

長田 重一

京都大学大学院医学研究科・教授

アポトーシス細胞の貪食・分解とその異常

§1. 研究実施体制

(1) 「長田」グループ

- ① 研究代表者: 長田 重一 (京都大学大学院医学研究科・教授)
- ② 研究項目
・アポトーシス細胞の貪食・分解とその異常

§2. 研究実施内容

(1) TMEM16 ファミリーのリン脂質スクランブラーゼ活性

細胞膜のリン脂質は非対称的に分布されている。すなわち、フォスファチジルセリン (PS) やフォスファチジルエタノールアミン (PE) は内側に、フォスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリンは細胞の外側に位置している。この非対称性は細胞がアポトーシスに陥った場合、血小板が活性化された場合などに崩れ、PSは細胞外に暴露される。暴露されたPSは貪食細胞への“eat me”シグナル、血液凝固因子への補酵素として作用する。私達は一昨年度、血小板が活性化された際、リン脂質をスクランブルさせる膜蛋白質 TMEM16F を単離した (Suzuki et al., Nature 468, 834-838, 2010)。本年度はこの遺伝子のコンデショナルノックアウトマウスを作製し、その胎仔胸腺から細胞株を樹立した。この細胞は Ca^{2+} ionophore 刺激で PS を速やかに暴露したが、TMEM16F を欠損させるとその活性は完全に失われた (図1A)。一方、Fas リガンドによってアポトーシスを誘導した際におこる PS の暴露は TMEM16F が欠損しても正常におこった (図1B)。このことはアポトーシスと活性化血小板での PS の暴露は異なる分子によって担われていることを示している。ところで TMEM16F は 10 個のメンバーからなるそれぞれのメンバーを TMEM16F 欠損細胞に導入した形質転換細胞を樹立し、 Ca^{2+} に応答した脂質スクランブラーゼ活性を検討した。その結果、TMEM16F 以外に 16C、16D、16G、16J にスクランブラーゼ活性が認められた。これら分子は発現細胞が異なり、それぞれ独自の生理作用を持つと考えられる (Suzuki et al., J.

Biol. Chem., in press).

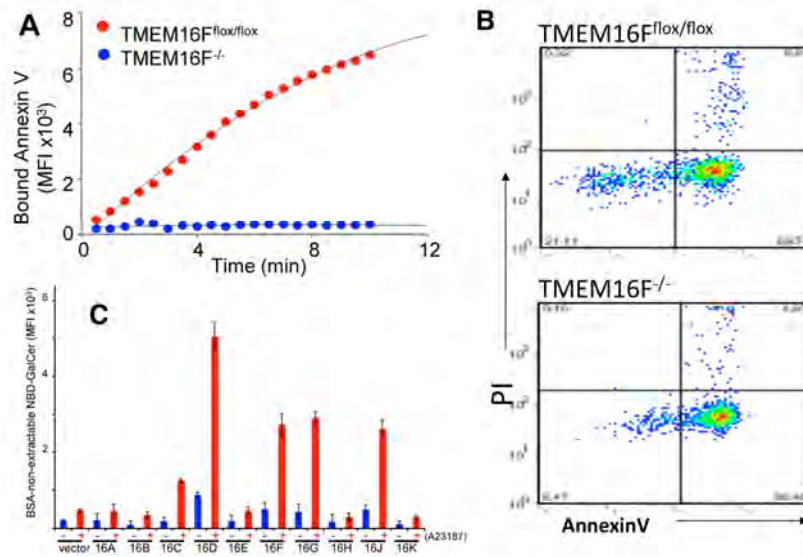


図1 TMEM16F および TMEM16 ファミリーのリン脂質スクランブラーゼ活性。マウス胎胸腺より樹立した野生型 (TMEM16F^{flox/flox})、ノックアウト細胞 (TMEM16F^{-/-}) を Ca²⁺イオノフォア (A)あるいは Fas リガンド(B) で処理し、PS の暴露を FACS で解析した。また、TMEM16F^{-/-}細胞に TMEM16 メンバーを導入し、蛍光リン脂質の取り込み能を解析した(C)。

