

「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。そして、アポトーシスを起こした細胞は、マクロファージなどの食細胞により貪食処理される。本研究は、CAD の活性化機構を解析するとともに、アポトーシスにおける染色体 DNA 切断の生理作用を明らかにすることをすることを目的としている。昨年度までの本研究で、CAD は単独では活性のあるタンパク質として folding されないこと、CAD の inhibitor である ICAD が CAD の folding に必要であること、CAD はヒスチジン残基を活性部位に持つ DNase であることを示した。また、CAD が作用できないトランスジェニックマウスの解析からアポトーシス時の染色体 DNA の断片化は死細胞に存在する CAD ばかりでなく、アポトーシス細胞を貪食するマクロファージの酵素によっても担われていることを示した。本年度、(1) CAD の folding には ICAD 以外に、Hsp70, Hsp40 シャペロンが必要なこと、(2)マクロファージに存在する DNase II は赤血球の成熟過程に関与していること、(3)マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に MFG-E8 と呼ばれる因子が関与していることを示した。

2. 研究実施内容

(1) CAD DNase の合成

精製した組み換え CAD 蛋白質をグアニジン塩酸で失活させた後、これを renaturation させる反応系を構築し、CAD の renaturation には ICAD 以外に reticulocyte lysates に存在する因子と ATP が必要であった。Reticulocyte lysate には ATP に依存したシャペロンとして、Hsp70/Hsp40 系と TriC が独立に存在する。抗 Hsp70 抗体で reticulocyte lysate を処理すると CAD の renaturation をサポートする活性は消失した。また、精製した Hsp70, Hsp40 は ICAD の存在下、用量依存的に CAD を renaturation した。さらに、denature した CAD を通常の緩衝液に希釈すると CAD の N-末端80アミノ酸の領域(CAD domain)は自ら renaturation し、その部分に ICAD が結合するが、C-末端側の renaturation には hsp70, hsp40 が必須であった。一方、reticulocyte lysates を用いた CAD mRNA の翻訳系を用いた解析から、リボソーム上で CAD の CAD-domain

が合成された段階で ICAD は CAD の nascent polypeptide に結合することを示した。以上の結果から、CAD mRNA の翻訳が進むに従い、Hsp70, Hsp40 が CAD の C-末端領域を部分的に folding し、この領域が CAD の N-末端領域に結合している ICAD により認識され、最終的な CAD の folding が完結すると考えられる。

(2) 赤血球の脱核過程における DNaseII の関与

アポトーシス細胞を貪食するマクロファージのリソソームには DNaseII が存在する。この酵素のアポトーシスにおける染色体 DNA 分解における寄与を検討するため DNaseII 遺伝子を欠損したマウスを構築した。マウス 19 番目の染色体に存在する DNaseII 遺伝子を含む DNA 断片をマウス 129 strain の遺伝子ライブラリーから単離した。この DNA 断片中の DNaseII 遺伝子全体を neo 薬剤耐性遺伝子と置き換えることによりターゲットベクターを構築し、この DNA をマウス 129 strain 由来の ES 細胞株 R1 に導入し、G-418 抗生物質耐性になった細胞株の中で DNaseII 遺伝子が置換されたものを PCR 法で選別した。この ES 細胞をマウス胚に注入し偽妊娠したマウスの子宮にもどし常法に従い DNaseII 遺伝子(+/-)マウスを樹立した。このヘテロマウスは正常に発生した。しかし、このヘテロの雌雄を交配したところ、DNaseII 遺伝子をホモとして欠損したマウスは胚発生の段階で死滅した。そこで妊娠の日数を追ってマウス胚を調べると胚発生の最終段階まで DNaseII^{-/-}は生存していた。しかし、その胚は重度の貧血を示し末梢血中の成熟赤血球数は野生型の 10%以下であり、この貧血によりマウスは生まれるや否や死滅したと結論された。

