

「ゲノムの構造と機能」
平成10年度採択研究代表者

長田 重一

(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

「アポトーシスにおけるゲノム構造変化の分子機構」

1. 研究実施の概要

アポトーシスは生理的な細胞死の過程であり、この過程では、カスパーゼと呼ばれる一群のプロテアーゼが活性化され種々の細胞内分子を切断する。この最終段階で、カスパーゼは特異的なDNase (CAD) の阻害分子 (ICAD) を切断することによりCADを活性化し染色体DNAを切断する。本研究は、CADの活性化機構、反応機構、および、アポトーシスにおける染色体DNA切断の生理作用を解析をすることを目的とした。その結果、本年度はICADはCADの阻害作用ばかりでなくCADの合成時にシャペロンとして作用すること、その際、CAD, ICADのN-末端に共通に存在するドメイン (CADドメイン) が必須であることを示し、その構造をNMRを用いて決定した。また、カスパーゼにより切断されないICADを発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、このマウスから調製した胸腺細胞は、ex vivo では種々のアポトーシス刺激により、DNAの断片化が起らないのに対し、in vivo ではDNAの切断が起こっていることが判明した。このことを詳細に解析した結果、アポトーシスを起こした細胞がphagocytesにより貪食された後、そのリソゾームに存在する酸性DNaseにより標的細胞の染色体DNAが切断されることが示された。一方、ショウジョハエの細胞株よりCADを精製し、そのcDNAを単離した。これらは、ほ乳動物の遺伝子と比べ、17-20%の相同性を示した。

2. 研究実施内容

(1) CADの合成におけるICAD蛋白質のシャペロンとしての役割

CADを細胞内あるいは無細胞系で合成した場合、aggregatesを形成し、機能のある蛋白質として合成されない。この際、ICADが存在するとCAD蛋白質は正常に折り畳まれICADとの複合体として回収される。このことから、ICADはCADに対して特異的なシャペロンとして作用すると考えられた。そこで、大腸菌を用いてCADを産生しこれをinclusion bodiesとして回収した。この蛋白質をグアニジン塩酸により可溶化した後、ICADの存在下でrefoldingさせるとCAD蛋白質がICADとの複合体として回収された。この際、reticulocyte lysateおよびATPが必須であった。以上の結果は、ICADはCADに対する特異的なシャペロンとして作用するこ

と、その際、reticulocyte lysateに存在する蛋白質がICADの作用をATP依存的に補佐することを示している。ところで、ICADにはalternative splicing によって産生される2種のform (ICAD-L およびICAD-S) が存在するが、CADに対するシャペロンとしての活性は、ICAD-L にのみ認められた。このことは、CADは細胞内ではICAD-Lとのみ複合体を形成しているという結果と一致する。

(2) CAD、ICADタンパク質の構造解析

CAD, ICADの作用機構を理解するには、その三次構造の解明が必須である。その一端として、まず、CADのN-末端 80アミノ酸 (CAD domain) を大腸菌を用いて調製し、その構造をNMR を用いて決定した。この領域は、CADばかりでなく、ICADのN-末端部位にも見いだされ、ICADがCADのシャペロンとして作用する際、これらの領域の相互作用が必須と考えられる。CADのこの領域は、1個の α -helixと5個の β -sheetsからなりその表面には親水性のアミノ酸の部位が存在し、この部位がICADとの相互作用する領域と予想される。現在、この約80アミノ酸から成るCAD, ICADの複合体を調製し、その三次構造の決定を試みている。

(3) CAD、ICAD 遺伝子を欠損するマウスの樹立

CAD, ICADの生理作用を解明するには、その遺伝子発現機構を解析することが必須である。そこで、まず、マウス CAD、ICADの染色体遺伝子を単離し、その構造を決定した。その結果、CADは7個のエクソン、ICADは6個のエクソンからなり、ともにマウス4番の染色体に隣接して存在することを示した。また、ヒトのCAD, ICAD遺伝子も同様の構造をしており、1番の染色体に存在することを示した。一方、CAD, ICAD遺伝子は様々な組織に発現していることをNorthern hybridization, Western Blotting により示した。特にアポトーシスの際DNA断片化がよく観察されるリンパ球系の組織(胸腺・脾臓)において顕著な発現が認められた。また、CAD, ICAD遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子と結合させたレポーター遺伝子を用いた解析から、CAD, ICAD遺伝子ともに種々の組織で発現されるいわゆる"house-keeping genes" であることが確認され、アポトーシスが種々の組織、細胞で起る普遍的な現象であることと対応していた。

次いで、CAD, ICAD遺伝子の生体における役割を解析する目的で、カスパーゼによって切断されないICADをコードする遺伝子をヒトElongation Factor 1 のプロモーターの下流に挿入し、この遺伝子を普遍的に発現するトランスジェニックマウスを樹立した。このマウスから調製した胸腺細胞はガンマ線照射、グルココルチコイド、Fasの活性化などにより死滅したが、本来起るべき染色体DNAの断片化は全く誘導されなかった。ところが、胸腺や子宮でのin vivoでのアポトーシスにおける染色体DNAの断片化は、正常マウスのそれと同等に観察された。そこで、この細胞を詳細に検討したところ、これらアポトーシスを起こしている細胞は、

マクロファージに貪食されていることが示された。実際、CADが作用できない細胞にアポトーシスを誘導した後、マクロファージに貪食させたところ、その染色体DNAはアポトーシスに特異的なラダーを示して分解された。以上の結果はアポトーシスを起こしている細胞は"eat me"シグナルを提示し、マクロファージなどの食細胞に貪食されること、この標的細胞は貪食された後、リソソーム内で、酸性DNase (DNase II) によりそのDNAが分解されうること示している。