(2)ミトコンドリア経路に依存しないアポトーシス。

私達はこれまでに胎仔胸腺細胞のスタウロスポリンによる細胞死は Apaf-1 に依存しないことを報告した (Nagasaka et al., Cell Death Differ. 17, 931-941, 2010)。今回、この細胞死の分子機構を詳細に解析するため、野生型、Apaf-1, caspase 9, Bax/Bak ノックアウトマウス胎仔胸腺より細胞株を樹立した。その結果、エトポシド、スタウロスポリンは野生型細胞にカスパーゼを活性化し、アポトーシスを引き起こした (図2A, 2C)。一方、Apaf-1、カスパーゼ9、Bax/Bak が欠損する細胞ではエトポシドに対するアポトーシスはおこらなかったが、スタウロスポリンはカスパーゼを活性化させ、細胞死を誘導した (図2A, 2C)。この際、野生型、Apaf-1 欠損細胞ではミトコンドリアからチトクローム C の遊離がおこったが、Bax/Bak 欠損細胞ではチトクローム C の遊離は観察されなかった (図2B)。(Imao et al., Cell Death Differ. 20, 343-352, 2013)。この細胞死はカスパーゼ8にも依存しないことからミトコンドリア、Death Receptor が関与しない第3のアポトーシス経路の存在が示唆された。

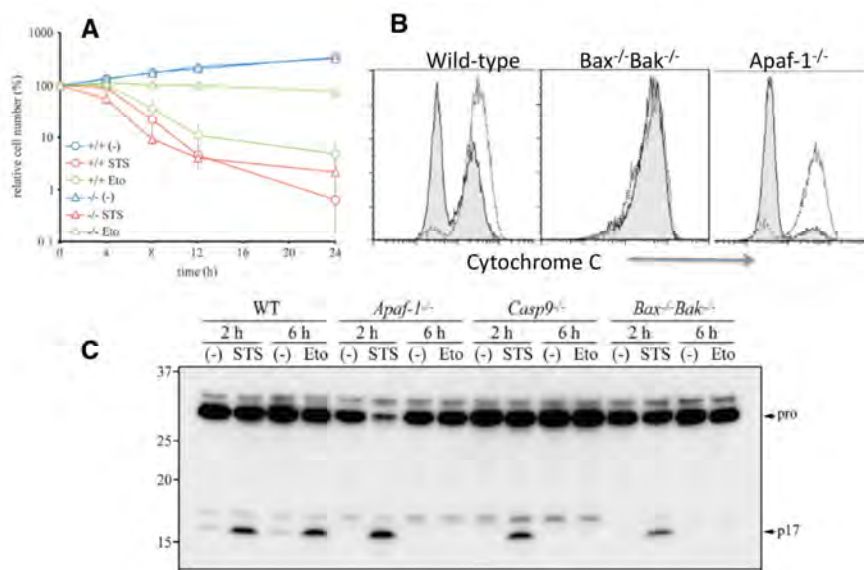


図2 ミトコンドリア経路に依存しないアポトーシス

A. 野生型、Apaf-1^{-/-} 細胞を 50 μ M エトポシド、10 μ M スタウロスポリンで示された時間刺激し、生存している細胞数をトリパン・ブルー染色により決定した。B. wild-type Apaf-1^{-/-}, Bax/Bak^{-/-} 細胞を 10 μ M スタウロスポリンで処理した後、ジギトニンで処理、チトクローム C 量を抗チトクローム C 抗体を用いて染色した。C, wild-type Apaf-1^{-/-}, caspase 9^{-/-} Bax/Bak^{-/-} 細胞を 50 μ M エトポシドで6時間、10 μ M スタウロスポリンで2時間処理した後、細胞抽出液を抗カスパーゼ3抗体を用いた Western Blotting 法により解析した。

(3) EYA スレオニン脱リン酸化酵素が DNA による自然免疫を活性化

私達は以前、EYA (eyes absent)と呼ばれる分子がチロシンフォスファターゼ活性を C-末端部に、スレオニンフォスファターゼ活性を N-末端部に持つ分子であり、そのスレオニンフォスファターゼ活性が DNA による自然免疫の活性化に関与していることを報告した(Okabe et al. Nature 460, 520, 2009)。EYA は元来、ショウショハエで見いだされた分子である。そこでショウショハエの自然免疫に EYA が関与しているかどうか検討した。まず、DNase II 遺伝子を欠損したショウショハエは抗菌ペプチドを強く発現した。この発現は Eya 遺伝子のハプロ不全変異、あるいはその発現のノックダウンにより顕著に減少した。一方、ショウショハエ EYA 蛋白質を 293T 細胞を用いて産生、精製し、この分子もチロシンフォスファターゼ活性を C-末端部に、スレオニンフォスファターゼ活性を N-末端部に持つ分子であることを確認した。次いで、チロシンフォスファターゼ活性あるいはスレオニンフォスファターゼ活性を失った変異体の自然免疫への影響を検討したところ、マウス EYA と同じようにそのスレオニンフォスファターゼ活性が DNA による抗菌ペプチドの活性化に関与していることを見いだした。以上の結果は DNA による自然免疫の活性化への EYA フォスファターゼの関与が普遍的な進化的に良く保存された過程であることを示している。(Liu, et al. PLoS One 8, e59148, 2012)。

