

「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 生命機能研究科 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、カスパーゼと呼ばれるプロテアーゼ、CADと呼ばれるDNaseによって実行される。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、アポトーシスにおける染色体DNA切断の分子機構、生理作用を明らかにすることを目的とした。我々はこれまでにアポトーシス時の染色体DNAの分解は死細胞に存在するCADばかりでなく、マクロファージのリソソームに存在するDNase IIによっても担われていることを示した。実際、CAD、DNase II両遺伝子を欠損したマウスでは、種々の臓器に未分解のDNAが大量に観察された。そして、この未分解のDNAが自然免疫を活性化し、これにより産生されたインターフェロンなどのサイトカインが種々の臓器の発生を抑制する可能性を見出した。このことは、アポトーシス時のDNA分解が生体の恒常性を維持する上で重要な反応であること、その破綻が自己免疫疾患などを引き起こす可能性を示唆している。

2. 研究実施内容

1. 目的

アポトーシスは、有害な細胞、無用の細胞を除去する細胞死の機構である。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順次活性化される。カスパーゼは種々の細胞内コンポーネントを切断し、このことが細胞膜の湾曲、核の凝縮と断片化、染色体DNAの分解を引き起こし、細胞を死へと誘導する。一方、この死細胞はその最終段階でマクロファージなどによって貪食処理される。本研究では、アポトーシスのシグナル伝達機構、特にアポトーシス時のDNA分解の分子機構、生理作用を明らかにすること、さらにマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食の分子機構を明らかにすることを目的とした。

2. CADによるアポトーシス細胞での染色体DNAの切断

私達はこれまでにFasリガンドによって誘導されるアポトーシスのシグナル伝達の解析からこの過程ではカスパーゼが活性化され、その下流に存在するCAD (caspase-activate DNase) が染色体DNAを分解することを生化学的に明らかにした。しかし、そ

の後、欧米のグループにより、アポトーシス時のDNA分解はCADばかりでなくミトコンドリアから遊離されるendonuclease Gと呼ばれるDNaseによっても起こる可能性が指摘された（参考論文1と2）。そこで、私達はCAD遺伝子を欠損したマウスを樹立しCAD以外のDNaseがアポトーシス時のDNA分解に関与している可能性を検討した。そして、CAD欠損マウスから調製した胸腺細胞、脾臓細胞、肝細胞（hepatocytes）、繊維芽細胞（fibroblasts）をさまざまなアポトーシス刺激で処理したところ、どのような刺激でも、正常細胞では見られるDNA断片化が全く観察されなかった。このことはアポトーシス時のDNA分解はCADによってのみ担われていることを示している。ところで、アポトーシスにおける染色体DNAの切断はショウジョウハエでも見出される反応である。私達はこれまでにショウジョウハエからCAD、ICAD遺伝子を単離し、これらは哺乳動物のCAD、ICADに対応していることを生化学的に示した。今回、ハエICAD遺伝子の近傍に存在するP-element をトランスポゼースを用いて移動させることにより(local hop)、P-element をICAD遺伝子内に持つハエを樹立した。このハエではICADがシャペロンとしてCADの発現に必要であることに一致して、ICADたんぱく質ばかりでなくCADたんぱく質も全く発現されていなかった。野生型ハエの胚を紫外線で照射すると数多くの細胞にアポトーシスが誘導されTUNEL 陽性となる。一方、ICAD欠損ハエの胚に紫外線を照射してもTUNEL陽性細胞は一切、産生されなかった。この結果はショウジョウハエにおいてもアポトーシス時に死細胞内でDNA断片化を引き起こす酵素はCADであることを示している。

