

## 論文内容の要旨

論文題目 「 Studies on a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent Endonuclease DNase  $\gamma$ : Molecular Characterization of a Novel DNase I-like DNase and its Role in Apoptotic DNA Fragmentation 」

( 新規な DNase I 様エンドヌクレアーゼ DNase の性状検討及びアポトーシスにおける機能解析 )

氏名 塩川 大介

アポトーシスは遺伝子によりプログラムされた細胞自死機構であり、細胞膜微絨毛の消失、アポトーシス小体形成、DNA 断片化などの特徴により定義される。特にヌクレオソーム単位での DNA 断片化はアポトーシスの判定手法として広く用いられており、現在では CAD、endonuclease G、DNase などのアポトーシスエンドヌクレアーゼにより触媒されることが明らかとなっている。本論文においては、アポトーシスエンドヌクレアーゼの一つである DNase の性状及びアポトーシスへの関与を明らかとした一連の研究成果について述べる。

ラット脾臓より完全精製された DNase は分子量 33kDa の単量体酵素であり、中性 pH 条件下、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  もしくは  $\text{Mn}^{2+}$  依存的に DNA 分解を触媒し、その活性は  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  などの 2 価重金属イオンにより阻害された。精製 DNase タンパクの N 末端及び内部部分アミノ酸配列を決定、得られた情報に基づきラット、ヒト、及びマウス DNase cDNA を単離した。予想されるアミノ酸配列の比較により、DNase は DNase I ファミリーの新たなメンバーであることが明らかとなった。DNase 遺伝子発現には明確な組織特異性があり、ラット DNase mRNA は、脾臓、リンパ節、胸腺、肝臓などの組織で高レベルに検出された。グルタチオン S 転スフェラーゼ融合組み替えタンパクの解析により、DNase は N 末端プリカーサーペプチドの切断により活性型酵素へと変換されることが示された。HeLaS3 細胞に外来

導入したDNase はアポトーシスの誘導に伴い活性化され、ヌクレオソーム単位でのDNA断片化を触媒した。以上の結果より、DNase はDNaseIファミリーに属する新規なアポトーシスエンドヌクレアーゼであることが示された。

DNaseIファミリーDNaseは、現在DNaseI、DNaseX、DNase、DNAS1L2の四種が知られている。しかしそれらの酵素活性、機能については不明な点が多く、DNaseにおいて見いだされたアポトーシスエンドヌクレアーゼ活性がDNase特異的であるかについても不明である。これらの疑問に答えるためDNaseIファミリーDNaseそれぞれに関し、酵素性状及びアポトーシスへの関与について検討を行った。

すべてのDNaseIファミリーDNaseはCa<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>依存性エンドヌクレアーゼであり、3'-OH/5'-P型のDNA切断を触媒した。DNaseI、DNaseX、およびDNaseの至適pHは中性であったが、DNAS1L2の最大活性は酸性pH条件下で観察された。これら4種のDNaseは、これまでDNase特異的阻害剤と考えられていたZn<sup>2+</sup>には同様の感受性を示したが、G-アクチン、オウリントリカルボン酸による活性阻害においてはそれぞれユニークな特性を示すことが明らかとなった。さらにDNaseIファミリーDNaseのアポトーシスへの関与を調べたところ、当該DNase群においてDNaseのみがアポトーシスエンドヌクレアーゼとして機能することが明らかとなった。

DNaseの活性化機構を理解するためクラゲ蛍光タンパクで標識した組み替えDNaseを用いDNaseのアポトーシスに伴う局在変化を調べた。DNaseは通常小胞体および核膜に局在しておりアポトーシスの誘導に伴い核内へ移行することが明らかとなった。この核移行にはDNaseに存在する2つの核移行シグナル、特にC末端塩基性領域が重要であることを見いだした。以上の結果より、DNaseのアポトーシスに伴う活性化機構の本体は小胞体/核膜からの放出及び2つの核移行シグナルに依存した核移行であることが明らかとなった。

