

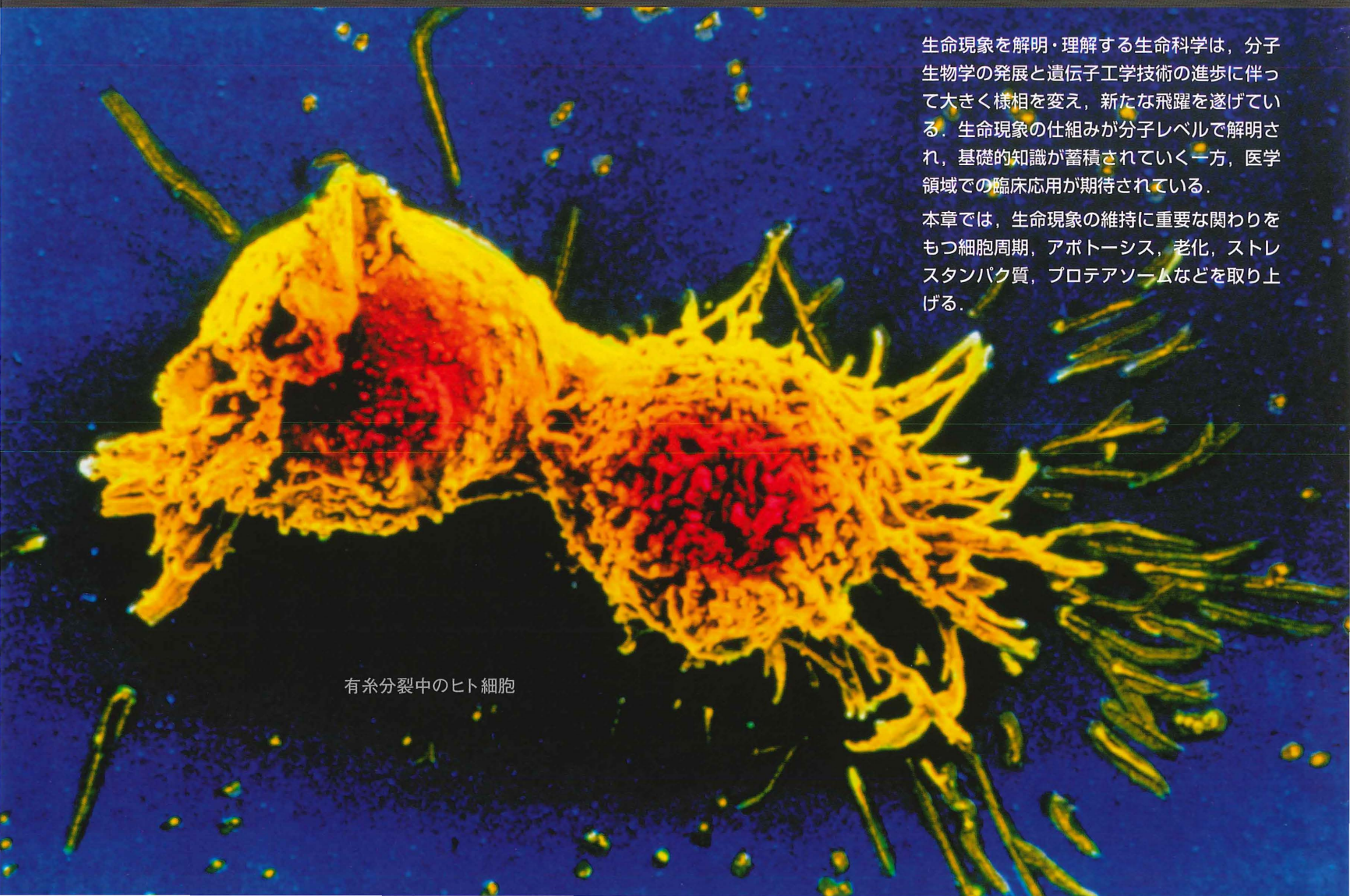
Section 5

生命科学

生命現象を解明・理解する生命科学は、分子生物学の発展と遺伝子工学技術の進歩に伴って大きく様相を変え、新たな飛躍を遂げている。生命現象の仕組みが分子レベルで解明され、基礎的知識が蓄積されていく一方、医学領域での臨床応用が期待されている。

本章では、生命現象の維持に重要な関わりをもつ細胞周期、アポトーシス、老化、ストレスタンパク質、プロテアソームなどを取り上げる。

有糸分裂中のヒト細胞



生命科学

細胞周期 cell cycle

1 細胞周期とその調節因子

細胞が正しく増殖するために、正確な DNA 複製と均等な細胞の分配を保証する調節機構が、細胞周期の進行過程で働いている。もし DNA 複製が終了する前に細胞分裂が始まってしまうと、染色体が赤道面に配列する前に分配が起こり、異常な染色体セットをもつ細胞ができてしまう。癌細胞は、細胞周期の回転が暴走した場合と考えられる。

1 細胞周期の過程

通常の細胞周期の過程は、 G_1 期→S 期→ G_2 期→M 期の順に進行する。 G_1 期、S 期、 G_2 期を休止期あるいは間期と呼び、細胞形態に大きな差はない。これに対して M 期は、染色体の形成、核膜の崩壊、核の分裂、細胞質の分裂といった大きな変化を伴う。細胞が増殖を休止している状態が G_0 期である。細胞周期の観点からみると、増殖は細胞周期を繰り返し分裂する状態、分化は細胞周期を静止・変更した状態、アポトーシスは細胞周期を停止して細胞死した状態と考えることができる。

➡ 各細胞周期の役割と移行期のチェックポイント

G_1 期 (DNA 合成準備期) : S 期に移行するためのチェックポイントとなる。

S 期 (DNA 合成期) : 遺伝情報を担う DNA を複製する過程。

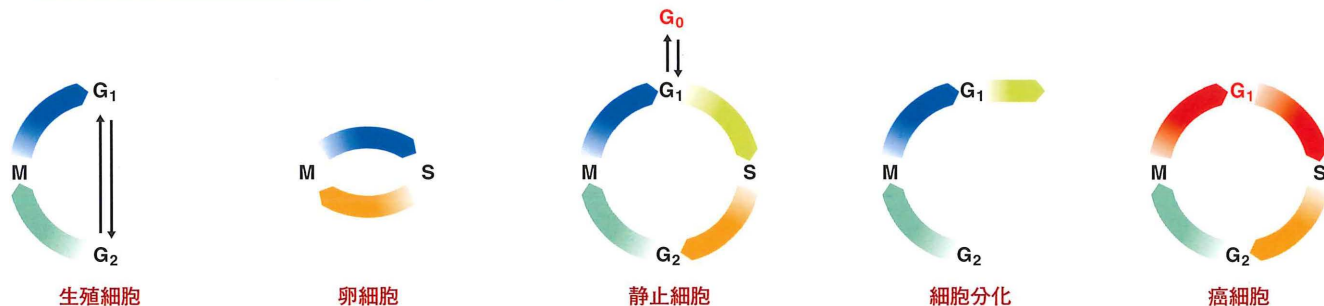
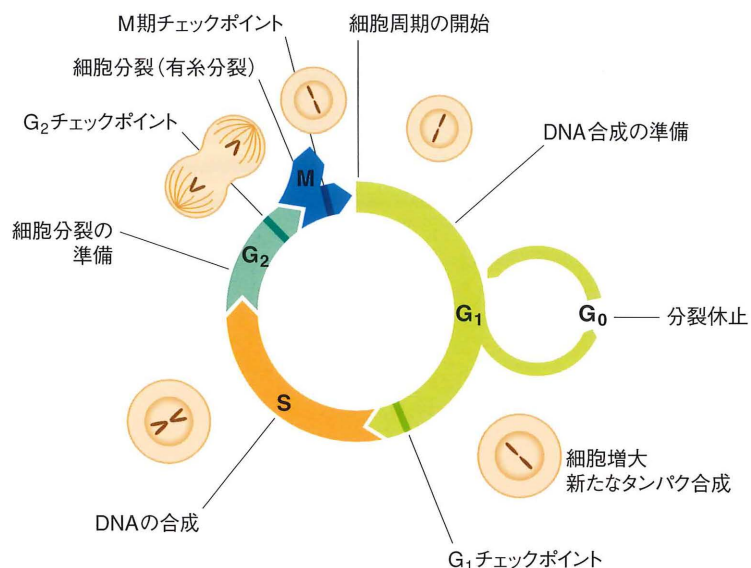
G_2 期 (細胞分裂準備期) : M 期に移行するためのチェックポイントとなる。

M 期 (細胞分裂期) : 倍加した DNA を細胞分裂により分配する過程。

G_1 チェックポイント (G_1 /S 期移行) : 細胞周期を進行させるか否かをモニターし、DNA 合成を開始させる。

G_2 チェックポイント (G_2 /M 期移行) : DNA 複製完了をモニターし、M 期を開始させる。

M 期チェックポイント (M/ G_1 期移行) : 染色体の配列完了をモニターし、細胞分裂を開始させる。



S 期を省略して M 期から M 期に進行することで DNA 合成を半減させ、減数分裂を行う。

G_1 ・ G_2 期を省略して、初期胚の急激な細胞分裂に対応する。

リンパ球は G_1 期のある時期で細胞周期の進行を止め、増殖を停止する。この休止期を G_0 期と呼び、増殖因子の刺激により再び G_1 期に戻り、細胞周期が再開する。

神経細胞は G_1 期で細胞周期を停止させ、分化した性質を維持する。

G_1 期のチェックポイントの制御が乱れて細胞周期が無限に回ってしまい、増殖が続く。

2 細胞周期の調節因子(サイクリン)

休止期に徐々に現れ、分裂の終了とともに消失する一群の周期性タンパク質が見出され、サイクリン(cyclin)と名づけられた。サイクリン依存性キナーゼ(cyclin dependent kinase ; Cdk)については、細胞周期の特定期に増殖停止する酵母変異株の研究から Cdc2 (cell division cycle 2) 遺伝子が最初に発見された。Cdc2はセリン/スレオニンキナーゼ活性を有し、その活性化によりM期を開始させ、不活性化によりM期が終結する。

その後、ヒトから Cdc2 と相同性の高い遺伝子 Cdk2 (cyclin dependent kinase 2) がクローニングされ、これを契機にホモログ遺伝子として次々に Cdk3～Cdk6 (Cdk5は現在、サイクリン非依存性で脳で機能し、細胞周期に関与しないと考えられている)が見出された。Cdk7はサイクリンHと結合してCAK (Cdk activating kinase)としてCdk2, 4をリン酸化し、その活性化に働く。また、卵成熟因子(maturation promoting factor ; MPF)は卵の成熟、減数分裂を開始させる因子として知られていたが、全真核細胞に共通してM期を誘導する因子MPF (M-phase promoting factor)であり、MPFは酵母ではサイクリンBとCdc2の複合体であることが判明した。

細胞周期の各チェックポイントを進行させる原動力は、種々のCdkに種々のサイクリンが結合することで活性化されるセリン/スレオニンキナーゼ活性である。サイクリンが分解されると、Cdk-サイクリン複合体が解離し、キナーゼは不活性化される。したがって、細胞周期の進行はサイクリンによる一連のCdk活性のON-OFFによって制御されているといえる。

🔴 Cdk-サイクリン複合体の組み合わせ

	サイクリン							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Cdc2	●	●						
Cdk2	●			●	●			
Cdk3								
Cdk4				●				
Cdk6				●				
Cdk7								●

