

大阪大学大学院 生命機能研究科 教授

**長田 重一**

「アポトーシスにおけるゲノム構造変化の分子機構」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

## 1. 研究実施の概要

### (1) 研究の背景と目的

生体の発生過程では数多くの不要な細胞、害となる細胞が生成される。これらの細胞は発生の過程で速やかに除去される。また成体においてもその恒常性を維持するため老化した細胞は速やかに除去され、新しい細胞と置き換わる。一方、ウイルスに感染した細胞、がん化した細胞はリンパ球などの白血球細胞に攻撃され体内から除かれる。このように生体内では毎日、数億の細胞が死滅する。この細胞死はアポトーシスと呼ばれている<sup>1</sup>。アポトーシスでは、核や細胞質が凝縮するとともにその染色体DNAがヌクレオソーム単位に切断される。そして、この細胞はマクロファージや樹状細胞によってすみやかに貪食・処理される。この現象は30年以上前に Kerr, Wyllieらによって見出された現象であるが、この過程を誘起する分子機構、その生理作用などは長い間不明であった。

私たちは、1990年代初め、ある種のサイトカイン（Fasリガンド）が“death factor”としてその特異的受容体に結合しアポトーシスを誘導することを見出し、この系の異常が、細胞の異常増殖、がん、自己免疫疾患、組織の破壊などさまざまな疾患へと導くことを明らかにした<sup>2</sup>。ついで、Fasリガンドによるアポトーシスのシグナル伝達機構の解析から、この過程にはカスパーゼと呼ばれるたんぱく質分解酵素が必須であることを示した<sup>3</sup>。さらに、このカスパーゼの下流にカスパーゼによって活性化される DNase が存在することを見出し、これを CAD (caspase-activated DNase) と命名するとともに、CADならびにその阻害たんぱく質（ICAD, inhibitor of CAD）の精製、遺伝子の単離に成功した<sup>4,5</sup>。本研究はこのような背景のもとに、アポトーシスの最終段階で作用するDNase CAD, およびその inhibitor, ICADの活性化機構、作用機構を、生化学的、分子生物学的に解析するとともにその三次構造を明らかにすることを目的とした。また、アポトーシスにおける染色体DNA切断の意義をCADやICADを欠損したマウスを用いて解析する、また、ショウジョウバエのCAD, ICAD homologを単離し、CAD, ICADの生理作用をバエの遺伝学を用いて解析することを目的とした。

### 参考文献

1. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
2. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
3. Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W. & Nagata, S. Sequential activation of

- ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **380**, 723-726 (1996).
4. Enari, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
  5. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99 (1998).

## (2) 研究の成果と考察

本研究の結果、(1) ICADはCADがリボソーム上での合成途上に結合し、hsp(heat shock protein)70, hsp40と呼ばれるシャペロンたんぱく質とともに、CADの折り畳みを促進することを明らかにした。また、CADはヒスチジン残基を活性部位に持つ中性DNaseであることを証明した。(2) NMRを用いてCADとICADのN-末端に存在する約80アミノ酸の領域の三次構造を決定し、これらの構造は類似していること、これらはお互いに相互作用しあうことを示した。(3) CAD遺伝子を欠損したマウスを樹立し、CADがアポトーシス時に作用する唯一のDNaseであることを証明した。しかし、DNAの切断が起こらなくても細胞は死滅し、DNA分解が細胞をアポトーシスに陥らせるための必須の反応ではないことも明らかとした。(4) アポトーシス細胞のDNAは、死細胞がマクロファージに貪食された後マクロファージに存在するDNase IIによっても分解されること、CAD、DNase II両遺伝子を欠損するマウスでは自然免疫が活性化され、臓器の発生障害がおこることを示した。(5) ショウジョハエよりCAD、ICAD遺伝子を単離し、アポトーシス時のDNA分解の分子機構は哺乳動物とよく保存されていることを示した。そして、ICAD、DNase II欠損ショウジョハエを樹立し、この変異体では抗細菌ペプチド遺伝子の発現が強く誘導されていることを示した。(6) アポトーシス細胞のDNAがマクロファージによって貪食された後分解されることを利用して、貪食の定量系を確立し、貪食に関与する因子を同定した。(7) 赤血球の分化過程で脱核された核はマクロファージによって貪食された後、DNase IIによって分解されることを示した。また、目のレンズ細胞の分化過程で核DNAの分解に関与する酵素を同定し、この酵素が作用しないとマウスは白内障に陥ることを示した。

以上、CAD、ICADの作用機構、生理作用の解析に関して、研究は順調に進捗した。特に、アポトーシス時に分解を免れた染色体DNAが自然免疫を活性化するという結果は予期せぬ結果であった。今後は、アポトーシス時に分解を免れたDNAによる自然免疫の活性化を確認するとともに、自己免疫疾患などとの関わりを解析する必要

がある。また、アポトーシス細胞のDNA分解に関与している酵素 (DNase II) が赤血球の脱核にも関与しているという結果や、レンズ細胞での脱核に関与している特異的DNaseを同定できたことは大きな成果である。今後は、これらDNaseの作用機構を詳細に検討する必要がある。一方、CAD欠損細胞のDNAもマクロファージに貪食された後、分解されるという結果は、マクロファージによるアポトーシス細胞貪食の系のAssay系の開発へと繋がり、これにより、貪食に関与する新しい因子が同定できたことも大きな成果である。今後はこの因子の生体内での作用、貪食の詳細な分子機構を解析する予定である。

#### 本研究による主要な発表論文

1. Nagata, S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genetics* **33**, 29-55 (1999).
2. McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K.-i., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes & Develop.* **14**, 549-558 (2000).
3. Otomo, T., Sakahira, H., Uegaki, K., Nagata, S. & Yamazaki, T. Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nature Struct. Biol.* **7**, 658-662 (2000).
4. 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).
5. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182-187 (2002).
6. Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y. & Nagata, S. Activation of the innate immunity in Drosophila by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. *Genes & Develop* **16**, 2662-2671 (2002).
7. 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).
8. Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Iida, T., Okada, K. & Nagata, S. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat. Immunol.* **4**, 138-144 (2003).
9. Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y. & Nagata, S. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* **424**, 1071-1074 (2003).

#### 国際会議での主要な招待講演 ( Keynote Address, Plenary Lectures )

1. June 7, 1999, Apoptosis, **Plenary Lecture**, IFCC-WorldLab, Firenze, Italy
2. November 14, 1999, DNA fragmentation in apoptosis, **Keynote Address**, The Seventh-ECDO-ESH European Conference on Apoptosis, Ein Gedi, Israel

3. January 21, 2000, T cell and target cell death, **Keynote Address**, Keystone Symposia, Santa Fe, New Mexico, USA
4. October 30, 2000, Apoptosis, **Plenary Lecture**, 11<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Sydney, Australia
5. October 5, 2001, DNA fragmentation in apoptosis, Karolinska Institute Nobel Conference on Apoptosis-Mechanisms and Implications for Human Disease, Stockholm, Sweden
6. July 6, 2002, DNA Degradation during apoptosis and erythropoiesis, **Plenary Lecture**, 31<sup>st</sup> Annual Meeting “International Society for Experimental Haematology”, Montreal, Canada
7. February 8, 2003, Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis and Phagocytosis, **Keynote Address**, Keystone Symposia on Cell Biology “Molecular Mechanisms of Apoptosis”, Banff, Canada

## 2. 研究構想

生体の恒常性は細胞の増殖・分化ばかりでなく、その死によっても制御されている。すなわち、動物の発生過程では数多くの不要な細胞、害となる細胞が生成される。これらの細胞は発生の過程で速やかに除去される。また成体においても老化した細胞は速やかに除去され、新しい細胞と置き換わる。一方、ウイルスに感染した細胞、がん化した細胞はリンパ球などの白血球細胞に攻撃され体内から除去される<sup>1</sup>。このように生体内では毎日、数億の細胞が死滅する。1970年代、Wyllieらは生体内で死につつある細胞の顕微鏡観察から、細胞は大きく2通りの過程を経て死滅すること認め、これをアポトーシス、ネクローシスと命名した<sup>2</sup>。アポトーシスでは、細胞、およびその核が凝縮、断片化しながら死滅し、速やかに周りの貪食細胞にとりこまれる。すなわち、この過程では死滅する細胞からその内容物が放出されることはなく、クリーンな細胞死であり、生理的な細胞死と考えられる。これに対して、ネクローシスでは細胞は膨潤、破裂し、その内容物が放出され、炎症を引き起こすと考えられている。一方、線虫 (*C. elegans*) の発生過程においても一定の細胞が一定の時期に死滅することが Sulston らによって示され、細胞の死は動物の個体発生にプログラムされていると結論された (programmed cell death)<sup>3</sup>。そして、線虫のプログラム細胞死もアポトーシスの形態変化を経ることから、線虫と哺乳動物の細胞死には共通の機構が存在すると考えられた。このような状況の下で1990年代前半より、アポトーシスに関与する分子の同定、その作用機構、そして、アポトーシスの生理作用に関する研究が国内外の研究者により活発に進められた。