上述の研究成果により、DNaseの性状及びアポトーシスエンドヌクレアーゼとしての機能が明らかとなった。しかし、DNaseが実際どのような細胞のどの様

なアポトーシスにおいて DNA 断片化を触媒するかは不明であった。

マウス筋芽細胞C2C12は筋管細胞への分化過程におけるアポトーシスの良いモデル系として広く用いられている。興味深いことに未分化C2C12細胞のアポトーシスに於いてはDNAラダー形成が観察されないが、分化誘導後に起こるアポトーシスは顕著なDNA断片化を伴うことが知られていた。しかし、この分化依存的DNA断片化のメカニズムは長らく不明であった。当該アポトーシス系に着目しさまざまなアポトーシスエンドヌクレアーゼの遺伝子発現変化を調べたところ、DNase が筋芽細胞分化に伴い発現誘導されることを見いだした。筋芽細胞に於けるDNA断片化の有無がDNase の発現レベルにより決定される可能性について調べるため、未分化C2C12細胞にDNase を強制発現させた後スタウロスポリン処理によりアポトーシスの誘導を行った。興味深いことにDNase と同じファミリーに属するCa<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>依存性エンドヌクレアーゼであるDNaseXを導入した細胞ではDNA断片化は観察されなかったが、DNase を発現した細胞に於いては顕著なDNAラダーの出現が見られた。すなわちDNase は筋芽細胞においてアポトーシスエンドヌクレアーゼとして働くことが示された。さらに筋芽細胞の分化誘導アポトーシスに於けるDNase の関与を示すため、DNase アンチセンスRNA発現ベクターを安定導入し、内在DNase レベルを抑制した細胞株を樹立し、アポトーシスのDNA断片化におよぼす影響について解析を行った。コントロール細胞、DNase アンチセンス細胞ともに筋管細胞への分化は正常に行われたが、その過程で出現するアポトーシス細胞に於けるDNAラダーは、内在DNase 発現レベルの低下に伴い強く抑制された。以上の結果よりDNase の働く生理的局面として筋芽細胞分化に伴うアポトーシスが示された。

上述の発見により、分化過程にある細胞ではDNase 依存的な通常とは異なるアポトーシス経路が存在するのではないかという着想に至った。筋芽細胞分化系において明らかとなったDNase を介するアポトーシス経路の普遍性について明らかとするため、特に神経細胞分化に伴うアポトーシスに着目し実験を行った。

神経細胞分化に伴うアポトーシス DNase の発現変化をマウス神経芽細胞 N1E-115 を用いて検討した。細胞周期を進行する未分化細胞では CAD 発現が認められるが、静止期にある分化細胞では CAD は消失し DNase が発現誘導されることを見いだした。分化状態の異なる神経細胞アポトーシスに於ける CAD, DNase の役割を明らかとするため、それぞれの活性化を Caspase-3 切断部位に変異を導入した ICAD 変異体、及び DNase アンチセンス RNA 発現ベクターを用いて抑制し、アポトーシスに伴う DNA 断片化に及ぼす影響を解析したところ、未分化細胞の薬剤誘導アポトーシスに於いては CAD が、分化過程に於ける自発的アポトーシスに於いては DNase がそれぞれ DNA 断片化を触媒することが明らかとなった。さらに PC12 細胞を用い同様の実験を行い、神経分化細胞の NGF 除去によるアポトーシスに於いても DNase が DNA 断片化に必須であることを示した。

近年の研究により分化過程にある細胞は Akt や NF- $\kappa$ B の活性化により、ミトコンドリアを経由し、caspase-9、caspase-3、そして CAD の活性化へと続くシグナル伝達経路（アポトーシス主経路）が阻害され、一時的にアポトーシス耐性を獲得することが明らかとなってきた。このアポトーシス主経路の阻害は、細胞が不安定な分化過程を乗り越えるために必須であると理解されているが、同時に多くの細胞がその分化過程においてアポトーシスにより死ぬのも事実である。本研究の成果は、アポトーシス主経路が抑制された状態にある分化中の細胞は DNase を経由する新規なアポトーシス経路を準備し、当該経路により分化に失敗した細胞、余剰な細胞の速やかな除去を遂行する可能性を示唆している。