G₁チェックポイント サイクリンD-Cdk4 → サイクリンE-Cdk2 → サイクリンA-Cdk2

G₂チェックポイント サイクリンB-Cdk2

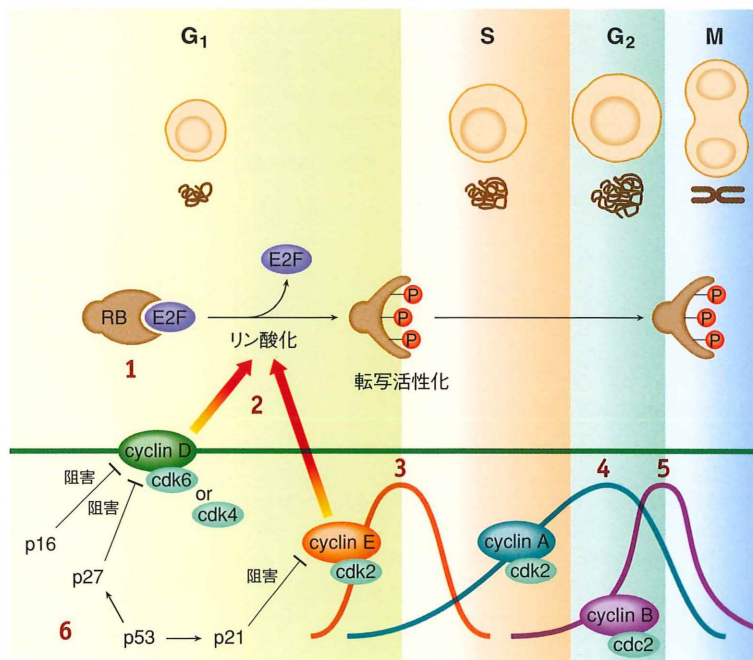
M期チェックポイント サイクリンプロテアーゼの活性化 → Cdc2不活性化

3 癌抑制遺伝子産物による調節

癌抑制遺伝子は細胞増殖に対して抑制的に働くが、その遺伝子産物は細胞周期の調節因子として働いている。E2Fはc-myc、ジヒドロ葉酸還元酵素、チミジン合成酵素、DNA複製系酵素などのG₁/S期移行に必要な遺伝子群の発現を誘導する転写因子である。癌抑制遺伝子であるRB遺伝子産物は、E2Fに結合して細胞増殖を抑制する。(143ページ参照)

🔴 細胞周期の調節

- 1 RBタンパク質は、転写因子E2Fと結合することによってS期への進行を抑制している。
- 2 G₁/S移行期にサイクリンD-Cdk4/6複合体によってRBタンパク質がリン酸化されるとE2Fが遊離し、S期へ進行する。
- 3 サイクリンE-Cdk2はG₁後期に働く。
- 4 サイクリンA-Cdk2はG₁/S境界期からS期にかけて働き、M期を誘導する。M期の終了にはサイクリンAのタンパク質の分解が必要である。
- 5 サイクリンB-Cdk2はM期の進行、維持、終了を調節する。
- 6 p53癌抑制遺伝子産物は、p21 (Waf1, Cip1), p27 (Kip1)と呼ばれるCdk阻害タンパク質の合成を誘導することでCdk活性を抑制する。p16はサイクリンD-Cdk4に結合して阻害する。



生命科学

アポトーシス apoptosis

2 細胞死

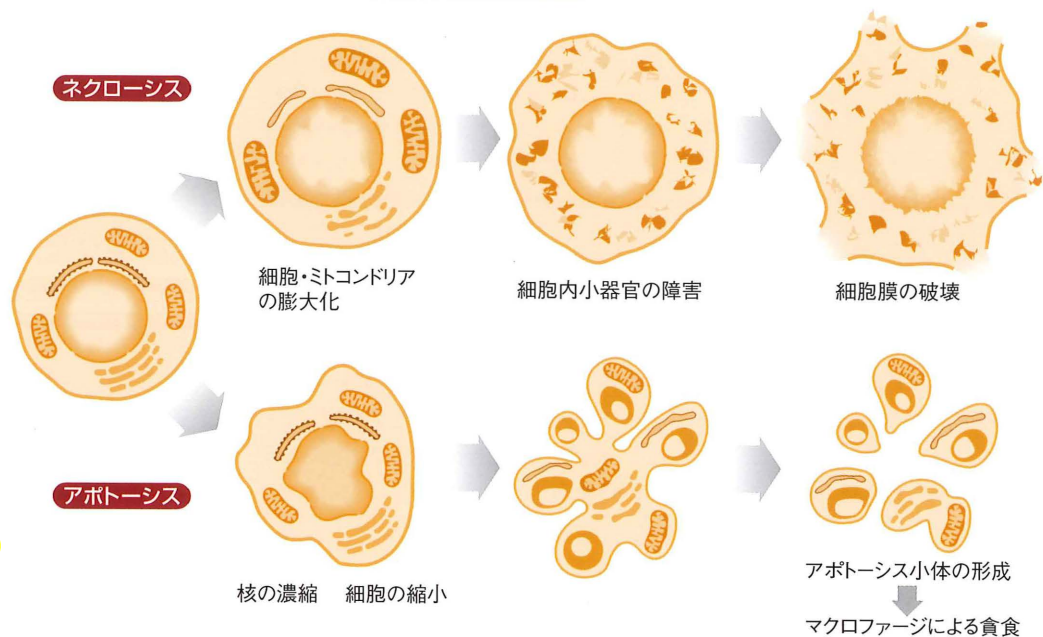
細胞分裂によって細胞は増殖し細胞数は増加する。これに対して細胞数を減少させる細胞死の様式には、ネクローシスとアポトーシスの2種類がある。アポトーシスは形態形成や制御された細胞死などに重要な役割をもち、その異常は生体の恒常性の破壊につながる。

1 ネクローシスとアポトーシスによる細胞死

ネクローシス necrosis (壊死)は栄養素の欠乏、毒物、外傷など外的な環境要因による受動的な細胞死であり、細胞にとっては他殺といえる。侵襲された組織の細胞群に集団的に起こり、漸次的に進行する。

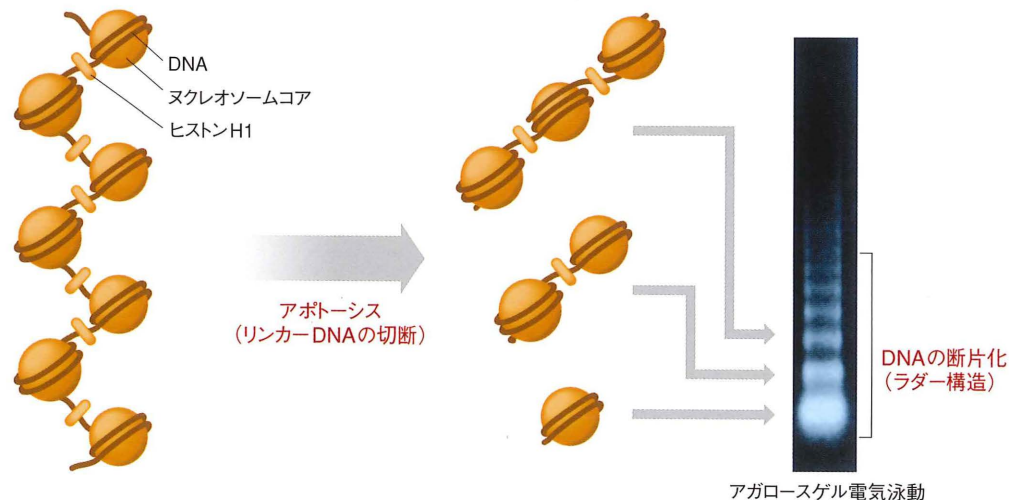
アポトーシス apoptosisは個体の制御機構に従ってプログラムされた生理的、能動的な細胞死であり、細胞にとっては自殺といえる。時間的にも細胞群としても散発的に起こり、段階的で急速に進行する。両者による細胞死はそれぞれ特徴的な形態をとる。

ネクローシスでは細胞全体もミトコンドリアも徐々に膨大化し、細胞内小器官の障害(特にミトコンドリアのATP合成低下など)が起こり、生体膜浸透圧は制御不能となり、やがて細胞融解する。アポトーシスでは細胞の縮小、核濃縮、クロマチンの凝縮、DNAの断片化(DNAラダーの形成)、微絨毛の消失(細胞内小器官の破壊は少ない)が起こり、アポトーシス小体 apoptotic body が形成され、やがてマクロファージにより貪食される。



➡ アポトーシスにおけるDNA断片化

アポトーシスが起こると、核内ヌクレオソームのリンカーDNA部分が酵素的に切断され、ヌクレオソーム単位の断片化が起こる。ただし、ミトコンドリアDNAの断片化は起きない。そこで、アポトーシスを起こしている細胞や組織からDNAを抽出し、アガロース電気泳動を行うことによりラダー構造が観察できる。興味深いことに、癌細胞では通常このようなDNA断片化はみられないので、癌の悪性度や再発などの診断に役立つ可能性がある。



2 アポトーシスの役割と器官の形態形成

アポトーシスは、発生過程の形態形成、細胞・組織のターンオーバー、免疫機構などにおいて生理的細胞死として重要な役割を果たす。生体の統一性や恒常性は細胞増殖と制御された細胞死によって維持されていることから、アポトーシス機能が異常に亢進しても低下しても種々の疾患を引き起こす。放射線、薬剤、活性酸素、腫瘍などによる細胞死にもアポトーシスが関与している。

発生は、1個の細胞である受精卵が分裂して、やがて各組織を形成していくが、この過程でアポトーシスが重要な役割を果たしており、プログラムされた細胞死に異常が起こると器官の形態形成に影響する。

アポトーシスの例

生理的アポトーシス

- 形態形成 ニワトリ胚の後肢芽、胎児の指の水カキの消失
女性のウオルフ管(男性の副睾丸、精管になる)の消失
男性のミュラー管(女性の卵管、子宮になる)の消失
口蓋突起融合時の上皮細胞の細胞死
胎児期のシナプス非形成神経細胞の細胞死
- 正常細胞のターンオーバー
血球、表皮、胸腺皮質、肝細胞、小腸・胃上皮細胞の交代
- 免疫系 胸腺細胞、自己抗原認識リンパ球の細胞死
キラーT細胞、NK細胞による細胞死

病理的アポトーシス

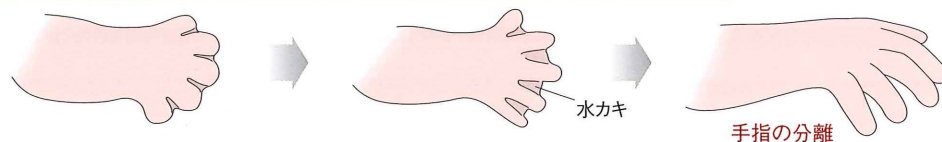
- 化学物質 細菌エンドトキシン、抗癌剤などによる細胞死
- 放射線 放射線感受性の高い細胞の細胞死
- 腫瘍 TNFによる癌細胞の細胞死
癌組織内細胞の細胞死
温熱療法による癌細胞の細胞死
- 感染症 ウイルス感染細胞の細胞死

アポトーシス異常の関連疾患

アポトーシスの亢進	アポトーシスの低下
アルツハイマー病	乳癌、卵巣癌、前立腺癌
パーキンソン病	全身性エリテマトーデス
筋萎縮性側索硬化症	自己免疫性糸球体腎炎
心筋梗塞	ヘルペスウイルス感染
アルコール性肝炎	アデノウイルス感染
再生不良性貧血	
AIDS	

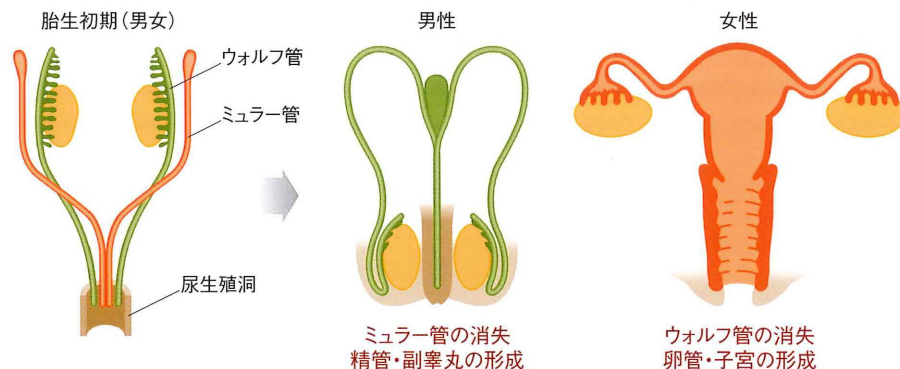
手指の形態形成(ヒト)