3. アポトーシス細胞のDNA分解におけるDNase IIの役割

アポトーシス細胞は生体においてマクロファージによって速やかに貪食される。私達はこれまでにアポトーシス細胞のDNAは死細胞のDNaseばかりでなく、死細胞がマクロファージによって貪食された後、マクロファージ内のDNaseによっても分解される可能性を指摘した（参考論文3）。そのことを検討するため、アポトーシスを起こしたマウス胸腺細胞をマウス胚肝臓や胸腺から調製したマクロファージに貪食させ、死細胞の核DNAの分解を追跡した。その結果、野生型マクロファージ内では貪食されたアポトーシス細胞のDNAは速やかに分解されるのに対し、DNase II欠損マクロファージ内では長時間にわたってそのDNAが残存した。また、CAD、DNase II両遺伝子を欠損するマウスではその胚発生過程において胸腺などの臓器に大量の未分解DNAを持つマクロファージが認められた。以上の結果は発生過程でおこるアポトーシス細胞のDNAはマクロファージリソソームに存在するDNase IIによっても分解されることを示している。

一方、ショウジョウハエの遺伝子データベースにマウスやヒトDNase IIと類似性をもつ遺伝子を見出した。この遺伝子をCOS細胞で発現させることにより、この分子が哺乳動物のDNase IIと同じように酸性で活性を持つDNaseであることを確認した。ついで、Drosophila Stock Center に保管されているハエの変異体の中からDrosophila DNase II遺伝子の変異体を見出し、この変異体ではDNase IIたんぱく質の中央部で点変異が導入され、その酵素活性を失っていることを明らかにした。ショウジョウハエの卵・発生過程では16細胞期に1個の細胞のみが卵として生存し、残りの細胞はナース細胞とし

て作用し、その後死滅する。DNase II遺伝子に変異を持つハエの卵巣には未分解のDNAの蓄積が認められた。このことは、卵の発生過程で無用となり死滅したナース細胞は周りの卵胞細胞によって貪食され、その細胞が持つDNase IIによって分解されることを示している。

4. アポトーシス時の分解を免れたDNAによる自然免疫の活性化

CAD、DNase II遺伝子を欠損したマウスではその胸腺の発達が顕著に遅れ、その大きさや細胞数は野生型マウスの約10分の1であった。タイプIインターフェロン(α や β)を新生マウスに注射すると胸腺の発達を阻害することが知られている。そこで、CAD、DNase II欠損マウスにおける種々のサイトカインの発現をReal-time PCRを用いて検討した。その結果、インターフェロン β 遺伝子の発現がDNase II欠損マウスでは野生型マウスに較べ約10倍、CAD、DNase II両遺伝子を欠損したマウスでは約100倍増強していた。以上の結果はアポトーシス時に分解を免れたDNAがマクロファージを介して自然免疫を活性化し、これがインターフェロン β 遺伝子の活性化へと導き、産生された大量のインターフェロン β が胸腺の発生障害をもたらしたことを示唆している。ところで、ショウジョハエでは自然免疫は抗細菌ペプチド、抗カビペプチド遺伝子の活性化として体现される。ICAD、DNase II遺伝子を欠損するショウジョハエよりRNAを調製してこれら遺伝子の活性化を検討したところ、抗細菌ペプチドであるDiptericinやAttacin遺伝子の構成的活性化が認められた。このことはショウジョハエにおいてもアポトーシス時における分解を免れたDNAが自然免疫を活性化することを示している。

5. 結論

アポトーシス時のDNA分解は1980年に見出され、アポトーシスのマーカーとして広く用いられている。しかし、この分解を起こす酵素、DNA分解の生理的意義など長い間不明であった。私達は1998年カスパーゼによって活性化されるDnase (CAD)を同定し、この酵素がアポトーシス時のDNA分解を担っていると提唱した。しかし、いまだにこの過程への他のDNaseの関与も報告されている。今回、CAD遺伝子を欠損したマウスを樹立し、CAD欠損細胞ではアポトーシス時にDNA分解が起こらないことを示したことは、この論争に終止符を打つものと考えられる。