私たちは、1990年代初め、ある種のサイトカイン (Fasリガンド) が “death factor” としてその特異的受容体に結合しアポトーシスを誘導することを見出し、この系の異常が、細胞の異常増殖、がん、自己免疫疾患、組織の破壊などさまざまな疾患へと導くことを明らかにした<sup>4-9</sup>。この間、Horvitzらは線虫でのプログラム細胞死にはCed-3遺伝子が必要であること<sup>10</sup>、この遺伝子はカスパーゼ (caspase, 当時、interleukin-1 converting enzyme (ICE) と呼ばれた) と呼ばれるヒトのタンパク質分解酵素と類似していることを報告した<sup>11</sup>。私達はFasリガンドによるアポトーシスにも、カスパーゼの活性化が必須であることを示し、線虫と哺乳動物細胞のアポトーシスの分子機構が本質的に同一であることを示した<sup>12-14</sup>。ところで、アポトーシスでは染色体DNAがヌクレオソーム単位に分解される<sup>15</sup>。私達はFas リガンドで活性化した細胞から調製した抽出液を用

いて、無細胞系でのDNA断片化の再現に成功し<sup>16</sup>、カスパーゼによって活性化されるDNase (CAD, caspase-activated DNase) が存在することを見出した<sup>17</sup>。CADは増殖している細胞内ではその阻害たんぱく質 (ICAD, inhibitor of CAD) と複合体を形成している。ところが細胞にアポトーシスが誘導されると、カスパーゼがICADを2箇所切断し、その結果、ICADはCADに対する親和性を失い、自由になったCADがDNAを切断すると考えられた<sup>18</sup>。

本研究はこのような背景のもとに、アポトーシスの最終段階で作用する CAD, およびそのinhibitorの活性化機構、作用機構を、生化学的、分子生物学的に解析することを目的とした。また、アポトーシスにおける染色体DNA切断の意義をCADやICAD遺伝子を欠損したマウスや、カスパーゼに抵抗性を持つICADの変異体のトランスジェニックマウスを用いて解析する、また、ショウジョハエのCAD, ICAD homolog を単離し、CAD, ICADの生理作用をハエの遺伝学を用いて解析することも目的とした。CAD、ICADの構造は、当初、生物分子工学研究所の森川耿右部長と共同で、X-線結晶解析で決定することを予定した。しかし、X-線解析に適切な結晶を得ることができず、大阪大学・蛋白質研究所・山崎俊夫助教授とNMRを用いて構造解析することとした。CAD、ICADの作用機構、生理作用に関しては研究代表者長田重一のグループが担当した。CAD、ICADの作用機構は当初の予定通り進捗し、約3年でこの課題の研究を終えた。一方、生理作用に関してはアポトーシス細胞のDNA分解が死細胞内で作用するCADばかりでなく、マクロファージのDNase IIによっても担われているという意外な展開を見せ<sup>19</sup>、CAD遺伝子欠損マウスばかりでなく、DNase II遺伝子欠損マウスの構築にも取り掛かることとなった。そして、このことが赤血球の脱核、目レンズ細胞の脱核という新しい研究へ発展することとなった。また、アポトーシス細胞の貪食機構の解析は当初予定していなかったが、CAD欠損細胞のDNAはマクロファージが死細胞を貪食した後、分解されることを見出し、このことを利用した貪食のassay系を着想したことが貪食機構の研究につながった。

#### 参考論文

1. Jacobson, M.D., Weil, M. & Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354 (1997).
2. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
3. Hedgecock, E.M., Sulston, J.E. & Thomson, J.N. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **220**, 1277-1279 (1983).
4. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243 (1991).

5. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169-1178 (1993).
6. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-317 (1992).
7. Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T. & Nagata, S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-976 (1994).
8. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. & Nagata, S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806-809 (1993).
9. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456 (1995).
10. Ellis, H.M. & Horvitz, H. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829 (1986).
11. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652 (1993).
12. Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* **375**, 78-81 (1995).
13. Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W. & Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **380**, 723-726 (1996).
14. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
15. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556 (1980).
16. Enari, M., Hase, A. & Nagata, S. Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J.* **14**, 5201-5208 (1995).
17. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, H., Iwamatsu, A. & Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
18. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99 (1998).
19. McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev.* **14**, 549-58 (2000).

### 3 . 研究成果

#### (1) 研究内容および成果

##### 3.1 . CAD、ICAD の作用機構

アポトーシスではその染色体DNAがヌクレオソーム単位に切断される。私達はこの過程を媒介する分子として、1998年CAD (caspase-activated DNase)とその阻害タンパク質 (ICAD、inhibitor of CAD) を同定した(図1)。健康な細胞ではCADはICADと複合体を形成しており、DNase活性は発揮されない。アポトーシスの刺激が加わるとカスパーゼが活性化され、これがICADを特異的に切断不活し、自由になったCADが染色体DNAを切断する。本研究では、このモデルの正当性を確認するために、CAD、ICADの作用機構を詳細に解析した。

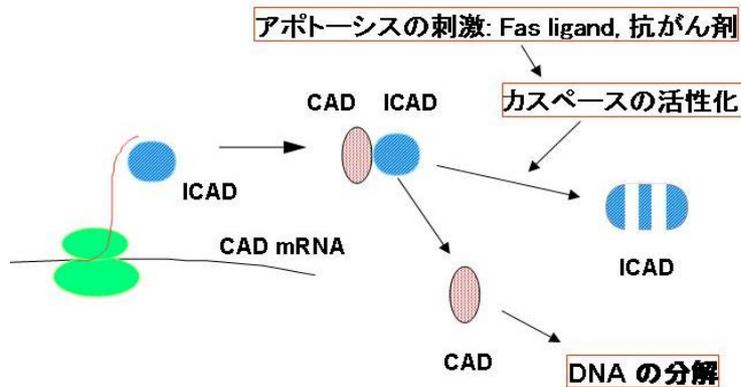


図1 CAD(caspase-activated DNase)によるアポトーシス時のDNA分解

#### CAD、ICAD 遺伝子の構造

マウスやヒトのCAD は、分子量4万の塩基性たんぱく質である。一方、酸性蛋白質であるICAD にはalternative splicing によってICAD-LとICAD-S 2種類のたんぱく質 (分子量4万5千と3万5千) が産生される。ICAD遺伝子は6個のエクソンから成り立つが、ICAD-L はこのすべてのエクソンを含む。一方、ICAD-S は最後のイントロン(イントロン 5) で転写が終結し、エクソン6を含まない。ICAD 遺伝子は脾臓、リンパ節、胸腺など、リンパ球系の細胞で顕著に発現しているが、心臓や肝臓ではあまり発現していない。ICAD-LとICAD-Sの発現比はICAD を発現しているほとんどの細胞でほぼ1:1であった。一方、CAD 遺伝子は7個のエクソンからなり、その構造、特にエクソン1, 2はICAD遺伝子の構造とよく相似していた。また、CADの種々

の組織での発現パターンはICAD の発現パターンとよく一致していた。さらに、CAD、ICAD遺伝子はヒトでは1番目(1p36)、マウスでは4番目の染色体上に隣接して存在しており、CAD、ICAD遺伝子が共に進化してきたことをうかがわせる。

#### 発表論文

1. Kawane, K., Fukuyama, H., Adachi, M., Sakahira, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. & Nagata, S. Structure and promoter analysis of murine CAD and ICAD genes. *Cell Death & Differ.* **6**, 745-752 (1999).
2. Sugimoto, N., Fukuda, Y., Saito-Ohara, F., Kamiyama, R., Nakagawara, A., Mukae, N., Nagata, S. & Inazawa, J. The human caspase-activated DNase (CAD) gene: genomic structure, exonic single-nucleotide polymorphisms, and a highly polymorphic dinucleotide repeat at the CAD locus. *J. Hum. Genet.* **44**, 408-411 (1999).

#### ICADの機能

ICAD-LはCAD と複合体を形成するが、ICAD-S はCAD と複合体を形成せず、ホモ2量体として細胞内に存在する。ICAD-L, ICAD-Sの組み替え体はCADに結合し、そのDNase活性を同等に抑制した。CAD たんぱく質を動物細胞や大腸菌で発現させるとほとんどすべてのたんぱく質がaggregate ととして回収され、このタンパク質にはDNase活性は存在しない。一方、ICAD-L をCAD と共に動物細胞、蚕細胞、大腸菌で発現させるとCAD はICAD-L との複合体として可溶分画に回収された。このような活性はICAD-Sでは認められず、ICAD-L が特異的にCADのシャペロンとして作用し、その正確な折り畳みを促進すると結論した。そこで、大腸菌を用いてCADたんぱく質を産生しこれをinclusion bodies として回収した。この蛋白質をグアニジン塩酸により可溶化した後、ICAD-Lの存在下でrefoldingさせるとCAD蛋白質がICAD-Lとの複合体として回収された。この際、reticulocyte lysateおよびATPが必須であった。以上の結果は、CADは細胞内ではICAD-Lとのみ複合体を形成しているという結果と一致する。

Reticulocyte lysate にはATPに依存したシャペロンとして、Hsc70/Hsp40系とTriCが独立に存在する。抗Hsc70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Hsc70, Hsp40はICAD-Lの存在下、用量依存的にCADをrenaturation した(図2)。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/CIDE domain) は自らrenaturationし、その部分にICAD-Lが結合した。一方、reticulocyt

e 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/CIDE domainが合成された段階でICAD-LはCADのnascent polypeptide に結合すること、CADのC-末端にはhsc40, hsp70が結合することを示した。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-L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。

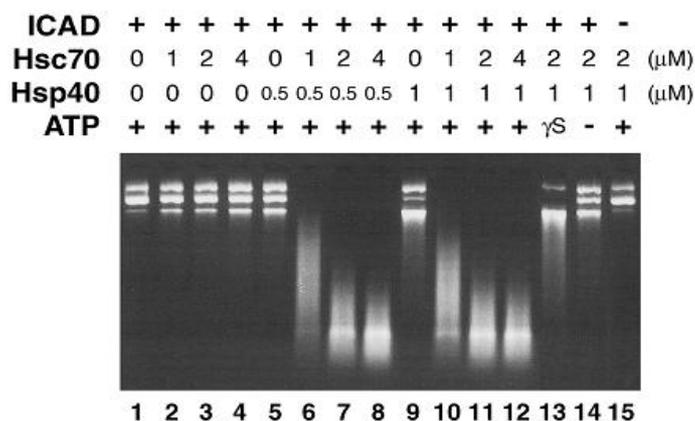


図2 ICAD、hsc70、hsp40によるCADのrefolding.