受精後48日頃の胎児の指には水カキ様の組織が存在する。51日頃から、この水カキ様組織の被膜細胞にアポトーシスが起こり、手指が分離する。



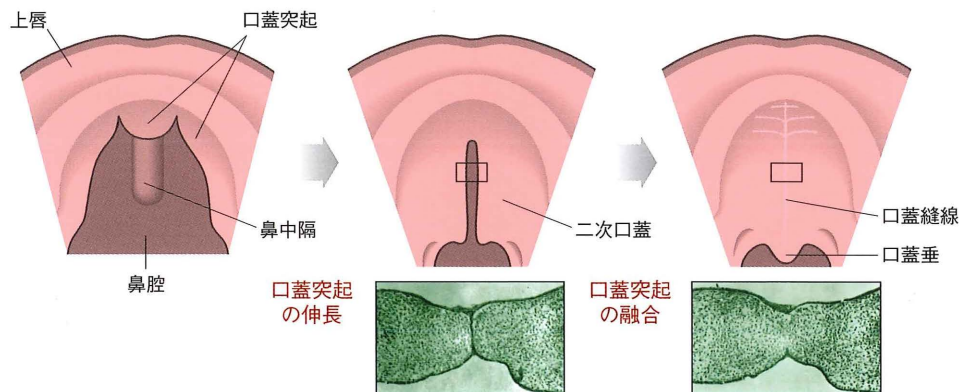
生殖器官の形態形成(ヒト)

6週の胎児では生殖器官の性差がなく、ウオルフ管とミュラー管をもつ。受精後7週に入ると、ミュラー管は女性では女性ホルモンの作用により卵管・子宮になるが、男性ではミュラー管抑制物質によりアポトーシスが誘導され消失する。ウオルフ管は男性ではテストステロンの作用により副睾丸・精管になるが、女性ではアポトーシスにより消失する。



口蓋の形態形成(ヒト)

胎生期では鼻腔と口腔はつながっており、受精後42日頃(胎長18~25mm)に左右の口蓋突起が増殖・伸長し、やがて接触・融合して84日頃(胎長30~37mm)には口蓋を形成する。その際、口蓋突起の接触した上皮細胞は、アポトーシスにより細胞死する。このアポトーシスが妨げられると口蓋裂や兔唇が引き起こされる。



生命科学

アポトーシス apoptosis

3 アポトーシスの誘導機構

アポトーシスの誘導因子として、TNF- α 、Fas リガンド、グルココルチコイド、ウイルス、プロスタグランジンE₂、抗癌剤、Ca イオノフォアや放射線、熱などがある。また、IL-1、エリスロポエチン、NGF (神経成長因子) の除去によっても誘導される。

1 アポトーシス関連遺伝子

線虫の研究から、アポトーシスを起こす関連遺伝子 *ced-3*、*ced-4* が同定され、この2つの遺伝子の作用を抑制する *ced-9* も発見されている。ヒトでは *ced-3* と相同性をもつ IL-1 β 変換酵素 (IL-1 β converting enzyme ; ICE) が見出され、ICE ファミリープロテアーゼがアポトーシスの誘導に必須であること、さらに *ced-9* と相同性をもつ癌遺伝子 *bcl-2* が細胞死抑制遺伝子として機能していることが判明した。

🔍 アポトーシス関連遺伝子

アポトーシスはほとんどの多細胞生物にみられる。その分子機構の解明の実験材料として線虫 (*Caenorhabditis elegans*) が用いられ、アポトーシス関連遺伝子が同定されている。アポトーシスの分子機構は、哺乳動物に至るまで進化的によく保存されており、共通経路が存在すると考えられている。下表は現在明らかになっている遺伝子群と機能を示す。

機 能	脊椎動物	線虫 (<i>C. elegans</i>)
アポトーシスの決定		<i>egl-1</i> , <i>ces-1</i> , 2
アポトーシスの実行	抑制	
	<i>bcl-2</i> <i>bcl-x</i> <i>DAD-1</i>	<i>ced-9</i> <i>dad-1</i>
	誘導	
	ICEファミリー <i>Bax</i> , <i>Bad</i> , <i>Bak</i> (<i>bcl-2</i> ファミリー)	<i>ced-4</i> <i>ced-3</i> <i>ced-8</i> , 11
死細胞の貪食		<i>ced-1</i> , 2, 3, 6, 7, 10
死細胞の分解		<i>nuc-1</i>

2 アポトーシスの誘導

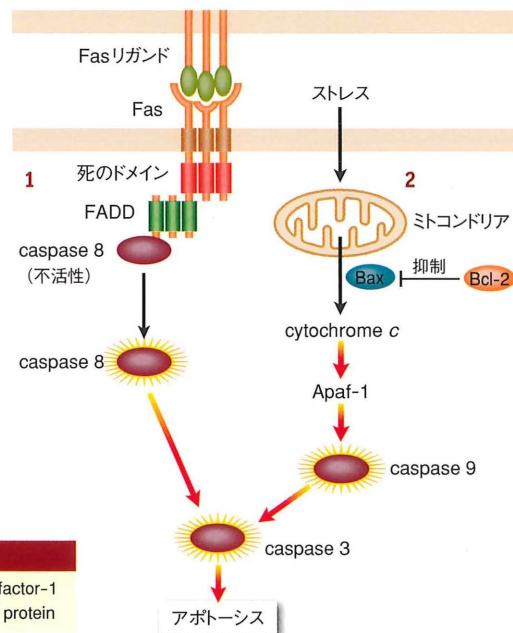
グルココルチコイドは細胞内受容体を介して“死の遺伝子”を誘導する。放射線、活性酸素、抗癌剤、Fas リガンド、TNF は ICE ファミリープロテアーゼを活性化することでアポトーシスを誘導する。一方、成長因子は受容体を介してシグナル伝達し、*Bcl-2*、*Bcl-x* を発現させてアポトーシスの発現を抑制する。

アポトーシスの誘導と決定の機構は、刺激の種類、細胞の種類によって多様である。一方、アポトーシスの実行は、ICE ファミリープロテアーゼの caspase 群と DNAase による、標的タンパク質とリンカー DNA の分解カスケードに集束される。Caspase 群は不活性型として細胞内に存在しており、caspase 自身の作用によって自己切断あるいは互いに切断して活性化のカスケードが進む。活性化カスケードで活性化された caspase 3 が下流の細胞内タンパク質を切断することで、アポトーシスが誘導される。

🔍 ICE ファミリープロテアーゼ

1 Fas リガンドが Fas に結合すると、Fas の細胞内ドメインである死のドメインに FADD が結合し、次いで caspase 8 が結合して Fas-FADD-caspase 8 複合体を形成する。この結合によって caspase 8 が自己切断して活性化され、caspase 3 を活性化する。

2 ミトコンドリアから分泌された cytochrome c は Apaf-1 および caspase 9 の活性化を介して caspase 3 を活性化する。



🔍 略語

Apaf-1 apoptotic protease activating factor-1
FADD Fas associated death domain protein

⑨ アポトーシスの誘導機構

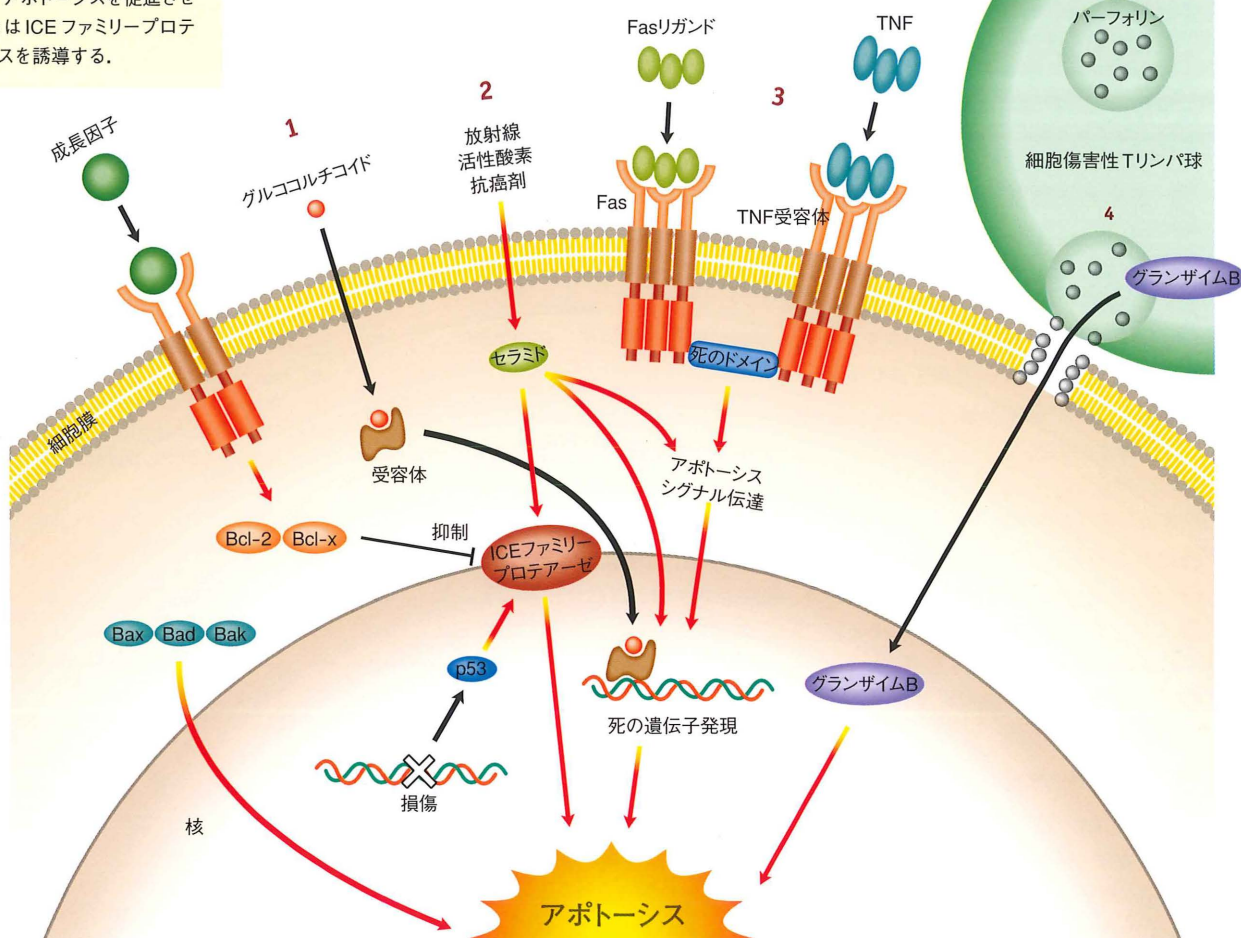
1 グルココルチコイド-受容体複合体は核内に移送され、応答性エレメントに結合して、アポトーシスに関与する死の遺伝子の発現を誘導する。

2 放射線照射はp53の蓄積、Bax発現の上昇、Bcl-2発現の低下、セラミドを誘導することでアポトーシスを促進させる。セラミドはスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質からスフィンゴミエリナーゼによって産生され、アポトーシスの誘導、細胞増殖の抑制、分化抑制に関与するセカンドメッセンジャーとして働く。セラミドはRBタンパク質の脱リン酸化を介して細胞増殖を抑制することが知られていたが、TNF- α 、IFN- γ 、活性酸素、紫外線などによって誘導され、アポトーシスを誘導することが明らかになっている。

活性酸素は、NF- κ B、AP-1の発現を誘導して死の遺伝子を発現させたり、セラミドを誘導することでアポトーシスを促進させる。抗癌剤のカンプトセシンやAra-CはICEファミリープロテアーゼを活性化することでアポトーシスを誘導する。

3 TNFリガンド(TNFファミリーに属する)がFas抗原分子(TNF/NGF受容体ファミリーに属する)に結合して三量体を形成すると、Fas分子の細胞内領域の死のドメイン(TNF受容体細胞内ドメインと類似している)を介してICEファミリーカスケードに細胞死誘導シグナルが伝達される。活性化T細胞ではFasリガンドが発現され、Fas抗原を発現したT細胞やB細胞にアポトーシスが誘導される。このFasシステムに異常をきたすと自己免疫疾患を発症する。