マウスの初期発生段階での造血は yolk sac で進行し、primitive erythropoiesis と呼ばれこの過程では有核の赤血球が産生される。一方、胚発生12日以降、造血の場は肝臓に移り、definitive erythropoiesis とよばれ、成体の骨髄での造血と同じように無核の赤血球が産生される。DNaseII^{-/-}胚では発生初期におこる primitive erythropoiesis の有核赤血球は正常であることから肝臓での definitive erythropoiesis に異常があると結論された。一方、DNaseII^{-/-}の胎児肝に存在する赤血球前駆細胞 (BFU-E, burst-forming unit of erythroid; CFU-E, colony-forming units-erythroid) の数は野生型マウス胚のそれと変わらなかった。また、DNaseII^{-/-}胚肝臓の細胞を放射線照射したマウスに移植したところ DNaseII 遺伝子を欠損した細胞由来の成熟赤血球が産生された。このことから、DNaseII 欠損マウスでの造血の異常は赤血球自身の問題ではなく、胚肝臓での造血をサポートする体制に異常があると結論した。

そこで胚肝臓の切片を調製し染色したところ DNaseII 欠損マウス胎児肝には Feulgen や DAPI で強く染色される多数の病巣が認められた。電子顕微鏡での観察、マクロファージ特異抗原である F4/80 による染色などから、この病巣は数多くの核を貪食したマクロファージと結論された。そして、このマクロファージの周りには赤芽球細胞、網状赤血球、成熟赤血球など赤血球の種々の分化段階の細胞が認められた。以上の結果からこの病巣は異常な血液島 (Blood Island) と結論した。血液島は一個のマクロファージのまわりを赤血球の前駆細胞が取り囲む構成物であり、この場が赤血球の増殖・分化する場所と考えられている。DNaseII 欠損マウスで、造血島のマクロファージが分解されていない多数の核を持っていることは、このマクロファージは通常、赤血球前駆細胞から放出された核を貪食し、リソソームに存在する DNaseII によって分解していることを示唆している。貪食し

た核の DNA が分解されないと、マクロファージは造血をサポートする能力を失うと考えられる。

(3) アポトーシス細胞をマクロファージに受け渡す因子の同定

マクロファージはアポトーシス細胞を特異的に認識し、健康な細胞は貪食しない。このことからアポトーシス細胞は“Eat me”シグナルを提示し、これをマクロファージが認識し貪食すると考えられている。しかし、この貪食過程の定量的 Assay 法が存在しないことなどからこの貪食の機構は殆ど解明されていない。私達は CAD が欠質した細胞はアポトーシス時に自らは DNA を切断できないが、マクロファージに貪食された後、この DNA が分解されることを見いだした。そこで、このことを利用してアポトーシス細胞の貪食の Assay 系を樹立した。ついで、thioglycolate で処理したマウスの腹腔から調製した活性型マクロファージを抗原としてハムスターを免疫し、その脾臓細胞をマウスミエローマ細胞と融合することにより、数千個のハイブリドーマを樹立した。これらハイブリドーマの培養上澄を上記アポトーシス細胞の貪食系に加えることにより、貪食過程に影響を与える抗体を選択した。そして、一つの抗体はアポトーシス細胞を貪食するマクロファージの割合を顕著に増加させるだけでなく、一つのマクロファージが貪食するアポトーシス細胞の数も増加させた。そこで、この抗体によって認識されるたんぱく質をマウスマクロファージ細胞株の膜分画より精製した。そのアミノ酸配列よりこのたんぱく質は MFG-E8 (Milk Fat Globule Protein-EGF8) と呼ばれる機能不明のたんぱく質と判明した。