CADを Guanidinium 塩酸でdenature した後、ICAD、hsc70、hsp40、およびATPを含むbuffer で希釈しDNaseの活性を測定した。

以上の結果はICAD-L がCADの発現に必須でありCADの発現をタンパク質合成の段階で調節していることを示している。このことは以下に述べるICAD遺伝子の欠損マウスやショウジョハエでも確認された。すなわち、ICADを発現しない細胞では、CAD mRNAは発現しているがそのたんぱく質は全く認められなかった。この際、ICAD-Lを強制発現するとCADの発現が復活した。

一方、CAD遺伝子を欠損した細胞では、ICAD-Lのたんぱく質が顕著に減少しており、CADを強制的に発現させるとICAD-Lの発現が昂進した。この結果は、CADがICAD-Lの発現を制御していることを示している。ICAD-LはCADとは異なり、それ単独で活性あるたんぱく質として合成される。おそらく、CADと複合体を形成しているICAD-Lは複合体を形成していないICADより安定であることを示唆している。CADとは複合体を形成していないICAD-SがCADの発現量によって左右されないこともこのことをサポートしており、CAD、ICADが転写後、巧妙にお互いの発現を制御しあっていることを示している。

## 発表論文

1. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L and ICAD-S. *J. Biol. Chem.* **274**, 15740-15744 (1999).
2. Sakahira, H., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* **275**, 8091-8096 (2000).
3. 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).
4. Nagase, H., Fukuyama, H., Tanaka, M., Kawane, K. & Nagata, S. Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation. *Cell Death & Differ.* **10**, 142-143 (2003).

## CADの作用機構

Baculovirusの発現ベクター、蚕Sf-9細胞系を用いて、組み替えCADたんぱく質をICADとの複合体として大量に発現した。このたんぱく質をCAD・ICADの複合体として精製・純化した後、ヒトカスパーゼ3を作用させてICADからCADを分離し、CADを単一たんぱく質としてさらに精製純化した。このたんぱく質はMgの存在下、中性の条件下でDNAを効率よく分解した（30分の間に1モルのCADあたり300モルのDNA末端を形成）。CADにはRNAを分解する能力はなく、またDNAのATに富む領域をGCに富む領域よりより効率よく切断した。アポトーシス時に起こるDNA分解ではDNAが3'-OH、5'-phosphate として分解される。このDNAはterminal transferaseの基質となることから、terminal transferaseを用いたDNAのラベリング（TUNEL, Terminal transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling）が、in situでのアポトーシス細胞の標識化に広く用いられている。CADはDNAを3'OH 基を持つ断片へと分解し、このこともCADがアポトーシスにおけるDNA切断を担う酵素であることを強く支持している。

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（diethylbicarbonate）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（図3）。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と結論した。一方、ICADによるCADの活性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

とも示した。

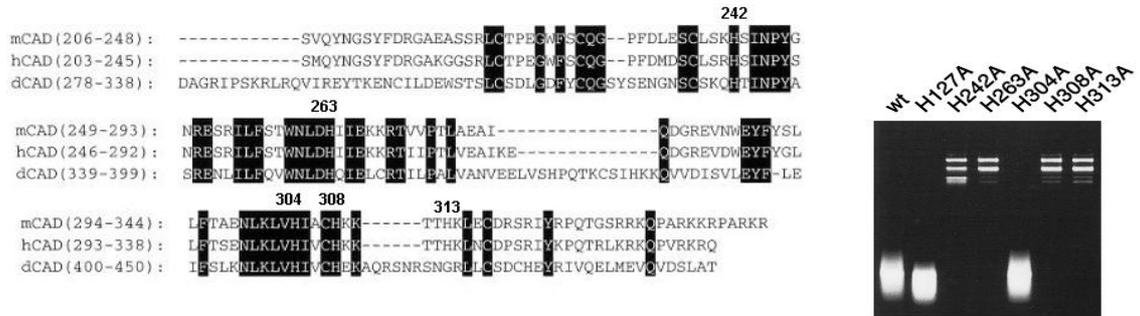


図3 CADに保存されたヒスチジン残基とその変異体のDNase活性  
 Mouse (m), human (h), およびDrosophila (d) CADのC-末端、DNase活性部位の  
 アミノ酸配列。保存されたヒスチジン残基をアラニンに置換した後、そのDNase  
 活性を測定し、右図に示した。

### 発表論文

1. 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).

### 3.2. CAD、ICADたんぱく質の立体構造

CADのようにヒスチジン残基を活性部位に持つヌクレアーゼにはDNase I、S1 ヌクレアーゼを含め数種類のヌクレアーゼが知られている。しかし、CADのアミノ酸配列はこれらヌクレアーゼと顕著な類似性を示さない。それでは、CADの三次構造はこれらヌクレアーゼの構造と類似しているのであろうか。CADのC-末端には核移行シグナルが存在する。このシグナルはICAD・CAD複合体ではマスクされているのだろうか。このような疑問に答えるため、私達はCAD、CAD・ICAD複合体の三次構造を解析しようと試みた。生物分子工学研究所森川部長と共同で進めることを計画したX-線での結晶解析に関してはCAD、CAD・ICAD複合体の大量調製には成功したが、その結晶化に成功せず頓挫している。

そこで、NMRを用いて溶液中でのCAD、ICADの三次構造の決定を試みた。まづ、CAD、ICADにはそのN-末端領域に約80アミノ酸からなる1次配列上相同性の高い領域(CAD/CIDE domain)が存在する。この領域を大腸菌で発現精製し、その構造を決定した。その結果、CAD、ICADのこの領域は三次構造上もお互いに類似していること、この領域は、1個の $\alpha$ -helixと5個の $\beta$ -sheetsからなり、ユビキチンスーパーフォールドと呼ばれるコンパクトな立体構造を持っていることが明らかになった。ところで、CAD、ICADのCIDE/CAD領域はお互いに相互作用し、複合体を形成する。

この複合体の構造もNMRを用いて明らかにした(図4)。その構造から、これら分子の表面に存在する親水性アミノ酸残基(CADでは塩基性アミノ酸(リジン)、ICADでは酸性アミノ酸残基(アスパラギン酸))がCAD、ICADの相互作用に関与していると予想された。実際、これら親水性のアミノ酸に変異を導入すると、CAD、ICADの相互作用は顕著に抑制された。さらに、これら酸性アミノ酸に点変異を持つICADはCADに対するシャペロン活性がなくなり、reticulocyte lysateでのCADタンパク質の合成をサポートすることができなかった。また、この塩基性残基に変異を持つCADはDNase活性を失っていた。以上の結果から、CADがリボソーム上で合成されている際、最初の80アミノ酸、CAD/CIDE領域が合成された段階で、ICADはCADのnascent peptideに結合し、CADたんぱく質のfoldingをサポートするという私達のモデルを支持している。

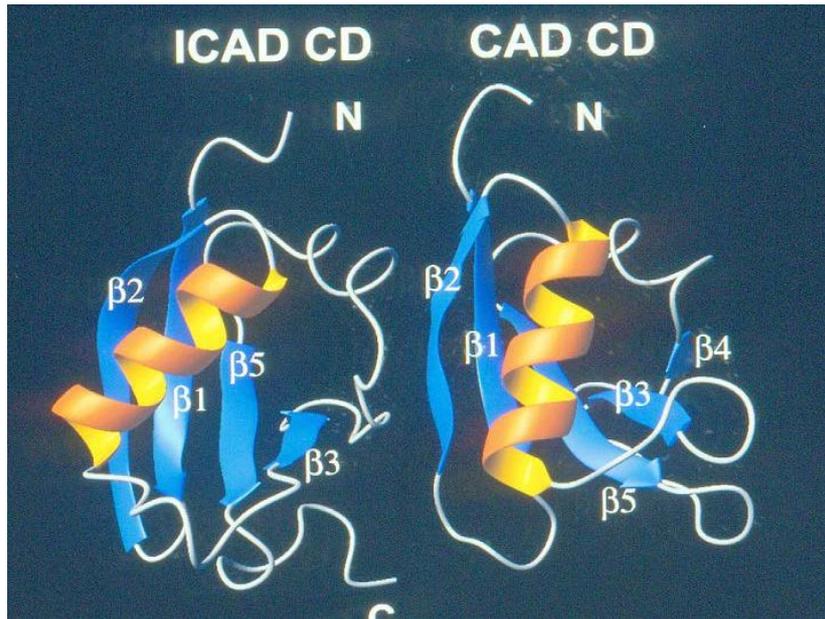


図4 CADとICADのN-末端に存在するCAD領域の複合体の三次構造

#### 発表論文

1. Uegaki, K., Otomo, T., Sakahira, H., Shimizu, M., Yumoto, N., Kyogoku, Y., Nagata, S. & Yamazaki, T. Structure of the CAD domain of caspase-activated DNase and interaction with the CAD domain of its inhibitor. *J. Mol. Biol.* **297**, 1121-1128 (2000).
2. Otomo, T., Sakahira, H., Uegaki, K., Nagata, S. & Yamazaki, T. Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nature Struct. Biol.* **7**, 658-662 (2000).