4 パーフォリンは細胞傷害性T細胞、NK細胞の分泌顆粒に存在し、標的細胞の細胞膜にリング状の孔をあけて細胞融解を起こさせる。パーフォリンは、セリンプロテアーゼファミリーであるグランザイムBと共同してアポトーシスを誘導する。



生命科学

老化 senescence

4 老化とその原因説

多細胞生物は体細胞と生殖細胞からなるが、組織・臓器を構成している体細胞にはそれぞれ固有の寿命があり、経年的に組織の退行変化、臓器の機能低下を引き起こし老化現象として現れる。

1 種の寿命限界

哺乳動物は固有の限界寿命 (maximum life-span ; MLS) をもつ。限界寿命は動物種により数十倍にも及ぶ差があり、種々の指標でとらえると、種とその寿命との間には次のような相関が認められる。

- ① 体重と限界寿命は正の相関がある。
- ② 脳重量と限界寿命は正の相関がある。 $MLS = 10.839 \times [B^{0.636} / W^{0.225}]$ (B : 脳重量, W : 体重)
- ③ 在胎期間と限界寿命は正の相関がある。
- ④ 性成熟期間と限界寿命は正の相関がある。 $MLS = 5.14 \times \text{性成熟年齢} + 9$
- ⑤ 子腹数と限界寿命は負の相関がある。
- ⑥ 代謝率と限界寿命は負の相関がある。

2 老化と生理機能の変化

老化 (senescence) と加齢 (aging) は同義語として用いられることが多いが、厳密には老化は「発育が完成した成熟期以降に起こる機能の衰退」であり、加齢は「暦の上での時間の経過」を指す。しかしながら、加齢を抜きにして老化現象を考えることはできず、老化は加齢に伴う機能の低下による個体の内在する死への一過程を意味する。

高齢化に伴って体重は減少するが、臓器重量の減少程度は臓器によって異なる。個体の死因は心臓、脳、肝臓、腎臓、動脈など生命維持に特に重要な臓器の機能不全に起因することが多く、限界寿命もこれらの臓器の老化に関係すると考えられる。

- ① 臓器の機能低下：臓器重量、神経伝導速度、肺活量、腎糸球体濾過率など
- ② 細胞の機能低下：細胞数、基礎代謝率、細胞の含水量、蛋白合成能など
- ③ ホルモン分泌の低下：成長ホルモン、テストステロン、エストロゲン、デヒドロエピアンドロステロンなど
- ④ 免疫機能の異常：胸腺重量低下、キラーT細胞・ヘルパーT細胞活性の低下、自己抗体の増加

3 老化の原因説 ① プログラム説

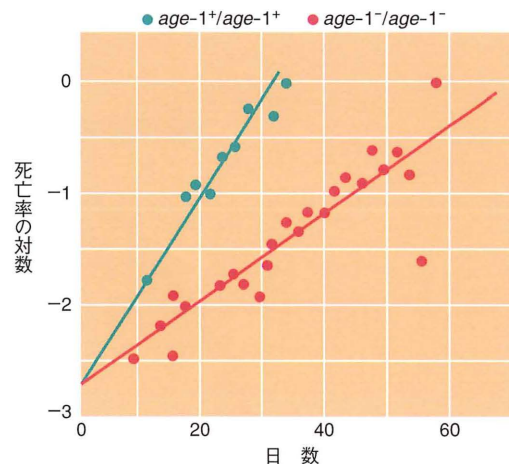
従来より老化学説として諸説が提唱されているが、① プログラム説と② エラーカタストロフ説 (過誤蓄積説) の2つに大別される。老化のプログラム説とは、老化のプロセスが老化遺伝子群の発現によって制御され、その結果として寿命が決定されるという考えである。

② 老化学説の諸説

	プログラム説	エラーカタストロフ説		
		機能減退	変性生体物質の蓄積	生体内酸化基の蓄積
諸説	遺伝子プログラム説 生物時計説 代謝率説	内分泌説 神経伝達物質説 調整障害説 ストレス説 免疫機能破綻説	代謝産物原因説 老廃物説 架橋結合説 体細胞変異説 酵素エラー説 消耗説 (すりきり説)	遊離基説 フリーラジカル説
予防の可能性	遺伝子治療 ?	ホルモン、薬剤投与	クリアランス系の賦活	スカベンジャー系の賦活

③ ネマトーダ (線虫) の age-1 遺伝子解析 (Johnson, 1990)

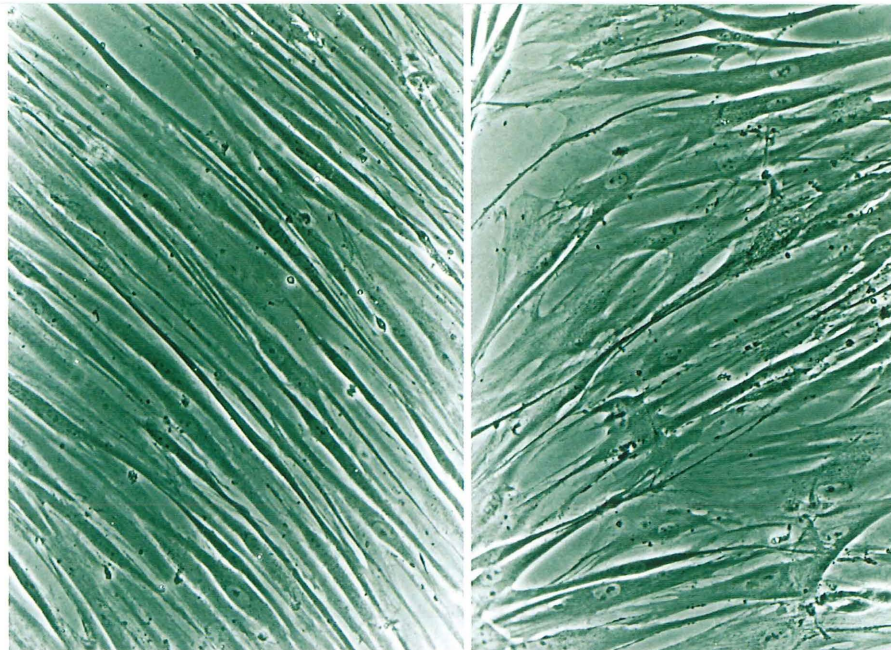
ネマトーダの age-1 遺伝子劣性変異のホモ接合型 (age-1⁻/age-1⁻) は、野生型 (age-1⁺/age-1⁺) およびヘテロ接合型 (age-1⁺/age-1⁻) に比べて、それぞれ寿命が 120%、60% も長い。このような遺伝子解析の結果、短寿命の遺伝子疾患 (早老症) が存在すること、また個体を構成する細胞の老化によって寿命が規定され、正常細胞には継代培養数の限界が存在することが明らかとなった。



④ 早老症(Hutchinson-Gilford 症候群)患者の顔貌

幼児期(写真左, 10 カ月)は正常顔貌であるが, わずか 14 歳半で脱毛, 皮膚の皺, 老人斑など老人性顔貌(写真右)になってしまう。第 21 染色体トリソミーの Werner 症候群も類似の所見を示し, 正常人に比べて明らかに短命である。これらのことは, 老化と加齢が根本的に違うこと, そして単一物質の代謝異常による寿命の短縮とは異なり, 生理的老化の多面的な変化を支配する遺伝子の存在を思わせる。

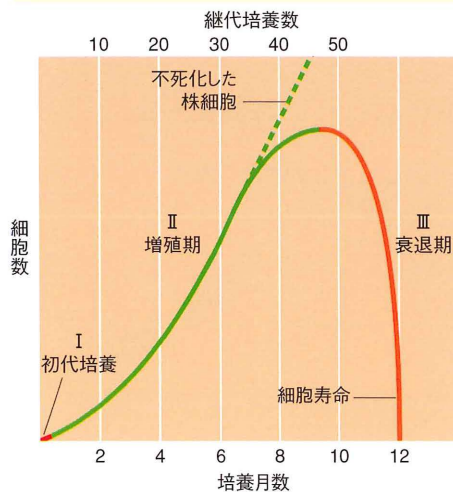
(DeBusk : J. Pediatrics 80 ; 679-724, 1972)



④ 若い線維芽細胞(左)と老化した線維芽細胞(右)

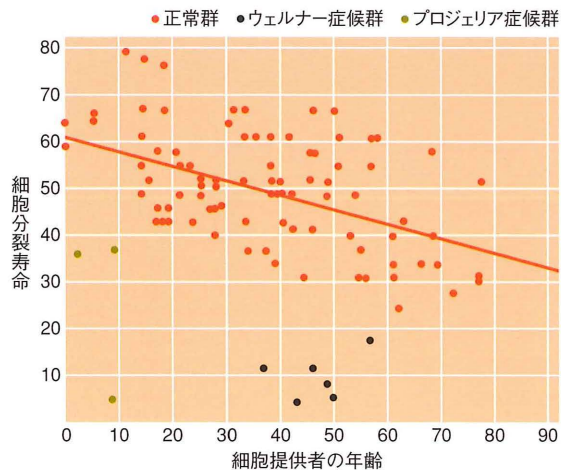
⑤ 正常培養細胞の分裂可能限界 (Hayflick)

正常なヒト二倍体胎児細胞を初代培養(第 I 期)し継代培養すると, 細胞は対数増殖期(第 II 期)を経て衰退期(第 III 期)に達し, やがて増殖を停止し死滅する。すなわち細胞は無限には増殖できず, 分裂可能な回数に限界がある。細胞分裂を停止するまでの細胞数倍加回数 (population doubling) は細胞の由来臓器に固有である。



⑥ 個体年齢と細胞分裂可能回数

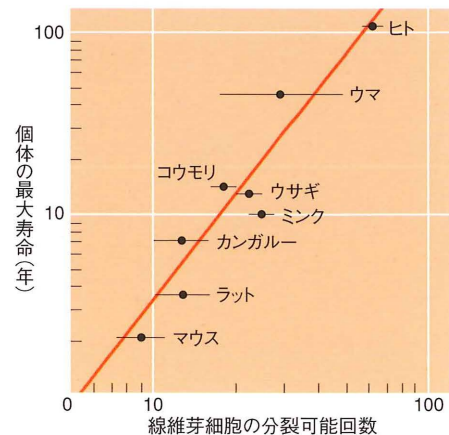
各年齢のヒト個体から皮膚線維芽細胞を培養すると, 個体の年齢と培養細胞の分裂可能回数の限界との間に相関がみられる。また, 早老症患者の培養細胞の分裂可能回数はさらに短い。細胞を凍結保存あるいは一時増殖阻止した後, 再び培養を行っても老化の情報は保持され, 残されている回数しか分裂しない。(Goldstein, S : The Genetics of Aging, 1978)