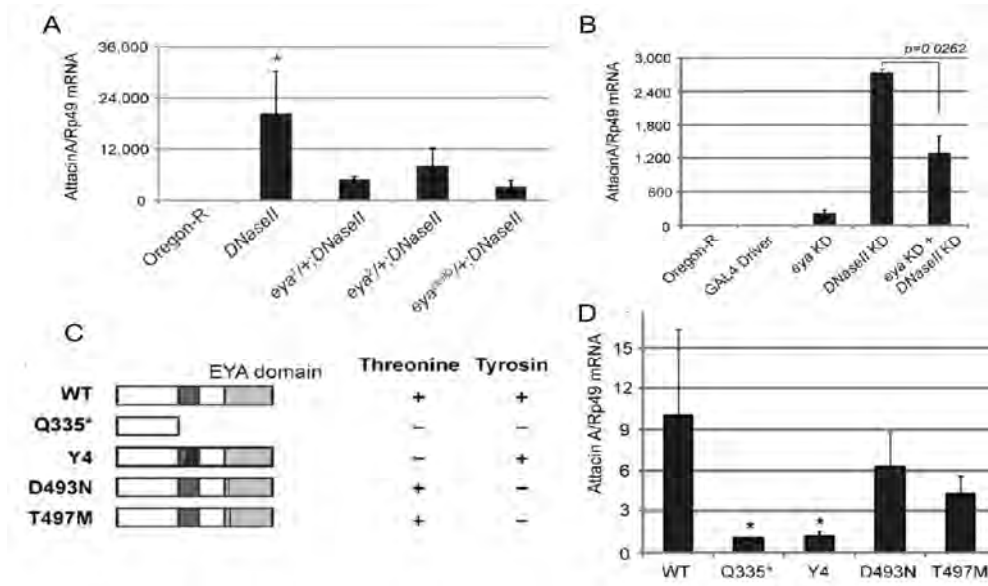


図3 未分解 DNA による抗菌ペプチド Attacin 遺伝子の発現と EYA の効果。

A, DNase II-null ショウショハエにおける attacin 遺伝子の発現と、それに対するハプロ不全 EYA 遺伝子の効果。Attacin mRNA 量は Real-time PCR により検定した。B, DNaseII 遺伝子、EYA 遺伝子を dsRNA を用いてノックダウンし、attacin mRNA レベルを RT-PCR によって検定した。C, 野生型、Q335*、Y4、D493N、T497M 変異ショウショハエ EYA の組み替え体を作成、スレオニン、チロシンフォスファターゼ活性を検定した。D, DNase II-null, EYA ヘテロ不全ハエに野生型、Q335*、Y4、D493N、T497M 変異 EYA を導入 attacin mRNA を検定した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Nakahashi-Oda, C., Tahara-Hanaoka, S., Shoji, M., Okoshi, Y., Nakano-Yokomizo, T., Ohkohchi, N., Yasui, T., Kikutani, H., Honda, S., Shibuya, K., Nagata, S. and Shibuya, A.: Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. **J Exp. Med.**, 209: 1493-1503, 2012 (doi: 10.1084/jem.20120096)
2. Miyanishi, M. Segawa, K. and Nagata, S.: Synergistic effect of *Tim4* and *MFG-E8* null mutations on the development of autoimmunity. **Int Immunol.**, 24: 551-559, 2012 (doi:10.1093/intimm/dxs064)
3. Liu, X., Sano, T., Guan, Y., Nagata, S. Hoffmann, JA. and Fukuyama, H.: *Drosophila* EYA Regulates the Immune Response against DNA through an Evolutionarily Conserved Threonine Phosphatase Motif. **PLoS One**, 7: e42725, 2012 (doi: 10.1371/journal.pone.0042725)
4. Imao, T. and Nagata, S.: Apaf-1- and Caspase-8-independent apoptosis. **Cell Death Differ**, 20: 343-352, 2013 (doi: 10.1038/cdd.2012.149)
5. Ohkouchi, S., Shibata, M., Sasaki, M., Koike, M., Safig, P., Peters, C., Nagata, S., and Uchiyama, Y.: Biogenesis and Proteolytic Processing of Lysosomal DNase II. **PLoS One** 8: e59148 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0059148)
6. Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiya, H., Nagata, S. and Suda, T.: Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently

engulfed by macrophages. **Int Immunol.**, in press, 2013 (doi: 10.1093/intimm/dxs161)

7. Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., and Nagata, S.: Calcium-dependent Phospholipid Scramblase Activity of TMEM16 Family Members. **J. Biol. Chem.**, in press, 2013 (doi: 10.1074/jbc.M113.457937)