### 3.3 . ほ乳動物でのアポトーシスにおけるDNA切断

私達はCADがアポトーシス細胞で活性化されそのDNAを切断する酵素として同定した。一方、アポトーシス細胞のDNA切断を担う分子としてはCAD以外に、ミトコンドリアから遊離されるendonuclease G、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 依存DNaseであるDNase I、DNase IIに類似したDNase  $\gamma$  などが提唱されている。一方、アポトーシス時のDNA分解は一般的に知られているヌクレオソーム単位へ分解される前に50K-100Kb の大きさにまず分解されることが知られており、この分解にはヌクレオソーム単位への分解を担う酵素とは違う酵素が関与していると報告されている。そこで、私達はCADシステムが動かなくなった細胞、マウスやハエの個体を作成し、CADのアポトーシスにおけるDNA分解への寄与、アポトーシス時のDNA分解の生理作用を解析した。

#### 発表論文

1. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 12-18 (2000).
2. Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. & Fukuyama, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differ.* **10**, 108-116 (2003).

#### CADを介したアポトーシス時のDNA分解

まず、種々の方法でCADが作用できなくなった細胞を構築した。すなわち、カスパーゼ認識配列に変異を導入し、カスパーゼによって切断できなくなったICADを種々のヒト細胞株に導入した。この細胞を抗がん剤、Fasリガンド、 $\gamma$ 線照射、増殖因子の除去などのアポトーシス刺激で処理するとカスパーゼは細胞内で活性化されていた。しかし、50-100kbの大きなサイズへの染色体DNAの分解、ヌクレオソーム単位へのDNA分解はどちらも認められなかった。ついで、CADが作用しなくなるマウスを3通りの方法で樹立した。まず、カスパーゼ抵抗性ICADをコードするcDNAをヒトelongation factor 1 $\alpha$  遺伝子のプロモーターの下流に挿入し、これを用いてトランスジェニックマウスを作成した。ヒトelongation factor 1 $\alpha$  プロモーターはほとんどすべての細胞で普遍的に作用するプロモーターと考えられており、実際、作成したトランスジェニックマウスでは種々の組織で内在性ICADと同等のレベルでトランスジーンを発現していた。ついで、ICAD遺伝子あるいはCAD遺伝子を欠損したマウスを樹立した。ICAD遺伝子を欠損した場合、CAD蛋白質は正常な蛋白質としては合成されず (3.1の項参照)、CAD遺伝子欠損マウスと同等の症状を示すはずである。実際、マウスCADに対するモノクローナル抗体を作成し、CAD蛋白質の発現

を検討したところ、ICAD遺伝子欠損マウスからの細胞ではCADの発現は全く認められなかった。

ついで、ICADトランスジェニックマウス、ICAD欠損マウス、CAD欠損マウスの胸腺、脾臓、肝臓から細胞を調製し、Fas リガンド、抗がん剤、 $\gamma$  線照射などによりアポトーシスを誘導した。すると、どのようなアポトーシス刺激を用いても、またどの細胞でもDNAの切断は観察されず (図5)、アポトーシス時に死細胞内でDNAを分解するDNaseはCADのみと結論した。このことはミトコンドリアから遊離したendonuclease Gが染色体DNAを分解するという、Wongらの結果と全く異なるものである。

CAD欠損マウスから樹立した線維芽細胞株 (mouse embryonal fibroblasts) にCAD遺伝子を導入する、あるいはICAD欠損マウスからの細胞にICAD遺伝子を導入するとアポトーシス時のDNA断片化は再び認められたことからCADがこの反応を担っていることが確認された。

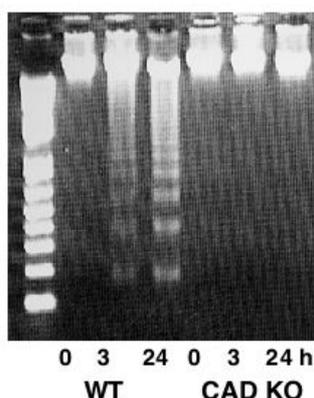


図5 アポトーシスにおけるCAD依存のDNA切断

野生型 (WT) あるいはCADノックアウトマウスの脾臓細胞をFasリガンドで処理することによりアポトーシスを誘導し、その染色体DNAを電気泳動により解析した。

ヌクレオソームは核内ではクロマチンとして凝縮し、凝縮したクロマチンはDNAとしては50-100kb間隔でnuclear scaffoldと呼ばれる足場の部分に接着している。このDNA部分はATに富むことから、CADはまず、nuclear scaffoldに接着したATに富む部分のDNAを切断し50-100kbのDNA断片を形成すると考えられる。これによって、ヌクレオソームは遊離され、CADがヌクレオソームとヌクレオソームの間のDNAを切断、180bpを単位としたDNAラダーを産生すると考えられる。

アポトーシス時には染色体DNAの分解と共にクロマチンが凝縮・断片化される。CADが作用できない細胞ではクロマチンの断片化は阻害されていたが、クロマチン

の凝縮は野生型の細胞とほぼ同等に誘導された。このことはクロマチンの凝縮はDNA断片化とは独立の反応であることを示唆している。

#### 発表論文

1. Sakahira, H., Enari, M., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S. Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr. Biol.* **9**, 543-546 (1999).
2. McIlroy, D., Sakahira, H., Talanian, R.V. & Nagata, S. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* **18**, 4401-4408 (1999).

### アポトーシス時のDNA分解と細胞死

染色体DNAが切断されると細胞は増殖することはできない。このことから、アポトーシス時のDNA分解が細胞を死へと誘導する機構と考えられた。実際、活性のあるCAD蛋白質を細胞に注入すると (microinjection)、細胞は速やかに死滅する。一方、CADを欠損し、DNA分解が起こらない細胞でもアポトーシスは野生型細胞と同等の効率で誘導された(図6)。このことはDNA分解が細胞死に必須の機構ではないことを示している。

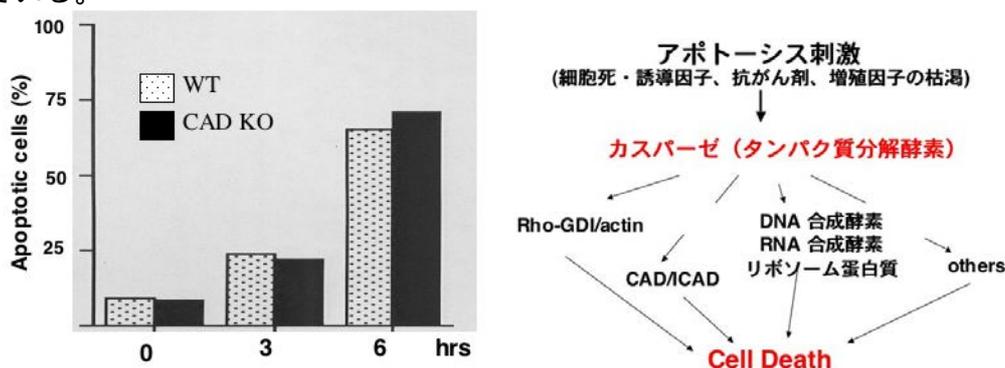


図6 DNAの分解と細胞死

左の図では野生型、CADノックアウトマウスからの脾臓細胞をFas リガンドで刺激、示された時間後に細胞死を測定した。右図ではアポトーシス刺激と細胞死の関係を模式化した。

カスパーゼの基質として、ICAD以外に100種類を超える蛋白質、酵素が同定されている。細胞骨格蛋白質、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、リボソーム蛋白質もカスパーゼの基質である。このどれがカスパーゼによって切断、不活化されても細胞は生存できないと考えられる。このことは、カスパーゼが一旦活性化されれば、細胞を死へと誘導する方法は多数存在することを示している。