⑦ 動物最大寿命と細胞老化

種々の動物の最大寿命 (maximal life-span ; M) とそれぞれの動物種における胎児皮膚線維芽細胞の細胞数倍加可能回数 (P) との間には相関があり, 次の関係式が成り立つ。

$$\log M = 2.07 \log P - 1.58$$

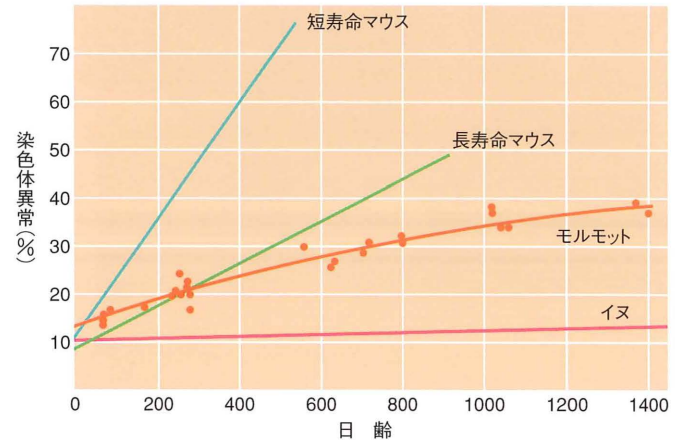
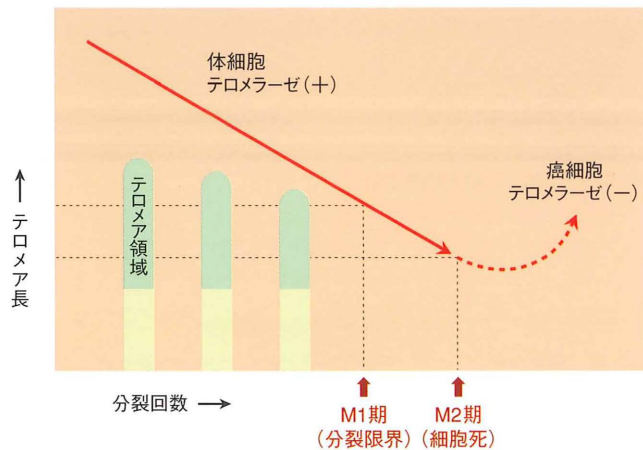


4 老化の原因説 ②エラーカタストロフ説

エラーカタストロフ説は、加齢に伴ってDNAの転写・翻訳のエラー、生体構成成分の架橋による機能変化、免疫機能の変化、酸化ストレスなどが蓄積し、やがて破綻するとの考えに基づいている。

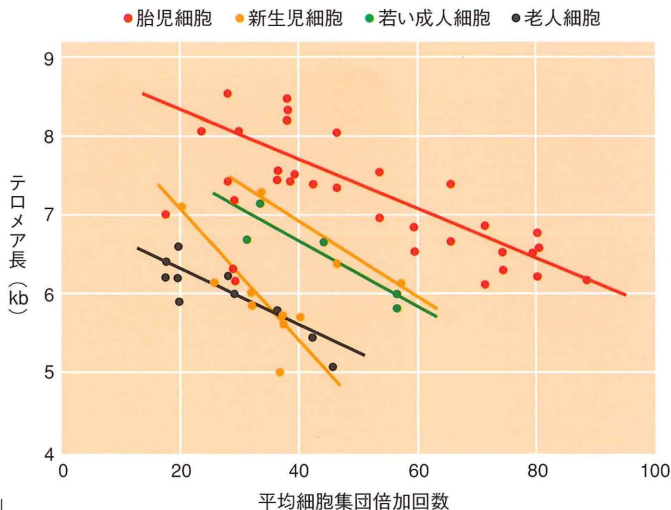
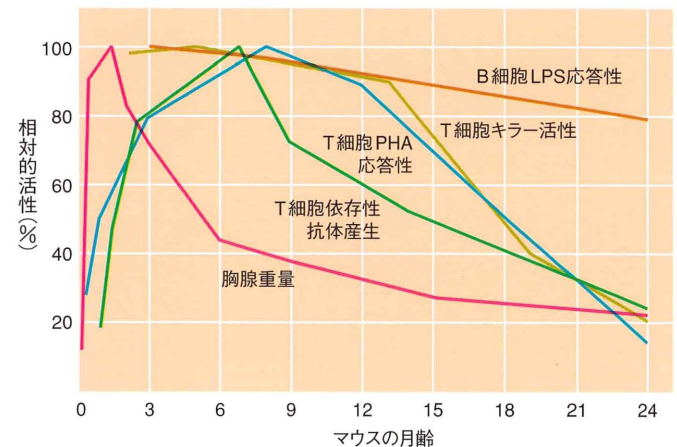
🔴 テロメアの短縮と細胞老化 (Harley, et al., 1990)

有限の細胞分裂回数を規定しているのはテロメアDNAの短縮と考えられており、培養細胞が継代を繰り返すごとに、また個体の加齢とともにテロメアDNAは短縮している。遺伝的早老症患者の細胞は、同年齢の正常ヒト細胞に比べてテロメアDNAが著しく短い。M1期はHayflickの細胞分裂寿命の限界であり、M2期にはテロメア短縮のために染色体が不安定化する。その結果、核構造が異常になって細胞が死滅するものと考えられる。つまり、細胞分裂ごとに起きるテロメア短縮が分裂回数の計数機構と考えられる。



🔴 免疫機能と加齢変化

マウスの胸腺と各種免疫機能の加齢による変化をみたもの。生後、胸腺は萎縮し重量は低下していく。やがてT細胞のキラー活性、フィトヘマグルチニン(PHA)応答性、T細胞依存性抗体産生、B細胞のLPS応答性が低下する。



生命科学

分子シャペロン

molecular chaperone

5 ストレスタンパク質と分子シャペロン

生体が種々のストレスにさらされると、細胞レベルでストレスタンパク質の合成が誘導され、生体防御に働く。ストレスタンパク質はストレスのない正常細胞でも構成的に発現し、分子シャペロンとして働く。

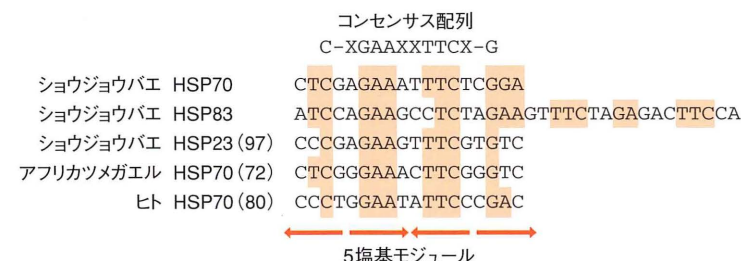
④ ストレスタンパク質ファミリー

ファミリー	原核細胞	酵母	動物細胞	細胞内局在
HSP90	HtpG	HSP90	HSP90 GRP94	細胞質 小胞体
HSP70	DnaK	Ssa1-4p Ssc1p Kar2p	HSP70 HSC73 GRP78/BiP GRP75	細胞質 ミトコンドリア 細胞質、核 細胞質、核 小胞体 ミトコンドリア
HSP60	GroEL	HSP60	HSP58	細胞質 ミトコンドリア
HSP47			HSP47	小胞体
HSP27				細胞質、核
HSP10(cpn10)	GroES		HSP10 ユビキチン	細胞質 細胞質

ストレスタンパク質と分子シャペロン

細菌からヒトに至るあらゆる生物は高温にさらされると、細胞レベルの応答として熱ショックタンパク質 (heat shock protein ; HSP) と呼ばれるタンパク質群の合成が一時的に誘導され、損傷からの防御に働く。この現象は水銀、砒素、エタノールなどの化学物質によっても起こり、また感染、炎症、酸素ストレスなどの病理的变化によっても誘導される。これらのことから、広範なストレスに対する生体の防御機構として働くと考えられ、ストレスタンパク質と呼ばれるようになった。その後、ストレスタンパク質遺伝子、遺伝子発現機構の研究からストレスタンパク質ファミリーの統一概念ができた。

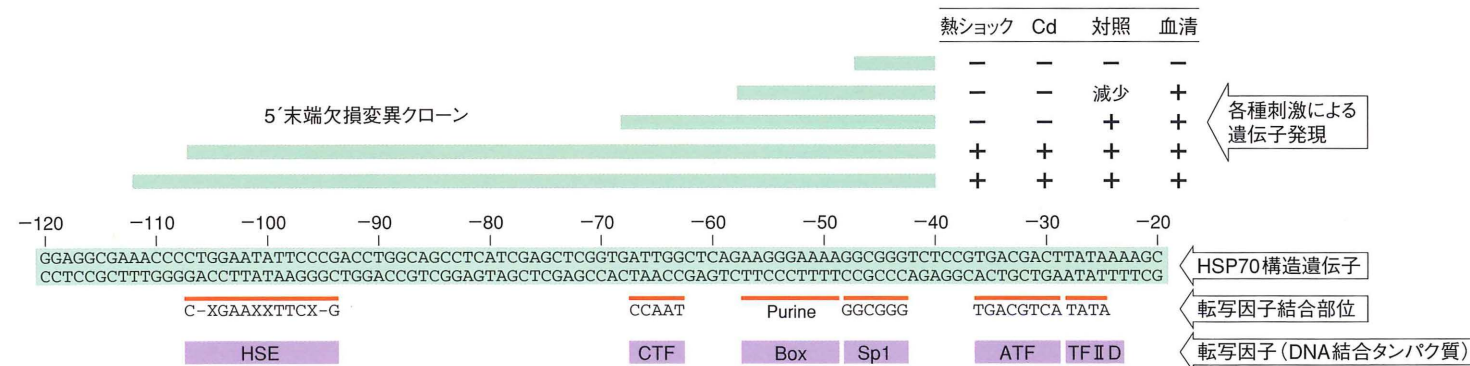
ストレスタンパク質は正常細胞でも構成的に発現しており、分子シャペロン (chaperone は介添え人の意味) として新生ペプチドの折りたたみ (folding) や会合 (assembly) といった重要な生理的役割を果たしている。



ストレスタンパク質の遺伝子発現

④ ストレスタンパク質ファミリー遺伝子のプロモーター領域は、基本的プロモーター領域の上流に熱ショックエレメント (heat shock element ; HSE) と呼ばれる特異配列をもつ。HSE は XGAAX の 5 塩基を基本単位とし、XGAAX-XTTCX (XGAAX の逆向き) -XGAAX のように 3 つ以上並んだ配列をもっている。

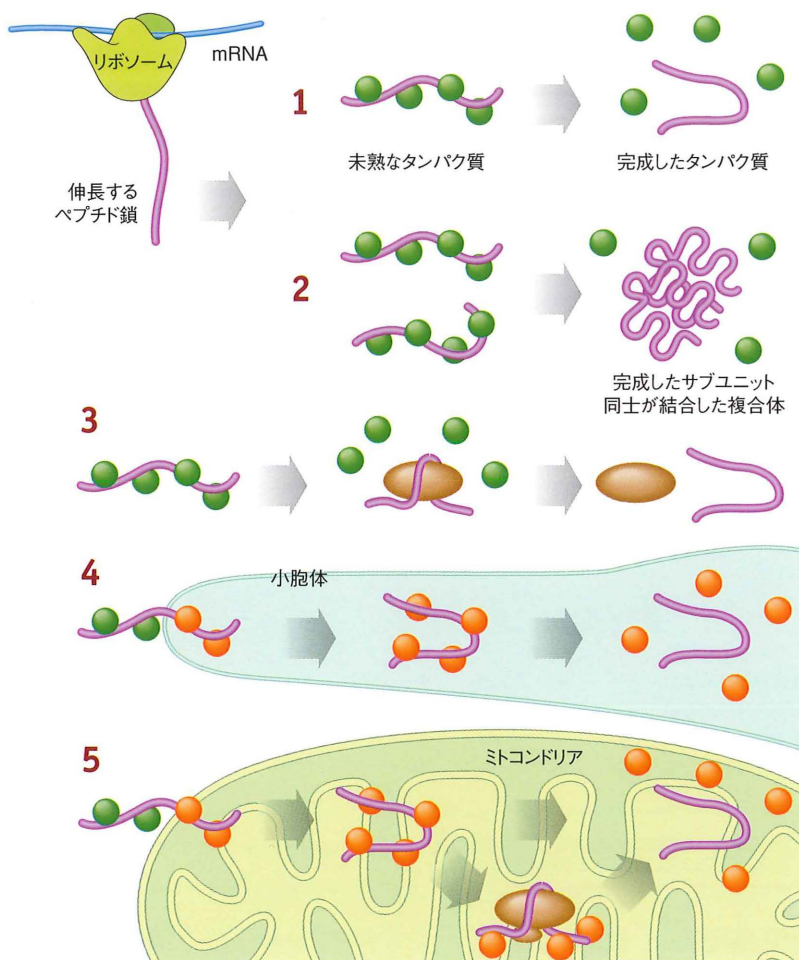
④ ヒト HSP70 は熱、カドミウムあるいは血清により誘導されるが、構成的にも発現している。遺伝子のプロモーター調節領域に種々の 5' 末端欠損変異を起こして発現を調べると、HSP70 の構成的発現には CCAAT box が必要であり、熱やカドミウムによる誘導には HSE が重要であることがわかる。



