガンドをデザインし、アポトーシスを効果的に抑制する阻害剤の開発を行う予定である。

#### 参考文献

- 1) Watt W. *et al.*: The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure*, 7 1135-1143, 1999
- 2) Qin H. *et al.*: Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature*, 399 549-557, 1999
- 3) Van de Craen M. *et al.*: Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett.*, 403 61-69, 1997
- 4) Chan S. L. & Mattson M. P.: Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.*, 58 167-190, 1999
- 5) Wang K. K.: Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23 20-26, 2000
- 6) Wilson KP. *et al.*: Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme *Nature*, 370 270-275, 1994
- 7) Lee D. *et al.*: Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J. Biol. Chem.* 275 16007-16014, 2000

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

「虚血性神経細胞死における CAD (caspase-activated DNase)と DNase II の関与」  
に関する研究

分担研究者 山嶋哲盛

金沢大学大学院医学系研究科脳病態医学講座脳機能制御学

研究要旨

虚血性神経細胞死のメカニズムを解明するために、ニホンザルを用いて一過性全脳虚血モデルを作成し、海馬 CA1 領域でのアポトーシス経路の最下流の実行因子である CAD、およびライソゾーム酵素の DNase II の発現と細胞内局在を検索すると共に、虚血性神経細胞死の細胞死パターンを検索した。

CAD の mRNA 発現量は、コントロール（虚血負荷なし）に比し虚血後 1 日で約 8.09 倍に増加していた。CAD 蛋白の発現量は虚血後 1 日で約 7.28 倍に増加し、CAD 蛋白は、虚血後、細胞質から核内へと移行していた。一方、DNase II 活性型蛋白の発現量は、コントロールに比し虚血後 2 日で約 2.47 倍、虚血後 3 日で約 2.54 倍に増加していた。DNase II 蛋白は虚血後 2 日で、CAD と同様に細胞質から核内への移行を来した。虚血後 3 日および 5 日にて、CA1 の神経細胞は TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)染色陽性を示した。しかし、これらの細胞は、光学顕微鏡にて好酸性の凝固壊死を示し、電子顕微鏡にてアポトーシスの形態学的変化は示さなかった。さらに、DNA 断片化の解析にてアポトーシスに特徴的なラダー像はみられず、ネクローシスに特徴的なスメア…像がみられた。

以上より、一過性全脳虚血後に生じるニホンザル海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死は、ネクローシスによって神経細胞死が生じていることが示唆された。ネクローシスを誘発する因子として、ライソゾームから放出される DNase II が関与していることが示唆された。ニホンザルの虚血性神経細胞死においても、アポトーシス経路が最下流まで働いていることが確認されたが、その役割については次年度に検索する予定である。

A. 研究目的

げっ歯類からヒトに至るまで、海馬アンモン角 (Cornu ammonis, CA) 1 領域の神経細胞が虚血に対して脆弱性を示すことはよく知られている。虚血性神経細胞死のメカニズム

に関しては、最近、主としてげっ歯類や培養細胞を用いた研究に基づきアポトーシス説が多数報告されている。しかし、ヒトにおいて、どのような分子が細胞死を決定もしくは実行しているのかは現在なお不明である。本研究

は、霊長類の海馬 CA1 に生ずる虚血性神経細胞死がアポトーシス、ネクローシスのいずれによるものか、また、その最終実行因子は何であることを明らかにすることである。

## B. 研究方法

本研究においては、ニホンザルを用いて 18 分間の全脳虚血を行い、CA1 の神経細胞において、アポトーシス経路の最終実行因子である キャットド (caspase-activated DNase, CAD)、およびネクローシスにも関与し得るライソゾーム酵素である DNase II と神経細胞死の関与について検討した。ニホンザルの CAD をクローニングした後、シークエンスディテクターを用いて虚血前後の CA1 における CAD の mRNA 発現量を検索した。また、イムノブロット法と免疫組織化学的手法を用いて、CA1 における CAD と DNase II の蛋白発現および細胞内局在を検索した。さらに、電子顕微鏡ならびに DNA 断片化の解析を行い、虚血性神経細胞死の細胞死パターンがアポトーシス、ネクローシスのいずれであるかを検索した。

### (倫理面の配慮)

ニホンザルの飼育と実験に際しては、金沢大学の実験動物倫理委員会の許可を得た上で、動物愛護の精神に基づき以下の点に配慮した。飼育室はエアコン付きの部屋の中で、十分に広いケージにて 1 頭ずつ飼育した。飼育ケージは自動給餌／自動排便装置付きの最新式のものを用いた。固形餌料の他に毎日りんご、にんじんなどの果物や野菜を与えた。実験に際しては、ケタラールの筋肉内注射を行った後、ヒト患者に対するのとほぼ同様に気管内送管してイソフルレンの全身麻酔を行い、完全な無痛下で行った。実験中および実験後は