## DNase IIによるマクロファージでのアポトーシス細胞DNAの分解

生体内でのアポトーシス細胞のDNA分解はTUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling) 反応で識別可能である。In vitro ではアポトーシス時のDNA分解が起こらないICAD遺伝子欠損マウスやICADトランスジェニックマウスにおけるアポトーシス、DNA分解をTUNEL法で検討すると、胸腺や卵巣、脳などアポトーシスが盛んに起こっている組織では野生型マウスと同等の頻度でTUNEL陽性の細胞が見出された(図7)。この陽性の細胞ではカスパーゼ3の活性化(活性型カスパーゼ3のみを認識する抗体で染色)が認められ、細胞はアポトーシスを起こした後、そのDNAがCAD非依存的に分解されていることを示唆した。

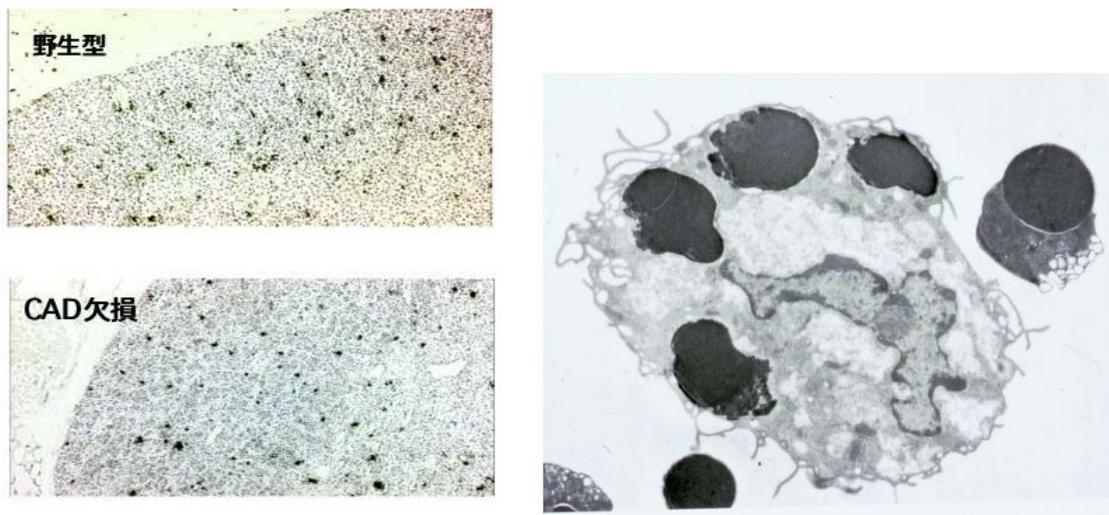


図7 生体内でのCAD欠損アポトーシス細胞のマクロファージによる貪食  
左の図は8週令のマウス胸腺をTUNELによって染色した。右図はCAD欠損マウス胸腺で観察されたTUNEL陽性部分を電子顕微鏡で観察した。

この結果は生体内 (in vivo) ではin vitro とは異なり、CAD以外の酵素がアポトーシス細胞のDNAを分解しうることを示している。そこで、胸腺でアポトーシスを起こしている細胞を電子顕微鏡で観察した。その結果、アポトーシスを起こしている細胞は大きな細胞に取り込まれていた。この細胞はマクロファージであることがマクロファージ表面抗原F4/80で染色することにより確認された。この結果はCADの欠損により、染色体DNAが分解されていなくてもマクロファージはアポトーシス細胞を貪食することを示している。このことを確認するため、マウスに $\gamma$ 線を照射し、胸腺細胞にアポトーシスを誘導した。すると、数多くのTUNEL陽性細胞がマ

クロファージの中ばかりでなく、その外に見いだされた。一方、CAD欠損マウスに $\gamma$ 線を照射するとTUNEL陽性胸腺細胞はF4/80陽性マクロファージの中にのみ認められた。以上の結果は、CAD遺伝子が欠損しているとアポトーシス細胞は自らではそのDNAを分解できないが、マクロファージに貪食された後分解されるという機構を支持している。実際、CAD欠損細胞にアポトーシスを誘導した後、マクロファージに*in vitro*で貪食させるとアポトーシス細胞のDNAは2?3時間以内に分解された。

マクロファージに貪食されたアポトーシス細胞はそのリソソームに輸送されると考えられる。リソソームにはDNase IIと呼ばれる酸性で活性を持つDNaseが存在する。DNase IIがマクロファージでのアポトーシス細胞DNA切断に関与していることを確認するため、DNase II遺伝子を欠損するマウスを樹立した。このマウスは胎生致死であった。そこで、胎生期15日目の肝臓よりマクロファージを調製し、アポトーシス細胞を貪食させた。アポトーシス細胞としては野生型、あるいはCAD欠損マウスからの胸腺細胞を用いた。DNase欠損マクロファージは野生型マクロファージと同様にアポトーシス細胞を貪食したが、その核DNAは3時間経過後もマクロファージ内に残存した(図8)。特に、CAD欠損胸腺細胞の核はほぼ完全な形でマクロファージ内に残存した。以上の結果から、アポトーシス細胞のDNAは死細胞内でCADによって分解されるばかりでなく、死細胞がマクロファージによって貪食された後に、そのリソソームでDNase IIによっても分解されることを示している。死細胞内で活性化されたCADはヌクレオソームがその形態を保持している段階で作用し、DNAをヌクレオソーム単位までしか分解できないのに対し、マクロファージ、リソソーム内ではヌクレオソームのタンパク質は分解されDNAはDNase IIによりヌクレオチドにまで分解・遊離され、再利用されると考えられる。線虫ではアポトーシス細胞のDNAを分解する酵素はNuc-1と呼ばれる遺伝子によってコードされている。この遺伝子はHorvitzらによって単離され、ほ乳動物のDNase IIと相似性を持つことが報告された。このことも、マクロファージに存在するDNase IIがアポトーシス細胞のDNAを分解するという本研究代表者らの結果と一致する。

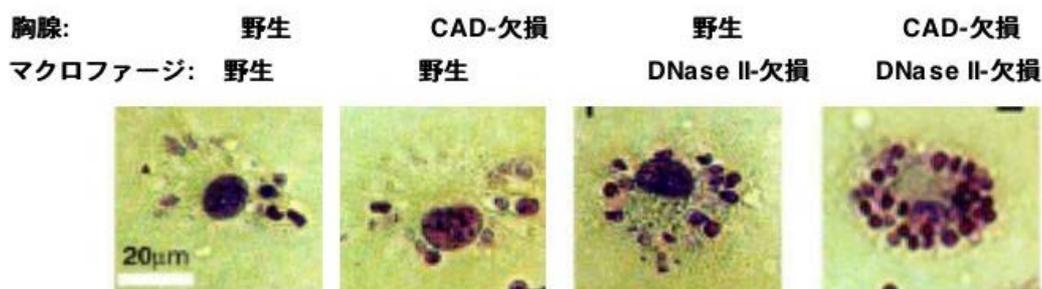


図8 死細胞でのCAD、マクロファージでのDNase IIによる死細胞核の分解

野生型あるいはCAD欠損胸腺細胞にアポトーシスを誘導し、野生型、あるいはDNase II欠損マクロファージに添加、3時間後に細胞をFeulgenで染色した。

#### 発表論文

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

#### アポトーシス細胞でのDNA分解の生理作用

CAD欠損マウスは正常に発生し、繁殖能力もあり、また野生型マウスと同程度の寿命を持つ。この原因として、上記述べたようにアポトーシス細胞のDNAは生体内ではCADとDNase IIの2通りの機構で分解されるからと考えられた。このことを確認するためにCADとDNase II両遺伝子を欠損したマウスを樹立した。DNase II遺伝子単独の欠損マウスが胎生致死であるのと同様にこのマウスも胎生後期(E 18.5)に死滅した。このマウスは貧血症状を示す以外は外見上大きな異常は認められなかった。一方、胸腺の発達は野生型マウスに比べ顕著に阻害されており、E14.5日目の胎児胸腺細胞の数は野生型マウスの15%にまで減少していた。FACSによる解析から、このマウスの胸腺細胞の発生は、pro T 段階でとまっていた。一方、胸腺の組織切片をDNAの染色試薬DAPIで染色すると異常なDNA染色像が胸腺全体に認められた(図9)。この切片を電子顕微鏡で観察すると、数多くの未分解核をリソソーム内保持しているマクロファージが認められた。マクロファージに存在する“核”はまだ凝縮しているもの、すでに膨潤しているものが認められた。この膨潤しているマクロファージのリソソーム“核”の中には数多くの繊維状の分子が認められ、CAD、DNase II遺伝子が存在しないとアポトーシス細胞のDNAがほぼ完全な形でマクロファージリソソームに蓄積すると結論した。このような未分解DNAを保持したマクロファージは胸腺ばかりでなく、脳、腎臓、指間など発生過程でアポトーシスが盛んな臓

器で数多く観察され、アポトーシス細胞のDNA分解の機構は各組織間で普遍的と結論した。一方、DNase II遺伝子を単独で欠損するマウス胸腺でも未分解のDNAを蓄積するマクロファージが認められたが、このDNAは断片化されていた。このことは、CADの作用によってヌクレオーム単位へ切断されたDNAがマクロファージに蓄積していることを示している。