分子シャペロンの機能

タンパク質の立体構造は、一次構造のアミノ酸配列に依存して self assembly が行われて折りたたまれることで形成される。その際、HSP は分子シャペロンとしてタンパク質が正しく折りたたまれ本来の機能をもつように働く。分子シャペロンは N 末端に ATP 結合ドメインと ATP 分解活性をもち、標的タンパク質との結合や解離に ATP 分解によるエネルギーが使われる。

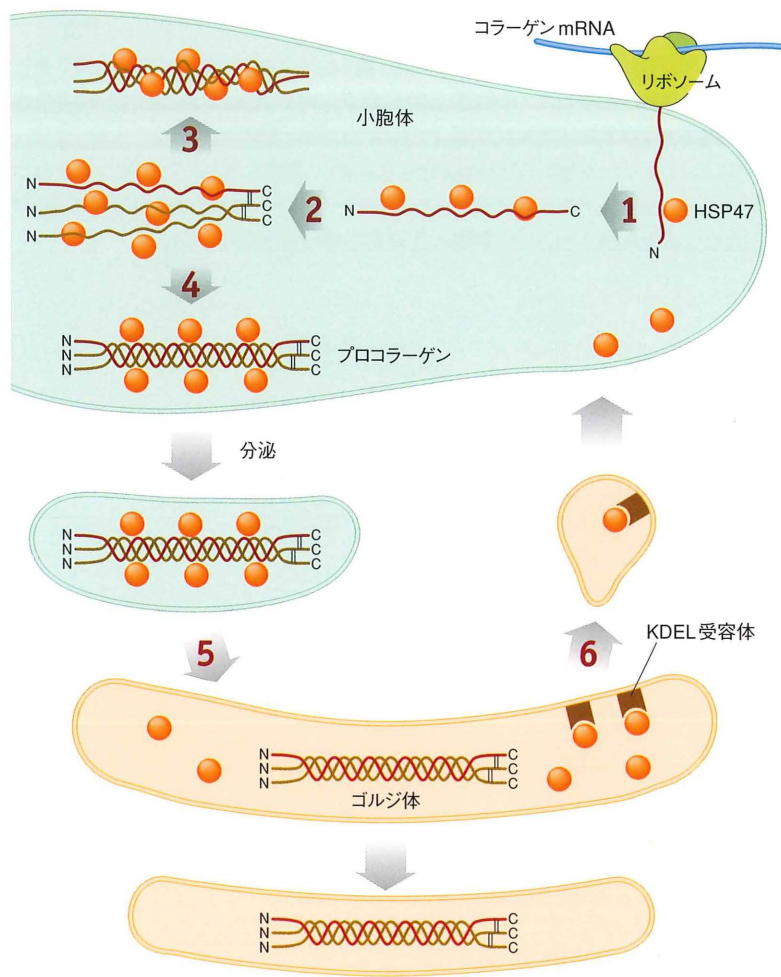
- 1 合成直後のタンパク質に結合し、誤った折りたたみを防ぎ、解離して成熟タンパク質にする。
- 2 サブユニットとなるタンパク質に結合して完成させる。
- 3 タンパク質から解離し、他の HSP が結合して成熟する。
- 4 タンパク質に結合して小胞体内に移送し、BiP などの補助因子と結合して最終的なタンパク質となる。
- 5 核の遺伝子にコードされている多くのミトコンドリアタンパク質に結合してミトコンドリアに移送した後、解離して、他の HSP により完成される。



HSP47 とコラーゲン

コラーゲン結合性タンパク質として知られていた HSP47 の C 末端には Arg-Asp-Glu-Leu (RDEL) 配列が存在する。小胞体保持シグナルである KDEL と類似していることから、HSP47 の小胞体内局在に働いていると考えられる。小胞体内の HSP47 は、コラーゲンの成熟・分泌過程で分子シャペロンとして働く。

- 1 新生された α 鎖に小胞体内の HSP47 が結合し、C 末端が合成されるまで折りたたみや凝集を防ぐ。
- 2 3 本鎖のプロコラーゲンに HSP47 が結合し、束形成を抑制する。
- 3 異常なプロコラーゲンに HSP47 が結合して分泌を阻止する。
- 4 プロコラーゲンの分解を抑制する。
- 5 ゴルジ体への移送過程で解離し、プロコラーゲンが分泌される。
- 6 解離した HSP47 は KDEL 受容体に結合し、小胞体にリサイクルされる。



6 ユビキチンとプロテアソーム

ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームにより分解される。このタンパク質分解システムが細胞周期、アポトーシス、転写、免疫系など多彩な生命活動を制御している。

1 ユビキチン/プロテアソームシステム

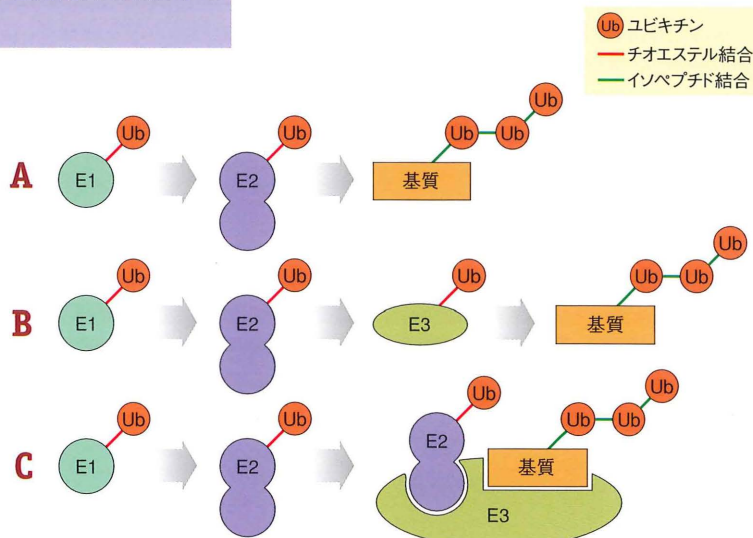
遺伝子の転写・翻訳によって生合成されたタンパク質は、修飾・プロセシングを受けたり、分子シャペロンによって機能的分子として働く一方、生命活動の過程で種々の刺激によって異常性を獲得したタンパク質を分解し再生するタンパク質分解系に連動する。このタンパク質分解系バイオロジーは、細胞周期、アポトーシス、転写の調節、情報伝達、ストレス応答、免疫応答の始動など多彩な生命活動の維持に重要な位置を占めることが明らかになっている。このシステムにはエネルギーが必要であり、標的タンパク質を識別するユビキチン (ubiquitin ; Ub) と、ATP 依存性プロテアーゼ複合体であるプロテアソーム (proteasome) が関与する。

ユビキチンシステムは E1 (Ub 活性化酵素)、E2 (Ub 結合酵素)、E3 (Ub リガーゼ) からなり、結合した標的タンパク質の翻訳後修飾機構として働く。プロテアソームシステムはユビキチンレセプター、ATPase のほか、スレオニン活性部位、プロテアーゼを有する巨大な多成分複合体で、細胞内では分子量約 200 万 (沈降係数 26S) の 26S プロテアソームと分子量 75 万 (沈降係数 20S) の 20S プロテアソームがある。

ユビキチン/プロテアソームシステムの生理的標的タンパク質

機能	標的タンパク質
細胞周期、アポトーシス	サイクリン, p53, CDK インヒビター, 染色体タンパク質, 動原体タンパク質
転写調節	<i>jun</i> , <i>fos</i> , <i>myc</i> , NF- κ B
受容体	PDGF 受容体, 受容体チロシンキナーゼ
情報伝達	A キナーゼ調節サブユニット, トランスジューリン
代謝調節酵素	オルニチン脱炭酸酵素, トリプトファン脱炭酸酵素, ヘキソキナーゼ, p450
免疫応答始動	内在性抗原*
細胞骨格	ギャップ結合タンパク質

* IFN- γ に応答してプロテアソームの分子構成を変化させ、効果的に内在性抗原を分解して抗原ペプチドを提示する。



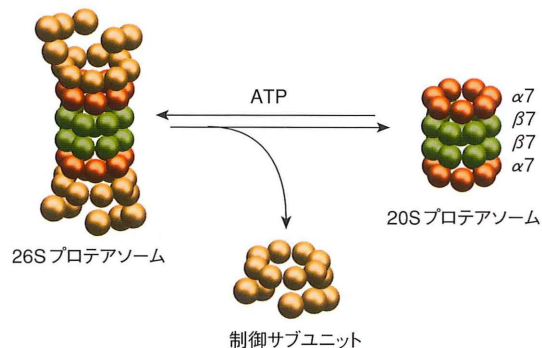
ユビキチン化システム

どの標的タンパク質をいつ分解するかは、ユビキチン化によって制御されている。いくつかのユビキチン化の仕組みが知られている。

- A** Ub とチオエステル結合した E1, E2 によって標的タンパク質がイソペプチド結合によりユビキチン化される。
- B** E1, E2 から E3 に受け渡されて標的タンパク質がユビキチン化される。
- C** E3 が標的タンパク質を認識し、E2 のユビキチン化を助ける。

プロテアソーム

20S プロテアソームは分子量 2 万 ~ 3 万のサブユニット α , β が 7 個ずつ 4 層に積み重なった中空構造をしており、タンパク質分解活性をもつコア部分である。これに分子量 100 万の制御ユニットが ATP 依存的に構築されて 26S プロテアソームが形成される。

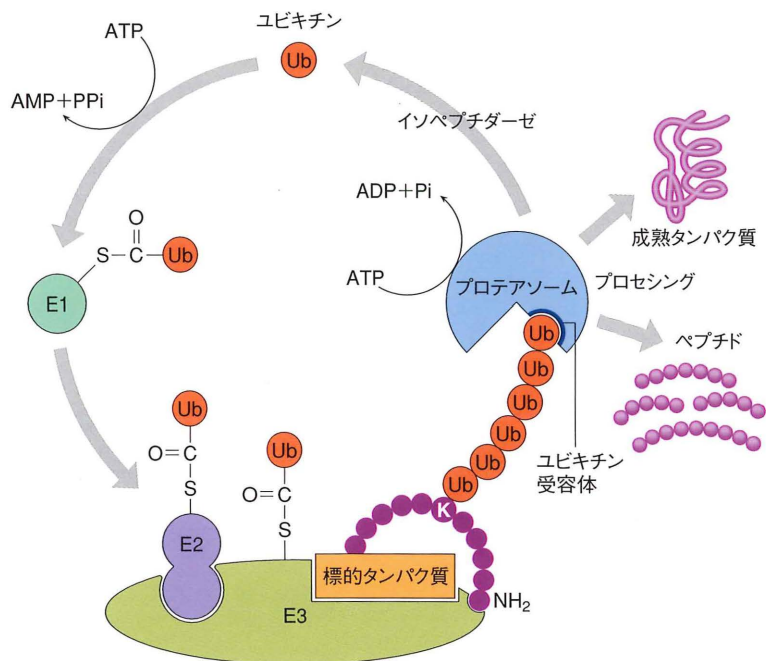


2 ユビキチン/プロテアソームシステムと免疫系

細胞性免疫反応は非自己を選択的に破壊するが、非自己を識別するためには抗原の特異的な領域(抗原ペプチド)を主要組織適合抗原(major histocompatibility complex ; MHC)と結合させる必要がある。この過程を経て細胞内に侵入した異物の抗原はやがて細胞表面に露出し、この抗原ペプチドをキラーT細胞が認識して活性化され、種々のサイトカインや細胞傷害性因子を産生し、異物に汚染された細胞を消滅させる。この過程で、ユビキチン/プロテアソームシステムは、内在性抗原を抗原ペプチドに分解するプロセッシング酵素として作用する。(127ページ参照)

