

「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CADがヒスチジン残基を活性部位に持つDNaseであること、ICADはCADのDNAへの結合を阻害することを示した。また、CADとICADのN-末端に存在するCAD領域は共通の構造を持ち複合体を形成することも示された。一方、ショウジョウバエからCAD、ICAD遺伝子を単離し、CADによるDNA切断の機構が哺乳動物ばかりでなくハエでも保存されたシステムであることを示した。

2. 研究実施内容

a. CAD DNase の反応機構とICADによるCADの阻害機構

まず、CAD、ICAD組替え蛋白質をBaculovirus, SF-9細胞系を用いて大量に調製しCADはDNAを効率良く切断する中性DNaseであること、その際、3'OH基を持つDNA断片を形成することを示した。アポトーシスを起こしている細胞はTerminal transferaseで染色 (TUNEL染色) されるがCADが3'OHを持つDNA断片を形成することはCADがこの染色反応の責任分子であることを支持する。マウスCADには14個のシステイン残基、10個のヒスチジン残基が存在する。システイン残基の修飾試薬はCAD DNase活性を失活させないが、ヒスチジン残基の修飾試薬 (diethylbcarbonate) は低濃度でCAD DNaseを可逆的に失活させた。さらに、CADのC-末端側に存在する4個のヒスチジン残基に変異を導入するとこの変異体はCAD活性を示さなかった。以上の結果からCADはヒスチジン残基を活性部位に持つDNaseと結論された。一方、ICADはCADの活性を抑制するがその抑制機構の酵素化学的解析からICADはCADの活性部位に結合するのではなくCADがDNAに結合する過程を阻害することが示された。

b . CAD、ICADタンパク質の構造解析

DNaseであるCADその阻害蛋白質であるICADのN-末端には約80アミノ酸からなる相同領域CAD/CIDE domainが存在し、この領域はICADがCADのシャペロンとして作用する上で必須である。昨年度の本研究でCADのCAD/CIDE領域の構造をNMRを用いて決定した。本年度はICADのCAD/CIDE領域がCADのそれと同様の構造をしていること、CADとICADのCAD/CIDE領域はお互いに相互作用し複合体を形成することが示された。このことはCADのリボソーム上で合成時にCAD蛋白質のN-末端部位が合成されると速やかにICADが結合しCADのfoldingを促進する可能性を示唆している。

c . ショウジョウバエからのCAD , ICADの精製とcDNAの単離

染色体DNAの分解を伴ったアポトーシスは哺乳動物ばかりでなくハエや線虫でも見られる現象である。これら下等生物のアポトーシスにおけるCAD、ICADの関与を検討した。すなわち、ショウジョウバエの細胞株 (Schneider 2) からCAD、ICADを精製し、これら蛋白質に対するcDNAを単離した。ショウジョウバエのCAD、ICADは哺乳動物の遺伝子とアミノ酸配列上約20%の相同性を示した。特に、N-末端のCAD領域、DNaseとしての活性に必要なヒスチジン残基は良く保存されていた。しかし、マウスやヒトのCADとは異なりハエCADが活性化されるにはICADばかりでなくCADもカスパーゼによって切断されることが必要であった。さらに、ショウジョウバエの神経細胞株 (BG-2) をキナーゼの阻害剤H-8で処理すると細胞はDNAの切断を伴って死滅するがこの際、CAD、ICADが切断されること、カスパーゼに抵抗性のICADを発現している細胞ではDNAの切断が起こらないことが示された。今後はCADやICADの遺伝子を欠失したショウジョウバエを樹立し、ハエの発生におけるアポトーシスの生理的役割を検討する予定である。

d . Fasリガンドによるネクローシスの分子機構

私達は、これまでに、FasリガンドはFasに結合することによりアポトーシスを誘導することを示してきた。この際、FADDと呼ばれるadaptor分子を介してカスパーゼ8 ,カスパーゼ3が活性化され、上記に示したCAD ,ICAD系を用いてDNAが切断され、細胞は死に至る。一方、私達はカスパーゼ8の発現を欠くヒトJurkat細胞を見いだした。この細胞にFasを過剰発現しFasリガンドで処理したところ意外なことにこの場合も細胞は死滅した。この際、カスパーゼの活性化は起こらずDNAの断片化も誘導されなかった。しかし、この際、細胞、特にミトコンドリアは膨潤しネクローシスの形態を伴っていた。また、ミトコンドリアの膜電位は顕著に低下していたが、アポトーシス時に見られるチトクロームCの放出は認められなかった。一方、種々の代謝阻害剤を検討したところ、ある種の抗酸