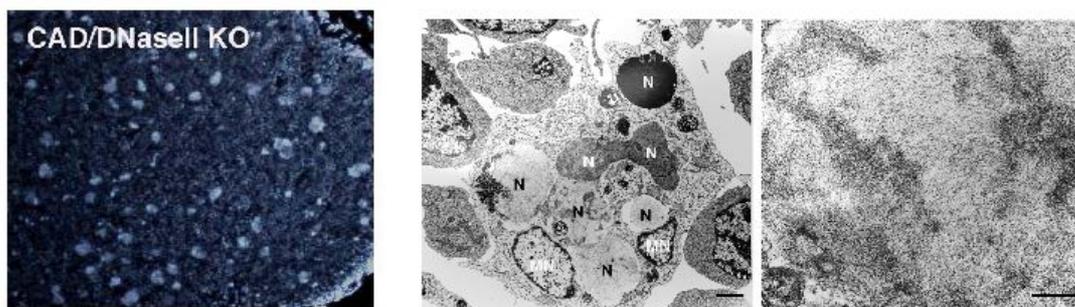


図9 生体内マクロファージでのDNAの蓄積

CAD、DNase II両遺伝子を欠損した胎生16日目マウス胸腺から切片を調製しDAPIで染色した（左図）。中央と右のパネルはCAD、DNase II欠損マウス胸腺で見られるDNAを蓄積した細胞を電子顕微鏡で観察した。図の中のバーは0.5  $\mu\text{m}$ .

それでは、マクロファージでのDNAの蓄積がなぜ、胸腺の発生障害をもたらしたのであろうか。細菌のDNAがマクロファージに作用すると自然免疫を活性化し、インターフェロン遺伝子の発現を誘導するという報告や、インターフェロンをマウスに投与すると胸腺の発生障害を引き起こすなどのこれまでの報告から、インターフェロンがCAD、DNase II遺伝子欠損マウスで産生され、これがこのマウスでの胸腺発生障害に関与している可能性が考えられた。このことを確認するため、野生型、CAD遺伝子欠損、DNase II遺伝子欠損、CAD、DNase II両者の遺伝子を欠損するマウス胸腺から、RNAを調製し、Real-Time PCR法を用いて、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、およびTNF mRNAを比較定量した。表1に示したように、インターフェロン $\alpha$ 遺伝子は胎児胸腺では殆ど発現しておらず、CAD、DNase II遺伝子の欠損マウスにおいてもその発現誘導は認められなかった。一方、インターフェロン $\beta$ 遺伝子の発現も野生型マウスやCAD遺伝子欠損胸腺では認められないが、DNase II遺伝子欠損マウスでは約10倍、CAD、DNase II両者の遺伝子を欠損するマウス胸腺では約100倍近くその遺伝子発現が昂進していた。インターフェロン $\gamma$ 遺伝子もDNase II遺伝子欠損マウスでは数倍活性化されていたが、この活性化はCAD、DNase II両者の欠損によってそれほど増加していなかった。以上の結果から、マクロファージに蓄積したアポト

ーシス細胞からのDNAはインターフェロンβ遺伝子の活性化として自然免疫を誘導し、このサイトカインが胸腺などの発生阻害をもたらしたと結論した。

<b>Genotypes</b>	<b>IFN<math>\alpha</math></b>	<b>IFN<math>\beta</math></b>	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>TNF</b>
<b>Wild</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>
<b>CAD<sup>-/-</sup></b>	<b>0.5</b>	<b>1.9</b>	<b>1.0</b>	<b>1.2</b>
<b>DNase II<sup>-/-</sup></b>	<b>0.9</b>	<b>8.1</b>	<b>8.7</b>	<b>2.9</b>
<b>CAD<sup>-/-</sup> DNase II<sup>-/-</sup></b>	<b>0.5</b>	<b>86.3</b>	<b>11.8</b>	<b>3.6</b>

表 1 アポトーシス時のDNAを分解できないマウスにおける自然免疫の活性化

#### 発表論文

1. Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Iida, T., Okada, K. & Nagata, S. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat. Immunol.* **4**, 138-144 (2003).

### 3.4. ショウジョハエにおけるアポトーシス細胞のDNA分解

上記述べたようにアポトーシスは線虫からほ乳動物にいたるまで観察され、その分子機構もよく保存されている。特に、染色体DNAの分解はハエや線虫のプログラム細胞死でも見られる現象である。そこで、アポトーシス細胞でのDNA分解の機構、その生理作用がショウジョハエでも保存されているかどうかを確認する目的で、ショウジョハエより、CAD、ICAD遺伝子を同定した。すなわち、ショウジョハエの細胞株 (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。ショウジョハエのCAD、ICADはアミノ酸配列上、ヒトやマウスなどの哺乳動物のたんぱく質と約20%の相同性を示した。特に、N-末端のCAD/CIDE領域、CADの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。また、ショウジョハエではCADの活性化のためにICADばかりでなくCADもカスパーゼによって切断される必要があった。ショウジョハエの神経細胞株 (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。この際CAD、ICADが切断されることを抗ショウジョハエCAD、ICAD抗体を用いて確認した。さらに、カスパーゼに抵抗性のICADを発現しているBG-2細胞ではH-8での処理により細胞は死滅したが、DNAの切断は起こらなかった。

アポトーシス時のDNA切断の生理的意義をショウジョハエで解析するために、ICAD遺伝子を欠損するハエを構築した。すなわち、ICAD遺伝子の近傍約60kb下流に存在するトランスポゾンP-element をトランスポゼースを用いて移動させることを3度繰り返し(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 mRNA、タンパク質は発現されていなかった。一方、CAD mRNAは正常に発現していたが、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、CADたんぱく質は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胚表面の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、認められなかった(図10)。この結果はショウジョ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のみであることを示している。

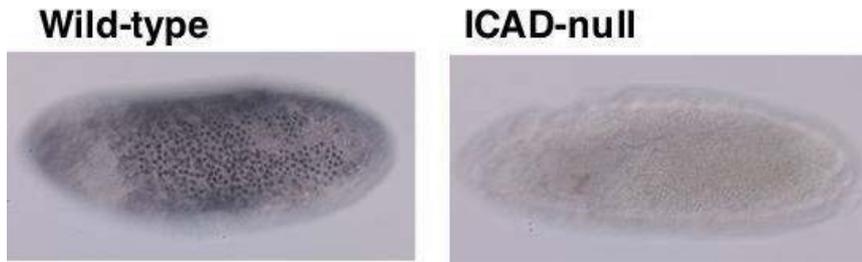


図 10. ショウジョハエでの CAD に依存した DNA の切断  
 ショウジョハエの胚を紫外線に照射した後、TUNEL で染色した。

一方、ショウジョ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。この遺伝子をサルCOS細胞で発現し、精製することにより、この分子が酸性で活性を持つ DNase であることを確認した。ついで、アメリカ Drosophila Stock Center に保管されているハエの変異体の一つがこの遺伝子 (Drosophila DNase II 遺伝子) の変異体であることを見出した。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た。ショウジョハエの卵・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機能しその後死滅する。DNase II 遺伝子に変異を持つハエの卵巣には未分解のDNAが蓄積していた。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。

次いで、この DNase II 変異ハエを ICAD 遺伝子欠損ハエと交配させることにより ICAD、DNase II 両者の遺伝子に変異を持つハエを構築し、この変異体での DNA 断片化を LM-PCR (Linker-mediated PCR) 法によって検討した。この方法は組織や胚から調製した DNA に linker を結合した後、PCR を行う方法であり、DNA 断片化を効率良く検出する方法である。この方法で、ショウジョハエ DNA を調べると、野生型ハエで認められるヌクレオソーム単位への DNA の断片化が ICAD 変異体では全く認められなかった。一方、この DNA ラダーは DNase II 変異体では増加し、ICAD、DNase II の両遺伝子を欠損したハエでは再び認められなかった。さらに、DNase II に変異をもつハエの卵巣で観察された DNA の蓄積は ICAD、DNase II 両遺伝子の変異体では顕著に増加していた。以上の結果はハエにおいても CAD がアポトーシス細胞で DNA を分解する酵素であり、この断片化した DNA がハエの貪食細胞内で DNase II によってさらに分解されることを示している。

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発現を検討した。その結果、グラム陰性細菌に対する抗ペプチドである Diptericin や Attacin 遺伝子の構成的活性化が DNase II 変異体で認められ、この発現は ICAD、DNase II 二重変異体で顕著に昂進していた (図 11)。一方、抗カビペプチド遺伝子である Drosomycin 遺伝子の活性化はほとんど認められなかった。以上の結果はショウジョハエにおいてもアポトーシスの分解を免れた DNA が自然免疫を活性化することを示している。ショウジョハエの自然免疫の活性化には二通りのシグナル伝達経路が知られている。すなわち、Toll と呼ばれる細胞表面に存在する受容体、Myd88, Pelle, Cactus/DIF と呼ばれるシグナル伝達分子を介して抗カビ・ペプチド Drosomycin が活性化される経路と、dFADD, IMD, Dredd, IKK, Relish と呼ばれるシグナル伝達分子を介して、Diptericin や Attacin 遺伝子が活性化される経路である (図 11)。ICAD、DNase II 遺伝子の変異体で Drosomycin 遺伝子ではなく、Diptericin や Attacin 遺伝子の構成的活性化が認められたことはマクロファージに蓄積したアポトーシス細胞からの DNA によって IKK を介したシグナル伝達経路のみが特異的に活性化されたことを示唆しており興味深い。