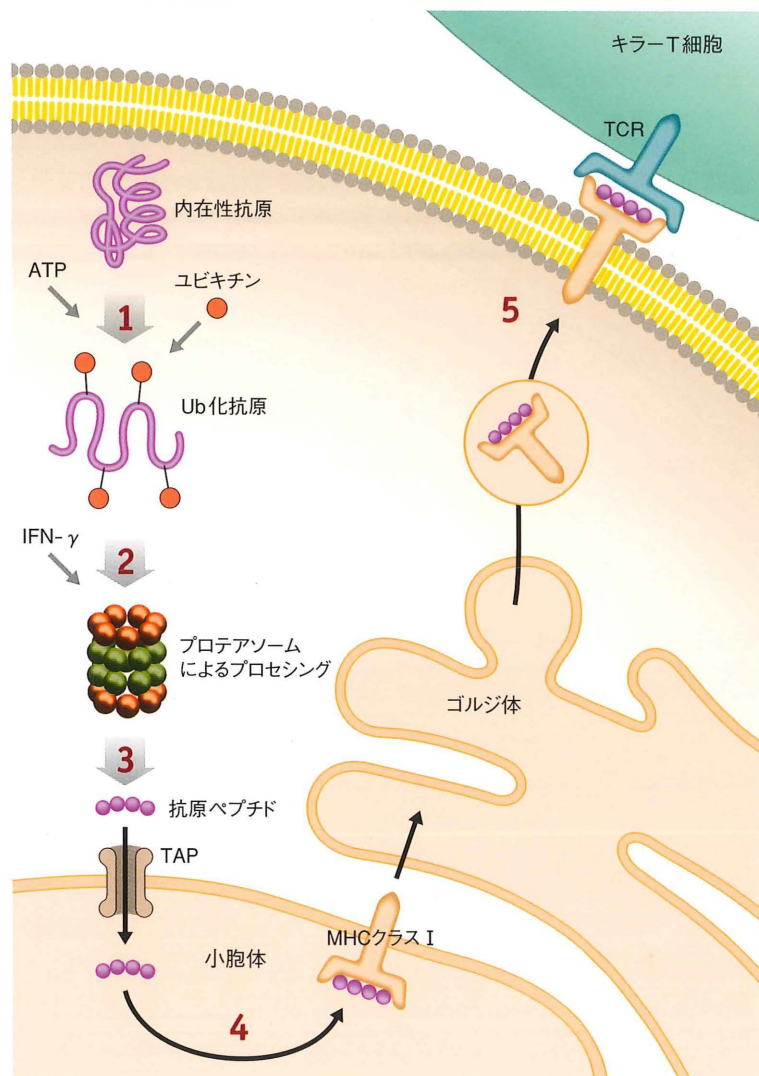
ユビキチン/プロテアソーム依存性タンパク質分解システム

UbがE1(Ub活性化酵素)によりATP依存性に活性化された後、E2(Ub結合酵素)に受け渡され、E3(Ubリガーゼ)の共存下(非共存下の場合もある)で標的タンパク質のリシン残基およびUb自身のリシン残基と結合する。こうして形成されたマルチユビキチン鎖は分解シグナルとして機能し、26Sプロテアソームに提示され、標的タンパク質はATP依存性に分解される。UbはUbイソペプチダーゼによって単量体Ubに解離され、再利用される。



ユビキチン/プロテアソームによる内在性抗原の提示

- 1 内在性抗原がユビキチンにより分解シグナルを与えられる。
- 2 IFN- γ の存在下で、内在性抗原はプロテアソームにより分解され抗原ペプチドとなる。
- 3 抗原ペプチドは抗原プロセッシング関連ペプチド輸送体(transporter associated with antigen processing ; TAP)を介して小胞体に輸送される。
- 4 抗原ペプチドはMHCクラスI分子と会合し、ゴルジ体を経て細胞表面に提示される。
- 5 キラーT細胞は受容体(T cell receptor ; TCR)を介して抗原ペプチドを認識し、細胞傷害性を発揮する。



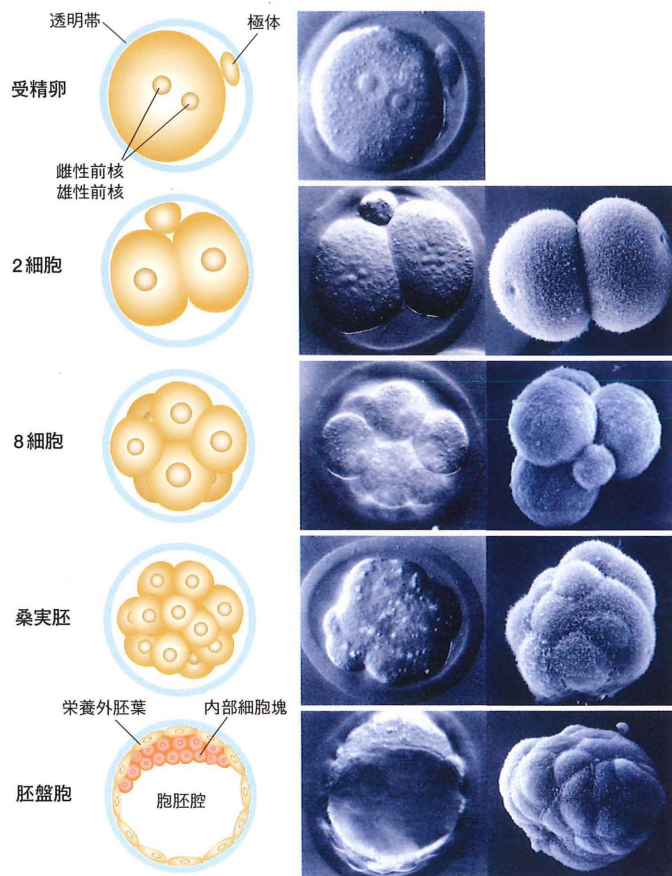
7 初期胚の発生と幹細胞

哺乳類の初期胚に由来する多能性幹細胞(ES細胞, EG細胞)は, すべての組織細胞へ分化することが可能であり, 再生医療を飛躍的に進展させると期待されている。

1 初期胚の発生

受精卵が分裂を始め初期胚になると, 内部細胞塊と栄養外胚葉に分かれた胚盤胞になる。内部細胞塊からは, 胎児や羊膜, 卵黄嚢などが形成される。栄養外胚葉は着床後の胎盤の形成に関与する。

マウスの初期胚の発生



(P. Calarco and G. Martin : *Science* 209 : 768-776, 1980)
(P. Calarco and C. J. Epstein : *Dev. Biol.* 32 : 208-213, 1973)

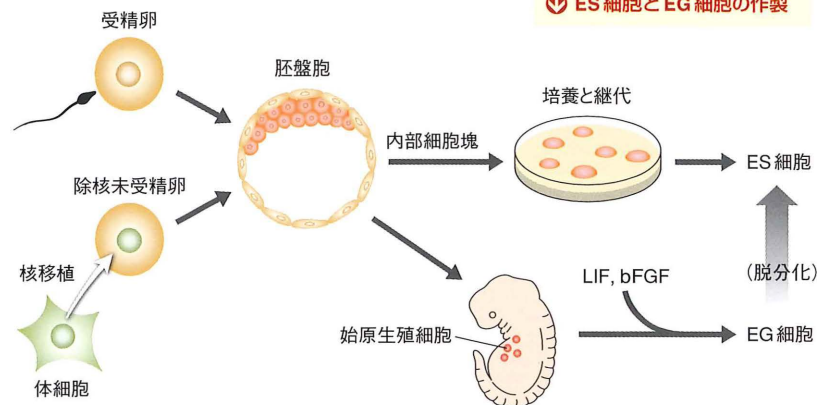
2 幹細胞とは

種々の臓器組織で幹細胞の存在が知られている。血液、皮膚、腸上皮、生殖腺などの細胞は、一定の寿命あるいはアポトーシスによって死滅するが、未分化の幼若細胞が増殖・分化・成熟することで細胞が補給され、定常状態が保たれる。このような幼若未分化の親細胞を、幹細胞 (stem cell) という。

① 胚性幹細胞=ES細胞 (embryonic stem cell) 胚盤胞の内部細胞塊から樹立された細胞株は、癌化せずに自己複製し増殖する。ES細胞を胚盤胞に戻すと、正常な発生過程を経て個体形成を行い、すべての細胞種に分化できることから、全能性幹細胞と呼ぶ。一方、EG細胞 (embryonic germ cell) は、生殖細胞に分化する始原生殖細胞に LIF, bFGF を作用させて樹立された幹細胞である。EG細胞は、培養条件によって生殖系列への運命付けがリセットされ、全能性幹細胞へと脱分化することができる。

② 体性幹細胞 胚性幹細胞ほど全能ではないが、多分化能をもち、種々の組織を形成する細胞に増殖・分化・成熟する。生体の多くの臓器に存在し、組織幹細胞ともいう。骨髄移植は、体性幹細胞を応用した再生医療としてすでに実施されている。

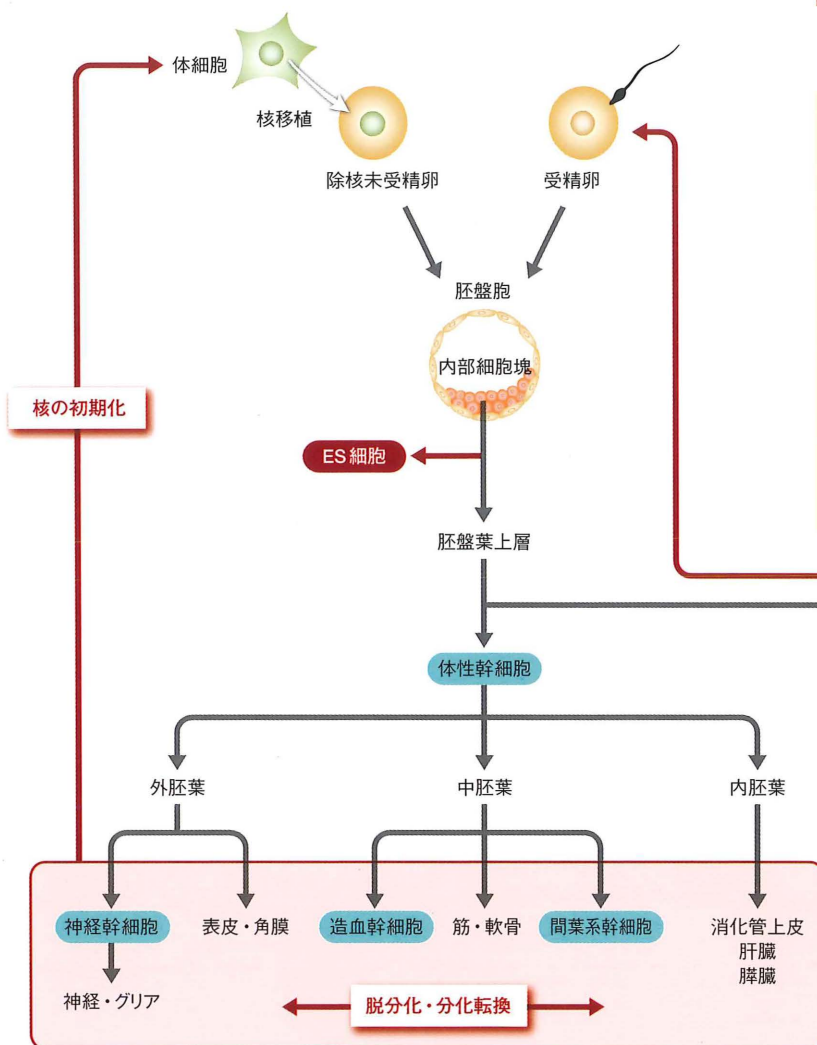
ES細胞とEG細胞の作製



3 幹細胞の再生医学への応用

ES細胞はノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの作製にすでに応用されているが、ヒトES細胞の樹立により、再生医療の材料としてヒトES細胞の応用が期待されている。ES細胞の再生医療への応用には、①全能性を維持したままでES細胞を増殖させられるか、②ES細胞をどのように臓器特異的な細胞に分化させられるか、が重要なテーマになる。