ところで、CADを欠損しているためDNA分解の起こらない細胞でもアポトーシス刺激により細胞は死滅する。このことは、DNAの分解は細胞死に必須の過程ではないことを示している。また、CAD欠損マウスは発生異常を示さず、生体内でのCADの生理作用は不明であった。今回、CADとDNase II両遺伝子を欠損するマウスやハエを樹立し、アポトーシス時のDNA分解はCADとDNase IIによって担われていることを証明した。そして、そのマウスやハエの解析からアポトーシス時にDNAが分解されないと自然免疫を活性化するという全く意外な結果が得られた。このことはアポトーシス時のDNA分解が動物の恒常性を保持するために大変重要な過程であることを示している。さらにこの結果は、アポトーシス時にDNAが分解されないと免疫系が破綻することを示しており、今後自己免疫疾患との関係など検討する必要がある。

参考論文

1. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95-99.
2. Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., and Xue, D. (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* *412*, 90-94.
3. 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 Dev.* *14*, 549-558.

3. 研究実施体制

研究グループ名：長田グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目
長田 重一	阪大・生命	教授	総括
福永理己郎	阪大・生命	助教授	アポトーシスのシグナル伝達
田中 正人	阪大・医	助教授	アポトーシス細胞の貪食
竹田 潤二	阪大・医	教授	CAD, ICADの変異マウス
佐子山 豊彦	阪大・医	助手	ショウジョウバエのCAD, ICAD
松村 博隆	阪大・医	研究員	ネクロトーシスの分子機構
川根 公樹	阪大・医	大学院生	DNaseIIの変異マウス
向江 直美	阪大・医	大学院生	ショウジョウバエのCAD, ICAD
三輪 桂子	阪大・医	技術員	アポトーシス細胞の貪食
福永 理恵	阪大・医	技術員	アポトーシスのシグナル伝達
青山 佐知	阪大・医	研究チーム 事務員	事務補助
藤井麻紀子	阪大・医	研究チーム 事務員	事務補助
瀬戸百合子	阪大・医	研究補助員 (時給制)	研究補助
原山 雅子	阪大・医	研究補助員 (時給制)	研究補助

研究グループ名：森川グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目
森川 耿右	生物分子 工学研究所	部長	CAD, ICADの三次構造解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S.: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* *417*, 182-187, 2002.
- Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., and Nagata, S.: Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. *Genes & Develop.* *16*, 2662-2671, 2002.
- Sakahira, H., and 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.
- Nagata, S. Breakdown of chromosomal DNA. *Cornea* *21*, S2-S6, 2002.
- Koike, H., Horie, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Nagata, S., and Takeda, J.: Efficient biallelic mutagenesis with Cre/loxP-mediated inter-chromosomal recombination. *EMBO Rep* *3*, 433-437, 2002.
- Shimizu, M., Fukuo, K., Nagata, S., Suhara, T., Okuro, M., Fujii, K., Higashino, Y., Mogi, M., Hatanaka, Y., and 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.
- Takakuwa, T., Dong, Z., Nakatsuka, S., Kojya, S., Harabuchi, Y., Yang, W. I., Nagata, S., and Aozasa, K. Frequent mutations of Fas gene in nasal NK/T cell lymphoma. *Oncogene* *21*, 4702-4705, 2002.
- Takayama, H., Takakuwa, T., Tsujimoto, Y., Tani, Y., Nonomura, N., Okuyama, A., Nagata, S., and Aozasa, K.: Frequent Fas gene mutations in testicular germ cell tumors. *Am. J. Pathol.* *161*, 635-641, 2002.
- Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Iida, T., Okada, K., and Nagata, S.: Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nature Immunol* *4*, 138-144, 2003.

- Ogawa, H., Murayama, A., Nagata, S., and Fukunaga, R. Regulation of myeloid zinc finger protein 2A (MZF-2A) transactivation activity through phosphorylation by MAP kinases. *J. Biol. Chem.* *278*, 2921-2927, 2003.
- Nagase, H., Fukuyama, H., Tanaka, M., Kawane, K., and Nagata, S.: Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation. *Cell Death & Differ.* *10*, 142-143, 2003.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., and Fukuyama, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differ.* *10*, 108-116, 2003.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：2件）