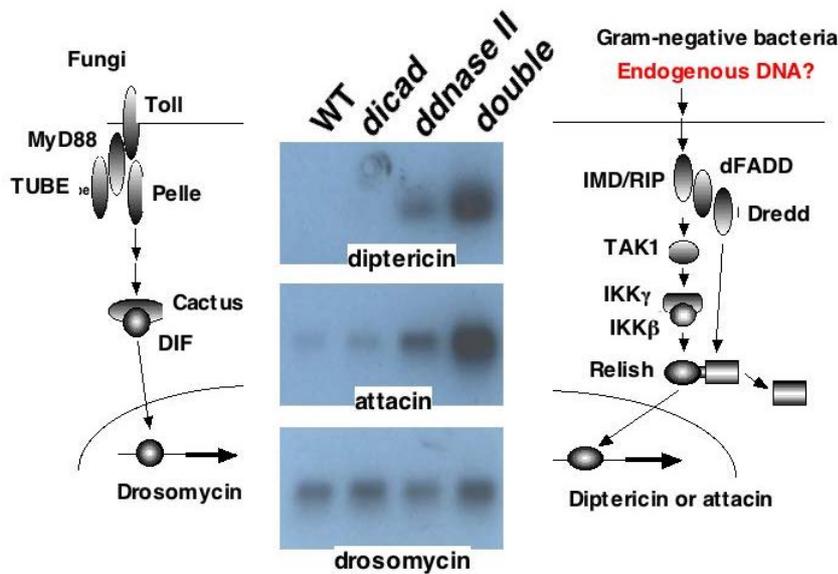


図 11 分解されない DNA によるショウジョハエでの自然免疫の活性化

ICAD、DNase II、および ICAD、DNase II 両遺伝子を欠損したショウジョハエから RNA を調製し、示された抗カビ、抗細菌ペプチド遺伝子での Northern hybridization の結果を中央に示す。左右には、カビによる Drosomycin 遺伝子活性化、グラム陰性菌による Diptericin, attacin 遺伝子活性化のシグナル伝達機構を模式化して示す。

## 発表論文

1. Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., Sakahira, H. & Nagata, S. Identification and developmental expression of inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**, 21402-21408 (2000).
2. Yokoyama, H., Mukae, N., Sakahira, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**, 12978-12986 (2000).
3. Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y. & Nagata, S. Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. *Genes & Dev.* **16**, 2662-2671 (2002).

### 3.5. 赤血球と目のレンズ細胞の分化過程におけるDNAの分解

#### 赤血球の脱核

マウスの発生初期段階での造血はprimitive erythropoiesis と呼ばれ、yolk sac で進行し、有核の赤血球が産生される。胚発生 1 2 日以降、造血の場は肝臓に移り、成体の骨髄での造血と同じように無核の赤血球を産生する。definitive erythropoiesisとよばれるこの造血過程での脱核の分子機構、赤血球が無核である利点などは不明である。胎生致死であるDNase II 遺伝子欠損マウスの胚を妊娠の日数を追って調べると胚発生の最終段階までDNase II<sup>-/-</sup>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%以下であった (図12)。

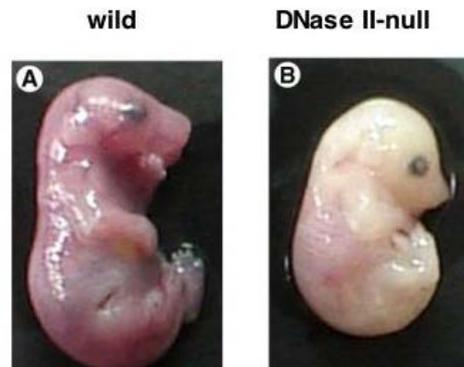


図12 DNase II 遺伝子欠損マウスの貧血  
DNase II 遺伝子を欠損している 16 日目のマウス胚の外観

一方、胚の発生初期におこるprimitive erythropoiesis はDNase II 遺伝子欠損マウスでも正常であり、発生初期の有核赤血球の数は正常であった。このことからDNase II 遺伝子の欠損は胎児肝臓でのdefinitive erythropoiesis に特異的に異常をもたらすと結論した。そこで、エリスロポイエチン、Stem cell factor (SCF) の存在下、in vitroメチルセルロース法によりDNase II<sup>-/-</sup>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) の数を測定したが、それらの数は野生型マウス胚の数とほとんど変わらなかった。ついで、マウスの種間 (129とB6 strain) でヘモグロビンβ鎖にpolymorphism が存在することを利用して移植実験を行った。すなわち、DNase II<sup>-/-</sup>胚肝臓の細胞を放射線照射したB6マウスに移植し、数週間後、抹消血のヘモグロビンを分析した。その結果、DNase II 遺伝子を欠損した細胞由来の成熟赤血球が野生型胚肝細胞を移植した場合と同等の効率で産生されることを見出した。このことから、DNase II 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て解析したところDNase II欠損マウス胎児肝にはF4/80やDAPIで強く染色される多数の病巣が認められた(図13)。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。さらに電子顕微鏡での観察からこの未分解の核を大量に含む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、血液島(Blood Island)と呼ばれる特徴と一致した。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。DNase II欠損マウスでは、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という結果は、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DNase IIによって分解していることを示している。おそらく、この未分解DNAを持つマクロファージからはアポトーシス細胞からのDNAを持つマクロファージで見いだされたように(3.4項)、インターフェロンが産生され、赤血球の産生を阻害したと考えられる。

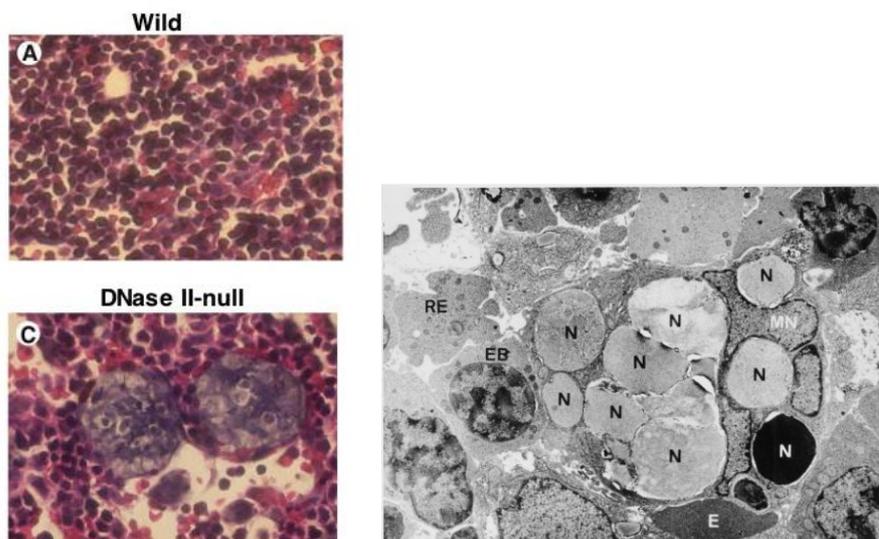


図13 DNase II欠損マウス胚肝臓に見られる病巣

左の図では野生型、DNase II欠損マウス胚をヘマトキシリン-エオジンで染色した。右図はDNase II欠損マウス胚で認められた病巣を電子顕微鏡で観察した。

#### 発表論文

1. 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).

## 目レンズ細胞でのDNA分解とその異常

ほ乳動物の目のレンズは繊維細胞によって構成されている。レンズの頂点側には一層の上皮細胞が存在する。この上皮細胞は増殖する能力を持っており、赤道面でこの細胞はレンズの内側に向かって動きだし、上皮から繊維細胞へと分化する。この分化過程でクリスタリンと呼ばれるタンパク質が大量に合成され、それとともに細胞の核、ミトコンドリア、小胞体などの小器官が除去される。これら小器官の除去はクリスタリンと共にレンズの透明性を維持するために必須と考えられているが、実験的に確認されてはいない。ところで、核、ミトコンドリアの除去過程に関してはそのDNAがTUNEL陽性になることなどから、アポトーシスによって除去されると報告されている。一方、私たちは、アポトーシス細胞でのDNA分解に関与しているCAD、DNase II遺伝子がレンズ細胞では、全く発現していないことを見出した。さらに、CAD、DNase II遺伝子の欠損マウスではレンズ細胞の脱核に異常はなく、CAD、DNase IIはレンズ細胞の分化には関与していないと結論した。ところで、DNase Iにはこれに類似した遺伝子DLAD (DNase II-Like Acid DNase) が存在する。この分子はリソソームに存在し、肝臓や顎下腺などに発現されていると報告されたがその生理作用は不明であった。一方、私達はReal-Time PCRを用いてこの酵素の種々の組織での発現を検討し、この酵素は目レンズで特異的に発現されていることを見いだした(図14)。この分子の目での発現量はこれまで報告された肝臓や顎下腺の10倍以上であった。マウスレンズ細胞核DNAの分解はマウスの発生後期に最も盛んになるが、DLADの発現もマウスの発生後期に増加した。このことはDLADが目レンズ細胞でのDNA分解を担っている可能性を強く示唆した。