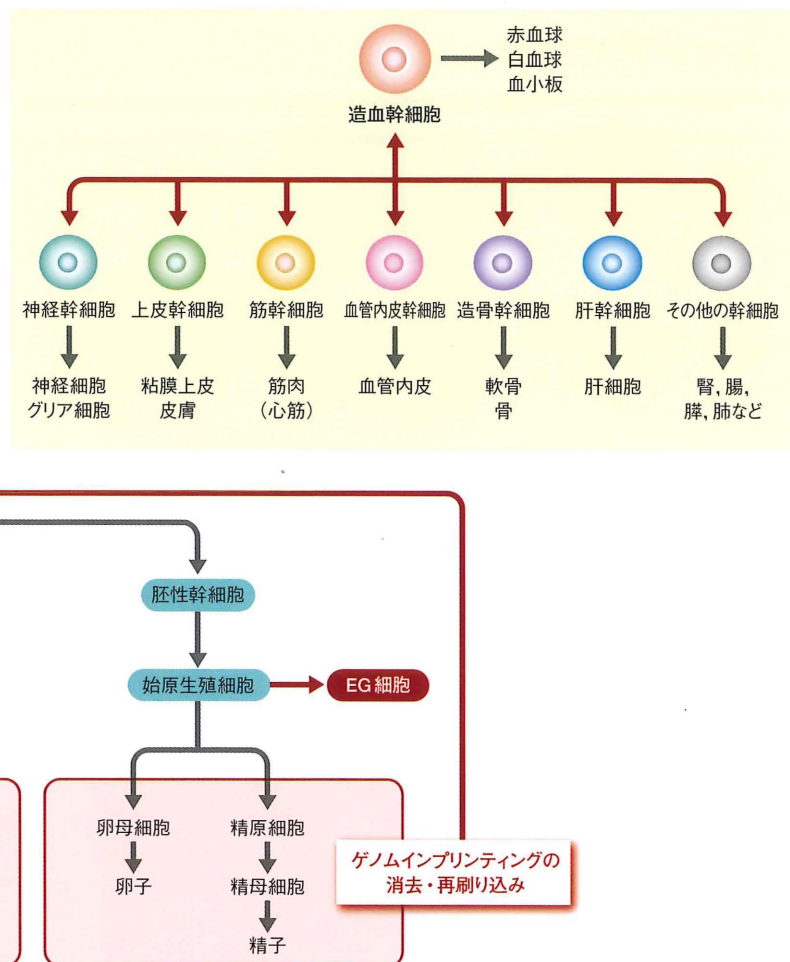
個体発生と再生医学の関係



4 体性幹細胞の分化の可塑性

従来は、完全な全能性幹細胞は胚性幹細胞のみであり、体性幹細胞すなわち造血幹細胞や組織幹細胞には臓器限定的な再生しか期待できなと思われていた。しかし、最近になって、体性幹細胞は予想以上に広範な分化能(分化の可塑性)をもつことが明らかになった。神経幹細胞から血液細胞や筋細胞に、造血幹細胞から肝細胞、筋細胞、神経細胞に、そして骨髄中の間葉系幹細胞から骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞、神経細胞に分化させることに成功している。将来、患者の骨髄由来間葉系幹細胞に、分化に関与する遺伝子を導入することにより、目的とする組織を再生する医療が可能になると期待されている。

造血幹細胞の分化の可塑性



8 核移植と再生医学

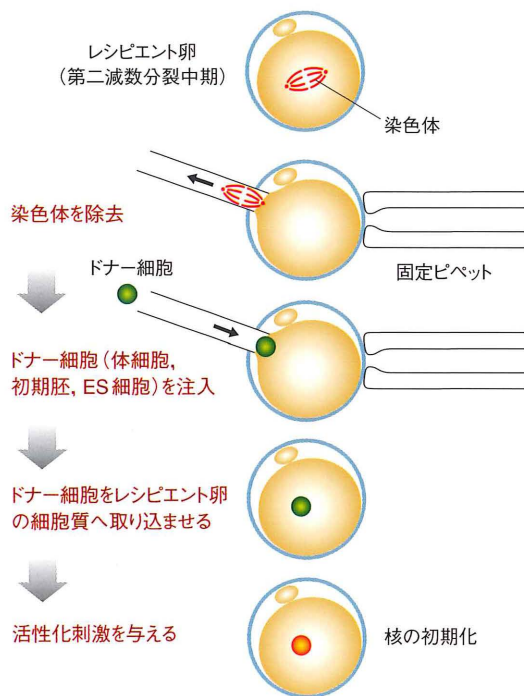
核移植によるクローン動物の作製は、畜産分野に加えて、臓器移植用動物の確立、患者のES細胞の樹立、体細胞核の未分化状態への変換など、再生医学分野にも応用が期待されている。

1 核移植と再生医学

体細胞核を卵に核移植すると初期化が起こり、体細胞の核は再び全能性をもつクローン動物として誕生する。この技術によって、体細胞由来ES細胞の作製が可能になりつつある。種々の動物種での成功率は未だ低いが、核のリプログラミング、エピジェネティクス、ゲノムインプリンティングの機構が明らかになることで、ヒトへの応用も期待される。

核移植の方法

マイクロマニピュレーターに卵を固定し、除核ピペットで染色体を除去する。次いで、ドナー細胞を直流パルスを与えて融合するか、卵細胞質中へ直接注入して核移植を行う。その前後に、電気刺激、ストロンチウム、イオノフォアなどで単為発生を誘起し、発生刺激を与える。



2 核のリプログラミング

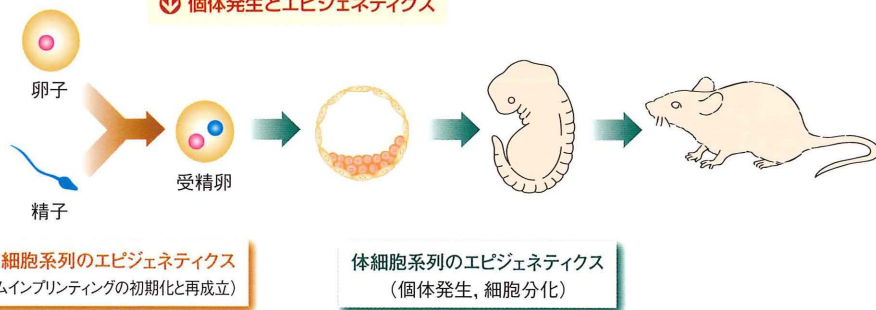
体細胞クローン技術では、除核未受精卵(レシピエント卵)に、二倍体の分化細胞の核(ドナー核)を導入する。このとき、ドナー核は、レシピエント卵の細胞質因子の支配を受けて、核の再構築やゲノムのエピジェネティックな修飾を受け、個体発生能を再び獲得する。この過程を、核のリプログラミングと呼ぶ。

3 エピジェネティクス

配偶子や受精卵にすでに成体の原型が存在するという前成説に対して、個体発生の際に単純な構造から複雑な構造が新たに形成されるとする後成説をエピジェネティクス(epigenetics)という。エピジェネティクスという概念は、その後、同じ遺伝子型(genotype)の細胞が遺伝子発現の違いによって異なる細胞に分化し、分化後は他の細胞には変化しないことを意味するようになった。さらに、DNAメチル化、ヒストンの脱アセチル化やクロマチンの修飾・構造変換など、細胞の分化状態を決める遺伝子調節メカニズムを調べる学問分野をさす場合にも用いられる。

幹細胞の分化や可塑性は、エピジェネティクスによって決定される。幹細胞の分化を人工的に再プログラムして、目的とする細胞に変換できれば、再生医療への応用に役立つ。そのためにはエピジェネティクスの機序の解明が重要である。

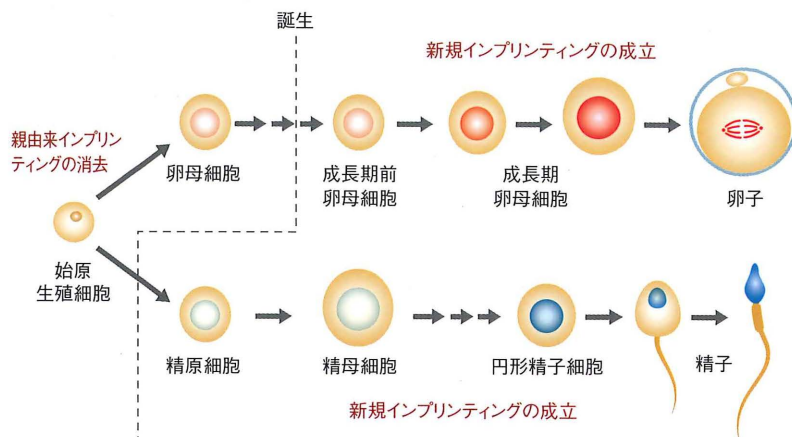
個体発生とエピジェネティクス



4 ゲノムインプリンティング

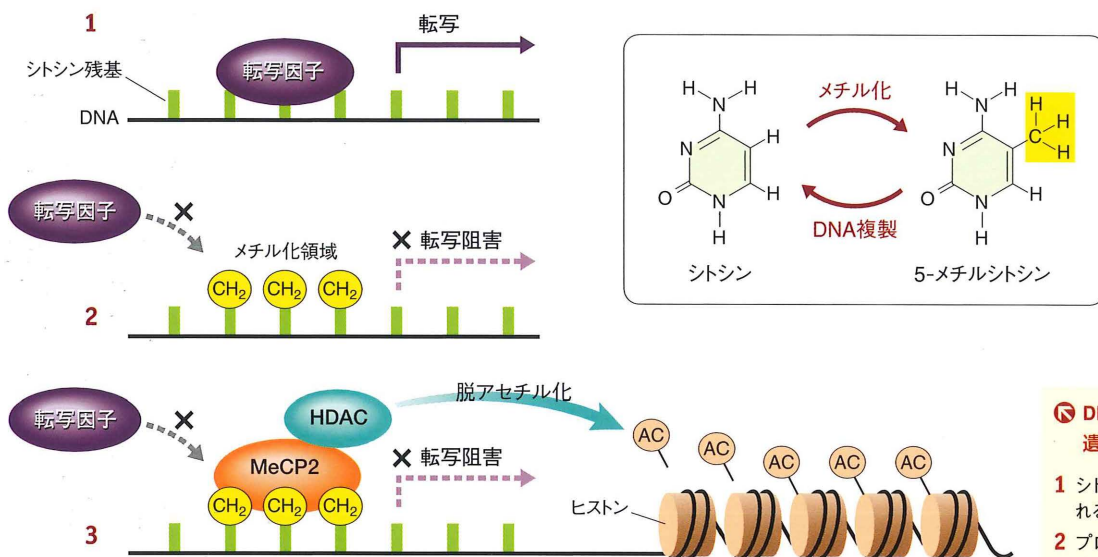
受精後、両親由来のゲノムの影響を受け、父親由来または母親由来の対立遺伝子だけを刷り込まれる遺伝子をインプリント遺伝子と呼ぶ。インプリント遺伝子の機能はさまざまであるが、一般に父親由来は胎児を成長させる方向に、母親由来は成長を抑制する方向に作用するといわれている。インプリンティング(刷り込み)の成立には、インプリント関連遺伝子の脱メチル化による発現が必要である。

④ 生殖細胞のゲノムインプリンティング



5 DNAのメチル化

遺伝子の発現調節領域にはCpGサイトがクラスターを形成しており、シトシン残基がメチル化されると遺伝子発現が抑制される。雌雄アレル間ではインプリント関連遺伝子のメチル化状態が異なる領域が存在し、インプリンティング発現に必要なDNA修飾機序として働いている。DNAのメチル化は、正常な発生と分化に重要な役割を果たしており、脱メチル化剤によって幹細胞の脱分化が可能である。



⑤ DNAのメチル化とヒストンの脱アセチル化による遺伝子発現の調節

- 1 シトシン残基が脱メチル化状態では、転写が促進される。
- 2 プロモーター領域がメチル化されると、転写因子が結合できない。
- 3 メチル化CpG結合タンパク質 (MeCP2) は、転写因子の結合を阻害するとともに、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリクルートする。HDACはクロマチン構造を修飾することにより、転写を抑制する。