点滴により水分と栄養を補給し、保温ブランケットを使用して体温の低下がおこらぬように配慮した。

## C. 研究結果

1. ニホンザルの一過性脳虚血モデルにおいて、CAD の mRNA および蛋白の発現が虚血後 1 日で増加していた。さらに、免疫組織化学的に、増加した CAD が神経細胞の細胞質から核へ移行している所見が得られた。

2. DNase II の活性型蛋白は、虚血後 2 日および 3 日で増加していた。さらに、免疫組織化学的に、虚血後 2 日および 3 日で、DNase II が神経細胞の細胞質から核へ移行している所見が得られた。

3. 虚血後 3 日および 5 日において、海馬 CA1 神経細胞は TUNEL 染色は陽性を示したが、それらの神経細胞は光学顕微鏡観察では好酸性の凝固壊死像を示した。

4. 電子顕微鏡観察において、虚血後の神経細胞はいずれの時期においてもアポトーシスの形態像を示さなかった。虚血後初期においては、虚血神経細胞は典型的なネクローシスの形態像は示さなかったが、ライソゾーム膜の断裂を認めた。虚血後後期では、虚血神経細胞は典型的なネクローシスの形態を示した。しかも、海馬 CA1 領域の DNA 断片化解析では、ネクローシスに典型的なスメア像がみられた。

## D. 考察

近年、主としてげっ歯類や培養細胞を用いた研究から、虚血性神経細胞死のメカニズムはアポトーシスであるとする報告が多い。今回の実験結果においても、CAD の動態変化があることからアポトーシス経路が最終段階



まで働いていることが証明された。しかも、アポトーシス経路が最終段階まで働いているにもかかわらず、細胞死の形態学的特徴はアポトーシスではなくネクローシスの像を呈していた。アポトーシスの経路はネクローシスの発生にどのように関与しているのであろうか。Liら(33)が推定するように、アポトーシス経路は直接細胞死に関わるのではなく、むしろ虚血に伴う炎症反応などに関与しているのかもしれない。あるいは、CADの脳内における発現量がDNase IIと比べてきわめて少ないために、神経細胞はアポトーシスの実行ができないのかもしれない。したがって、CADは、虚血性神経細胞死の主因ではなく副因である可能性が高い。霊長類における虚血性神経細胞死は、虚血負荷によって発現が増加したDNase IIのライソゾーム外への放出と、ひき続きおこる核内への移行がDNAを分解し、同時にライソゾーム外へ放出されたカテプシンが細胞内構成蛋白およびDNAを分解し、この両者が相補的にCAI神経細胞のネクローシスを惹起しているものと思われた。

## E. 結論

以上より、ニホンザルの海馬の虚血性神経細胞死はネクローシスによるもので、アポトーシス経路が最終経路まで働いてはいるものの、直接的には細胞死を誘発していないことが示唆された。虚血後発現量の増加をきたしたDNase IIは、ライソゾーム酵素のカテプシンと共にライソゾーム外へ放出され、両者がDNAを不規則に切断することによりネクローシスが生ずるものと推定された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) Yamashima T

Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin, and caspase in ischemic neuronal death of primates.

Prog. in Neurobiology, 62 (3): 273-295, (2000)

#### 2) 野村素弘、山嶋哲盛

脳虚血および脳梗塞の分子生物学

Molecular Medicine 臨時増刊号 Vol 37: 154-159, 中山書店、(2000)

#### 3) 光田幸彦、山嶋哲盛

虚血性神経細胞死

脳神経科学イラストレイテッド、273-278、羊土社、(2000)

### 2. 学会発表

#### 1) 山嶋哲盛

海馬と痴呆(神経細胞死)

第7回九州神経・耳科研究会 特別講演  
九州大学(博多)、2000

#### 2) 山嶋哲盛

霊長類に特異的な虚血性神経細胞死

アポトーシスとネクローシスの相関

第43回日本神経化学会 金沢大会(金沢)

シンポジウム「脳虚血」、2000.10.18-20.

#### 3) T. Yamashima, S. Kida, J. Yamashita

Implication of cysteine proteases calpain,  
cathepsin and caspases in ischaemic  
neuronal death of primates  
Birmingham, September 3-6

H. 知的財産権の出願、登録状況  
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kouroku, Y., Fujita, E., Urase, K., Tsuru, T., Setsuie, R., Kikuchi, T., Yagi, N.-Y., Miyata, N., Momoi, Y.M., and Momoi, T.	Caspases, which are activated during generation of nuclear polyglutamine aggregates, are necessary for DNA fragmentation, but not sufficient for cell death.	J. Neurosci. Res.	62	547-556	2000

20000440

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。