

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「アポトーシスにおけるゲノム構造変化の分子機構」
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）
研究代表者 長田 重一 （大阪大学院生命機能研究科 教授）

3. 研究内容及び成果：

長田グループのプロジェクトは、生体の発生過程で見られる数多くの不要な細胞、害となる細胞がどのような分子メカニズムで速やかに除去されるか、いわゆる発生過程にみられるアポトーシスのプロセスを分子生物学的手法での解析を目指すものである。と同時に生体においてその恒常性を維持するため老化した細胞は速やかに除去され新しい細胞と置き換わる現象、ウイルスに感染した細胞、がん化した細胞はリンパ球などの白血球細胞に攻撃され体内から除かれる現象も研究対象に含めてより広領域でアポトーシスの本態に迫ろうとするものである。既にアポトーシスにおいて、核や細胞質が凝縮するとともにその染色体 DNA がヌクレオソーム単位に切断されることが知られているが、この過程を誘起する分子機構、その生理作用などについても生化学的、分子生物学的に追求を行い、所期の成果を挙げている。

長田グループは、1990 年代初め、ある種のサイトカイン (Fas リガンド) が “death factor” としてその特異的受容体に結合しアポトーシスを誘導することを見出し、この系の異常が、細胞の異常増殖、がん、自己免疫疾患、組織の破壊などさまざまな疾患へと導くことを明らかにした。ついで、Fas リガンドによるアポトーシスのシグナル伝達機構の解析から、この過程にはカスパーゼと呼ばれるたんぱく質分解酵素が必須であることを示した。さらに、このカスパーゼの下流にカスパーゼによって活性化される DNase が存在することを見出し、これを CAD (caspase-activated DNase) と命名するとともに、CAD ならびにその阻害たんぱく質 (ICAD、inhibitor of CAD) の精製、遺伝子の単離に成功した。本プロジェクトはこのような背景のもとに、アポトーシスの最終段階で作用する DNase CAD、およびその inhibitor、ICAD の活性化機構、作用機構を、生化学的、分子生物学的に解析するとともにその三次構造を明らかにすることを目的としている。また、アポトーシスにおける染色体 DNA 切断の意義を CAD や ICAD を欠損したマウスを用いて解析し、また、ショウジョウハエの CAD、ICAD homolog を単離し、CAD、ICAD の生理作用をハエの遺伝学を用いて解析することも研究目的とした。

本プロジェクトの結果は極めて著しく、世界的に高く評価されている。それらを列記すると、(1) ICAD は CAD がリボソーム上での合成途上に結合し、hsp (heat shock protein) 70、hsp40 と呼ばれるシャペロンたんぱく質とともに、CAD の折り畳みを促進することを明らかにした。また、CAD はヒスチジン残基を活性部位に持つ中性 DNase であることを証明した。

(2) NMR を用いて CAD と ICAD の N-末端に存在する約 80 アミノ酸の領域の三次構造を決定し、これらの構造は類似していること、これらはお互いに相互作用しあうことを示した。(3) CAD 遺伝子を欠損したマウスを樹立し、CAD がアポトーシス時に作用する唯一の DNase であ

ることを証明した。しかし、DNAの切断が起こらなくても細胞は死滅し、DNA分解が細胞をアポトーシスに陥らせるための必須の反応ではないことも明らかにした。(4) アポトーシス細胞のDNAは、死細胞がマクロファージに貪食された後マクロファージに存在するDNase IIによっても分解されること、CAD、DNase II 両遺伝子を欠損するマウスでは自然免疫が活性化され、臓器の発生阻害がおこることを示した。(5) ショウジョハエより CAD、ICAD 遺伝子を単離し、アポトーシス時の DNA 分解の分子機構は哺乳動物によく保存されていることを示した。そして、ICAD、DNase II 欠損ショウジョハエを樹立し、この変異体では抗細菌ペプチド遺伝子の発現が強く誘導されていることを示した。(6) アポトーシス細胞のDNAがマクロファージによって貪食された後分解されることを利用して、貪食の定量系を確立し、貪食に関与する因子を同定した。(7) 赤血球の分化過程で脱核された核はマクロファージによって貪食された後、DNase II によって分解されることを示した。(8) 目のレンズ細胞の分化過程で核 DNA の分解に関与する酵素を同定し、この酵素が作用しないとマウスは白内障に陥ることを示した。