化剤 (PDTC, pyrrolidine dithiocarbamate) が、このネクローシスの過程を顕著に阻害した。実際、Fasリガンドによる細胞死はカスパーゼの阻害剤とPDTCの存在下でほぼ完全に抑制された。以上の結果は、Fasリガンドはアポトーシスばかりでなく、ネクローシスの過程をも誘導することを示している。今後は、この過程に關与する分子を同定する必要があるだろう。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256, 12-18.

Nagata, S. (2000) Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nature Med.* 6, 502-503.

Nagata, S. (2000) Apoptosis. *Fibrinolysis & Proteolysis* 14, 82-86.

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.

Yokoyama, H., Mukae, N., Sakahira, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (2000) A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 275, 12978-12986.

McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. and Nagata, S. (2000) An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes & Develop.* 14, 549-558.

Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., Sakahira, H. and Nagata, S. (2000) Identification and developmental expression of inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 275, 21402-21408.

Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y. and Nagata, S. (2000) Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J. Cell Biol.* 151, 1247-1255.

Tamada, K., Shimozaki, 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. *Nature Med.* 6, 283-289.

Otomo, T., Sakahira, H., Uegaki, K., Nagata, S. and Yamazaki, T. (2000) Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nature Struct. Biol.* 7, 658-662.

Cossarizza, A., Stent, G., Mussini, C., Paganelli, R., Borghi, V., Nuzzo, C., Pinti, M., Pedrazzi, J., Benatti, F., Esposito, R., Rosok, 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* 345-355.

Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Burdon, J.-C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. and Reisdorf, P. (2000) The death receptor Fas (Apo 1 /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., 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 of human dendritic cells in the induction of T cell response. *J. Immunol.* 164, 4105-4110.

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

Morita, Y., Naka, T., Kawazoe, Y., Fujimoto, M., Narazaki, M., Nakagawa, R., Fukuyama, H., Nagata, S. and Kishimoto, T. (2000) Signals transducers and activators of transcription (STAT)induced STAT inhibitor- 1 (SSI- 1) /suppressor of cytokine signaling- 1 (SOCS- 1) suppresses tumor necrosis factor α -induced cell death in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5405-5410.

Uegaki, k., Otomo, T., Sakahira, H., Shimizu, M., Yumoto, N., Kyogoku, Y., Nagata, S. and Yamazaki, T. (2000) Structure of the CAD domain of caspase-activated DNase and interaction with the CAD domain of its inhibitor. *J. Mol. Biol.* 297, 1121-1128.

Sakamaki, K., Kanda, N., Ueda, T., Aikawa, E. and Nagata, S. (2000) The eosinophil peroxidase gene forms a cluster with the genes for myeloperoxidase and lactoperoxidase on human chromosome 17. *Cytogenet. Cell Genet.* 88, 246-248.

Ryo, K., Kamogawa, Y., Ikeda, I., Yamauchi, K., Yonehara, S., Nagata, S. and Hayashi, N. (2000) Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 2047-2055.

Okuda, Y., Sakoda, S., Fujimura, H., Nagata, S., Yanagihara, T. and Bernard, C. C. (2000) Intrathecal administration of neutralizing antibody against Fas ligand

suppresses the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 164-168.

Hashimoto, H., Shintani, N., Nishino, A., Okabe, M., Ikawa, M., Matsuyama, S., Itoh, K., Yamamoto, K., Tomimoto, S., Fujita, T., Hagihara, N., Mori, W., Koyama, Y., Matsuda, T., Nagata, S. and Baba, A. (2000) Mice with markedly reduced PACAP (PAC(1)) receptor expression by targeted deletion of the signal peptide. *J. Neurochem.* 75, 1810-1817.