MFG-E8 は N-末端からシグナル配列、2個の EGF ドメイン、2個の Factor VIII との相同領域 (C-1, C-2) を持つ分泌たんぱく質である。Northern Hybridization による解析から、この因子は活性化されたマクロファージで発現されるが、活性化されていないマクロファージや繊維芽細胞、胸腺細胞などでは発現されないことを見いだした。また、ヒト 293 細胞を用いて調製した MFG-E8 の組み換え体はアポトーシス細胞に特異的に結合した。このアポトーシス細胞への結合は、Phosphatidylserine (PS) に結合することの知られている Annexin V と競合し、実際、MFG-E8 は PS、Phosphatidylethanolamine (PE) で coat した microtiterplate に用量依存的に結合した。そして、MFG-E8 の種々の変異体の解析からこの結合は MFG-E8 の C-1, C-2 領域によって担われていることが示された。ところで、MFG-E8 の2番目の EGF 領域にはインテグリンに結合する能力を持つ RGD モチーフが存在する。PS と結合していない MFG-E8 はインテグリン発現細胞に結合しないが、PS と結合するとインテグリンへの結合能を獲得した。そして、本来、貪食能のない NIH3T3 細胞、特にインテグリンを高発現する NIH3T3 形質転換株に MFG-E8 を添加するとこの細胞はアポトーシス細胞を効率よく貪食した。一方、MFG-E8 の RGD モチーフを RGE に変えた変異体はアポトーシス細胞を認識したが、NIH 細胞に貪食能を付加する活性はなく、逆にマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を顕著に抑制した。以上の結果は、MFG-E8 はアポトーシス細胞に提示される PS を“eat me”シグナルとして認識し、この細胞をマクロファージにリクルートする因子と結論した。

3. 研究実施体制

分子機構研究グループ

① 長田 重一（大阪大学大学院医学系研究科、教授）

② 研究項目

アポトーシスにおけるゲノム構造変化の分子機構および生理作用の解明

構造解析グループ

① 森川 耿右（生物分子工学研究所、部長）

② 研究項目

CAD、ICAD の三次構造解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Fukumoto, T., Watanabe-Fukunaga, R., T., F., Nagata, S., Fukunaga, R.: The fused protein kinase regulates Hedgehog-stimulated transcription activation of *Drosophila* schneider 2 cells. J. Biol. Chem. 276: 38441-38448, 2001.
- Itai, T., Tanaka, M., Nagata, S.: Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF α -converting enzyme, but not its truncated soluble form. Eur. J. Biochem. 268: 2074-2082, 2001.
- Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S.: Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. Science 292: 1546-1549, 2001.
- Sakahira, H., Takemura, Y., Nagata, S.: Enzymatic active site of caspase-activated DNase (CAD) and its inhibition by inhibitor of CAD (ICAD). Arch. Biochem. Biophys. 388: 91-99, 2001.
- Shudo, K., Kinoshita, K., Imamura, R., Fan, H., Hasumoto, K., Tanaka, M., Nagata, S., Suda, T.: The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity. Eur. J. Immunol. 31: 2504-2511, 2001.
- Takakuwa, T., Dong, Z., Takayama, H., Matsuzuka, F., Nagata, S., Aozasa, K.: Frequent mutations of Fas gene in thyroid lymphoma. Cancer Res. 61: 1382-1385, 2001.
- Takayama, H., Takakuwa, T., Dong, Z., Nonomura, N., Okuyama, A., Nagata, S., Aozasa, K.: Fas gene mutations in prostatic intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis of laser capture microdissected specimens. Lab. Invest. 81: 283-288, 2001.
- D'Alessio, A., Riccioli, A., Lauretti, P., Padula, F., Muciaccia, B., De Cesaris, P., Filippini, A., Nagata, S., Ziparo, E.: Testicular FasL is expressed by sperm cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 3316-3321, 2001.
- Nagata, S.: Breakdown of chromosomal DNA. Cornea 21 (Suppl. 1), S1-S6, 2002.

- Sakahira, H., Nagata, S.: Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 277: 3364-3370., 2002.
- Fukuyama, H., Adachi, M., Suematsu, S., Miwa, K., Suda, T., Yoshida, N., Nagata, S.: Requirement of Fas expression in B cells for tolerance induction. *Eur. J. Immunol.*, 32, 223-230, 2002.
- Shimizu, M., Fukuo, K., Nagata, S., Suhara, T., Okuro, M., Fujii, K., Higashino, Y., Mogi, M., Hatanaka, Y., Ogihara, T.: Increased plasma levels of the soluble form of Fas ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angia pectoris. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 39: 585-590, 2002.

(2) 特許出願

国内特許 1 件