以上、CAD、ICADの作用機構、生理作用の解析に関して、長田グループは順調に研究を進捗させた。特に、アポトーシス時に分解を免れた染色体 DNA が自然免疫を活性化するという結果は予期せぬ結果であったが、その生物学的意義は極めて大きいと考えられる。本研究は今後のアポトーシスの研究に多くの基礎的知見を提供したが、特にアポトーシス時に分解を免れた DNA による自然免疫の活性化を確認するとともに、自己免疫疾患などとの関わりを解析することがひとつの重要なポイントになる。また、アポトーシス細胞の DNA 分解に関与している酵素 (DNase II) が赤血球の脱核にも関与しているという結果や、レンズ細胞での脱核に関与している特異的 DNase を同定できたことは大きな成果である。CAD 欠損細胞の DNA もマクロファージに貪食された後、分解されるという結果は、マクロファージによるアポトーシス細胞貪食の系の Assay 系の開発へと繋がり、これにより貪食に関与する新しい因子が同定できたことも大きな成果である。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で 55 件掲載された。長田グループのアポトーシスにおけるゲノム構造変化の分子機構というテーマについては、本課題を採択する時に果たしてアポトーシスとゲノム構造変化とをどのように結びつけるのかについて、議論の対象となった。しかし、5 年間に及ぶ長田グループの成果は当初の予想を越え、世界的に見て極めて高いという評価がアドバイザー全員的一致した意見であった。特に、CAD、ICADの作用機構、及びその生理作用については極めて明快な実験的成果を得ているし、さらにアポトーシス細胞のマクロファージによる貪食や赤血球の脱核等の複雑な生命現象のメカニズムを分子レベルで見事に解明し、さらに最近では先天性の白内障の原因解明にも繋がる極めて興味ある成果を挙げている。このように長田グループは、長田教授の優れたリーダーシップのもと世界的な成果を数多く 5 年間に亘って出し続け、本CRESTの評価を高める面で重要な貢献としたと思われる。長田グループの成果の論文は、多くの世界一流のジャーナルに数多く発表されており、従来狭義な意味でのアポトーシスの役割を様々な生命現象へ広げ、アポ

トーススの生物学的意味をより広範囲に具体的に挙げて解明したことは、その意義は極めて大きい。更に、当初明確でなかったDNAの構造変化、その分解についてそれに関与するDNA分解酵素の役割など、具体的な生化学的知見を得たことの意義も大きい。このような基本的な研究にも関わらず、既に4件の特許の出願が行われていることも高く評価したい。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

長田グループの研究課題「アポトーシスにおけるゲノム構造変化の分子機構」は、生物の発生過程、及び様々な生物現象時にみられる不要な細胞が系から除去されるアポトーシスという重要な生命現象の分子機構を明らかにするという戦略目標のもとに始められた。長田教授は、本研究課題の開始時に既にある種のサイトカインがアポトーシスに決定的な役割をするという成果を挙げていたが、本課題ではそれをさらに広範なアポトーシスの系におけるゲノム構造変化という点を軸にした研究を展開し、上述したような多くの世界的な成果を得た。長田グループは当初の戦略目標を十二分にクリアしたと同時に、アポトーシスという生命現象の様々な側面を新たに明らかにした。これらは今後、先天性の病気を含む幾つかの病因の解明に繋がる基礎になる成果を挙げ、本方面の特に医学への貢献は大きいと言わねばならない。

4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

「恩賜賞・学士院賞」平成12年6月

「文化功労者顕彰」平成13年11月