(4) ショウジョハエからのCAD, ICADの精製とcDNAの単離

発生段階におけるアポトーシス、染色体DNAの切断の生理作用を解析するためショウジョハエの細胞株からCAD を精製し、その部分アミノ酸配列を決定し、この蛋白質に対するcDNAを単離した。ショウジョハエのCADはマウスやヒトCADとアミノ酸配列上約20%の相同性を示した。このCADをCOS細胞に発現させることにより、CADは52kDaの蛋白質として合成された後、カスパーゼによって切断活性化されることが示された。この機構はマウス、ヒトのCADとは異なっている。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Nagata, S. (1999) Biddable death. (News and Views) *Nature Cell Biol.* 1, E143-E145.

Nagata, S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genetics* 33, 29-55.

Sakahira, H., Enari, M., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. and Nagata, S. (1999) Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr. Biol.* 9, 543-546.

Kawane, K., Fukuyama, H., Adachi, M., Sakahira, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Nagata, S. (1999) Structure and promoter analysis of murine CAD and ICAD genes. *Cell Death & Differ.* 6, 745-752.

Miwa, K., Hashimoto, H., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., and Suda, T. (1999) Therapeutic effect of an anti-Fas ligand monoclonal antibody on lethal graft-versus-host disease. *Int. Immunol.* 11, 925-931.

Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N., Jenkins, N., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S., and Baba, (1999) Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VAPC1) receptor. *Genomics* 58, 90-93.

Hashimoto, W., Osaki, T., Okamura, H., Robbins, P. D., Kurimoto, M., Nagata, S., Lotze, M. T., and Tahara, H. (1999) Differential antitumor effects of administration of rIL-18 or rIL-12 are mediated primarily by Fas-FasL and perforin induced tumor apoptosis respectively. *J. Immunol.* 163, 583-589.

Kakinuma, C., Takagaki, K., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Uemura, A., and Shibutani, Y. (1999) Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol. Pathol.* 27, 412-420.

- Kaser, A., Nagata, S., and Tilg, H. (1999) Interferon alpha augments activation-induced T cell death by upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression. *Cytokine* 11, 736-743.
- Kuwano, K., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Suda, T., Kunitake, R., Maeyama, T., Miyazaki, H., and Hara, N. (1999) Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 104, 13-19.
- Moriwaki, M., Itoh, N., Miyagawa, J., Yamamoto, K., Imagawa, A., Yamagata, K., Iwahashi, H., Nakajima, H., Namba, M., Nagata, S., Hanafusa, T., and Matsuzawa, Y. (1999) Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 42, 1332-1340.
- Samali, A., Hivtovsky, B., Jones, D., Nagata, S., and Orrenius, S. (1999) Apoptosis: Cell death defined by caspase activation. *Cell Death & Diff.* 6, 495-496.
- Sugimoto, N., Fukuda, Y., Saito-Ohara, F., Kamiyama, R., Nakagawara, A., Mukae, N., Nagata, S., and Inazawa, J. (1999) The human caspase-activated DNase (CAD) gene: genomic structure, exonic single-nucleotide polymorphisms, and a highly polymorphic dinucleotide repeat at the CAD locus. *J. Hum. Genet.* 44, 408-411.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 22, 12-18.
- McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K.-I., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2000) An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes & Develop.* 14, 549-558.
- Sakahira, H., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2000) Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* 275, 8091-8096.
- Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Burdon, J.-C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E., and Reisdorf, P. (2000) The death receptor Fas (Apo1/CD95) is a direct transcriptional target of the tumor suppressor protein p53. *J. Biol. Chem.* 275, 3867-3872.
- Sotozono, C., Sano, Y., Suzuki, T., Tada, R., Ikeda, T., Nagata, S., and Kinoshita, S. (2000) Soluble Fas ligand expression in the ocular fluids of uveitis patients. *Curr. Eye Res.* 20, 54-57.
- Tamada, K., Shimozaaki, K., Chapoval, A. I., Zhu, G., Sica, G., Flies, D., Boone, T., Hsu, H., Fu, Y.-X., Nagata, S., Ni, J., and Chen, L. (2000) Modulation of T cell-mediated immunity in tumor and graft versus host disease models through LIGHT costimulatory pathway. *Nat. Med.* 6, 283-289.

Tamada, K., Shimozaki, K., Chapoval, A. I., Zhai, Y., Su, J., Chen, S.-F., Hsieh, S.-L., Nagata, S., Ni, J., and Chen, L. (2000) Light, a member of tumor necrosis factor family, is a novel co-stimulatory molecule for human dendritic cells in the induction of T cell response. *J. Immunol.* 164, 4105-4110.

Cossarizza, A., Stent, G., Mussini, C., Paganelli, R., Borghi, V., Nuzzo, C., Pinti, M., Pedrazzi, J., Benatti, F., Esposito, R., Rysok, B., Nagata, S., Vella, S., C., F., and De Rienzo, B. (2000) Deregulation of the CD95/CD95L system in lymphocytes from patients with primary, acute HIV infection. *AIDS*, 14, 345-355.

Ueno, Y., Ishi, M., Yahagi, K., Mano, Y., Kisara, N., Nakamura, N., Nagata, S., Shimosagawa, T., and Toyota, T. (2000) The role of Fas system in cholangiopathy observed in murine model of graft versus host disease. *Hepatology* 31, 966-974.