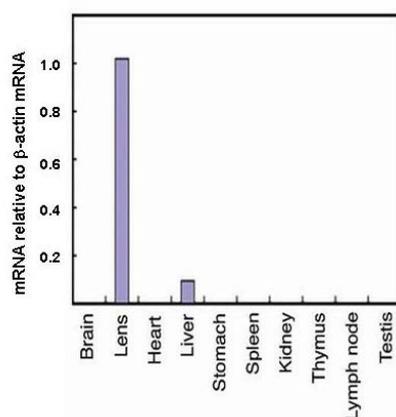


図14 目のレンズにおけるDLAD (DNase II-like Acid DNase) の発現  
示されたマウスの各組織からRNAを調製しReal-Time PCRを用いて、DLAD mRNAの量を定量化した。

そこで、DLAD欠損マウスを通常の方法で作成した。このマウスは正常に発生、生育したが、その目は顕著な白内障の症状を示していた。目レンズの切片を作成してFeulgenやDAPIによりDNAを染色すると、図15に示したように野生型マウスでは目レンズの表面には核を持つ一層の上皮細胞が存在した。しかし、レンズの核 中心部分の細胞には核は存在せず、いわゆる“Organelle-free zone”を形成していた。一方、DLAD遺伝子を欠損するマウスレンズには、中心部まで核を持つ細胞が認められ、DLADがレンズ細胞の分化過程でDNAを分解する酵素と結論した。

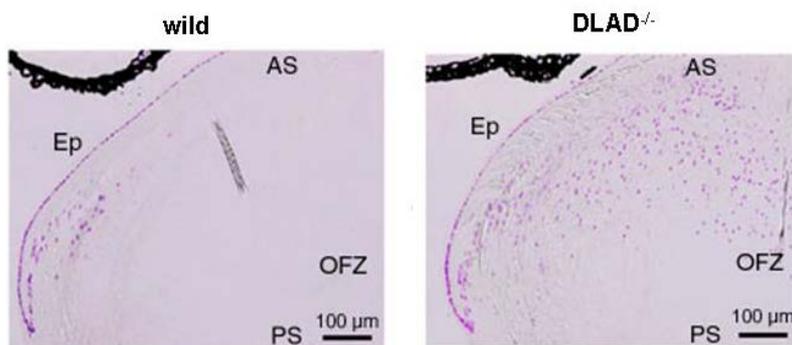


図15 DLAD遺伝子欠損マウスでのめレンズ細胞の分化  
6週令の野生型、DLAD欠損マウス目レンズ切片をFeulgenで染色した。Ep, epithelial cells; AS, anterior suture; PS, posterior suture; OFZ, organelle-free zone.

DLAD欠損マウスからのレンズの切片を電子顕微鏡で観察すると、ミトコンドリア、小胞体などは正常のレンズ細胞と同様に消失していた。しかし、DLAD欠損レンズ細胞の細胞質にはDNAが核膜などに保護されることなく存在しており、このDNAが目のレンズに白内障を起こした原因と結論した。ついで、マウスの視力を電気生理的に (electroretinography)、レンズを通過した光により網膜に惹起される電気信号として測定した。その結果、DLAD欠損マウスでは目の視力が顕著に低下していることが示され、レンズでDNAが分解されなければ目の透明性に影響を与え、視力に重大な問題をもたらすことが明らかになった(図16)。

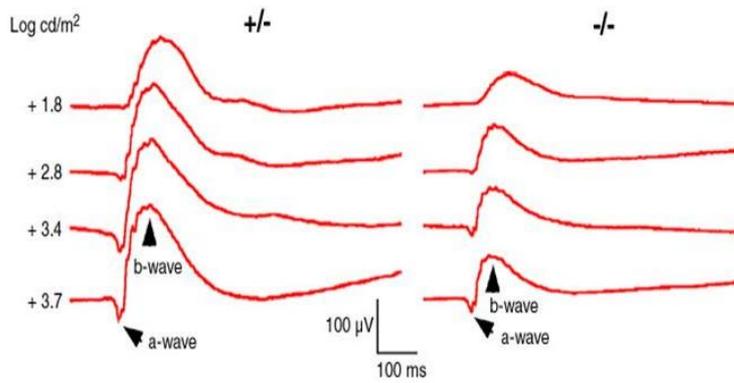


図16 DLAD遺伝子欠損マウスの視力の低下

DLAD遺伝子の欠損に関してヘテロマウス（野生型と同等）あるいはDLAD欠損マウスの目に段階的に強い光を照射し、その光の応答性をElectroretinogram法（網膜への電気信号）により測定した。

#### 発表論文

1. Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y. & Nagata, S. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* **424**, 1071-1074 (2003).

### 3.6. マクロファージによるアポトーシス細胞貪食の分子機構

マクロファージやimmature dendritic cells (樹状細胞) はアポトーシス細胞を効率良く貪食、処理する。これらの細胞は健康な細胞を貪食することはないことからアポトーシス細胞は“eat me”シグナルを提示し、マクロファージ、樹上細胞がこれを認識、貪食すると考えられている。これまでに、アポトーシス細胞に提示される分子、マクロファージ側でこのシグナルを受け取る分子として、数多くの分子が挙げられているが、貪食の詳細な機構はほとんど不明である。私達はこの原因としてマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を定量する方法が欠如していることにあると考えた。3.3 の項で述べたようにCADを欠損した細胞はアポトーシスが誘導されても、自らDNAを分解する能力は持っていない。しかし、このDNAはマクロファージに貪食された後分解される。私達はこのことを用いてアポトーシス細胞貪食の定量系を樹立し、この系を用いて、貪食に関与している分子の同定を試みた。

まず、チオグリコレートを投与したマウス腹腔からマクロファージを調製し、この細胞を抗原として、ハムスターを免疫し、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。その結果、一個のハイブリドーマによって産生される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、一個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(図17)。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。

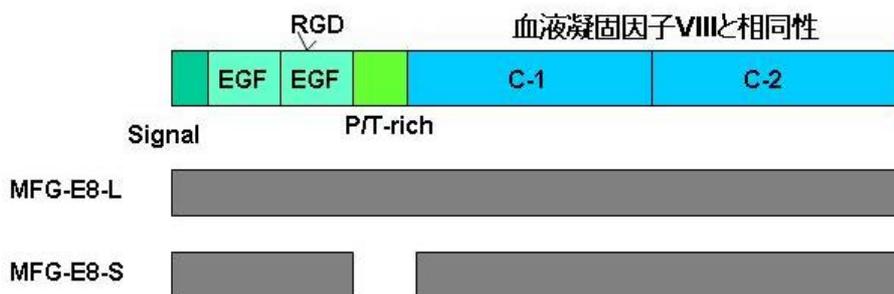


図17 マウスMFG-E8の構造

MFG-E8の一次構造を模式化して示した。MFG-E8にはalternative splicingにより2種のタンパク質が産生される。アポトーシス細胞にはL-体がS-体に比べ10倍以上の効率で結合する。

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(図18)。MFG-E8のアポトーシス細胞への結合は、Phosphatidylserine (PS) に結合するAnnexin Vと競合した。実際、MFG-E8はPSでcoatしたmicrotiterplate に用量依存的に結合した。MFG-E8の種々の変異体を用いた解析からPSへの結合はMFG-E8のC-1, C-2領域を介していることを示した。ところで、MFG-E8の2番目のEGF (epidermal growth factor) 領域にはインテグリンに結合する能力を持つことの知られているRGD (ArgGlyAsp) モチーフが存在する。MFG-E8はPS と結合していないと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。

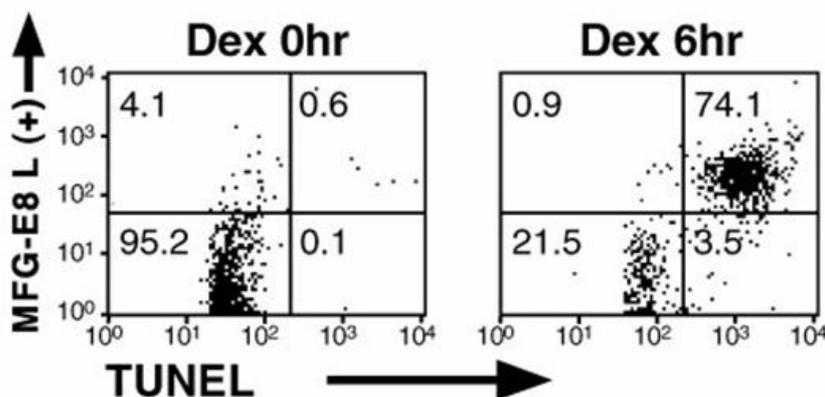


図18 アポトーシス細胞へのMFG-E8の結合

胸腺細胞をデキサメサゾンで処理し、アポトーシスを誘導した後、MFG-E8と反応させた。また細胞をTUNELで染色しアポトーシス細胞とMFG-E8の結合を関係づけた。

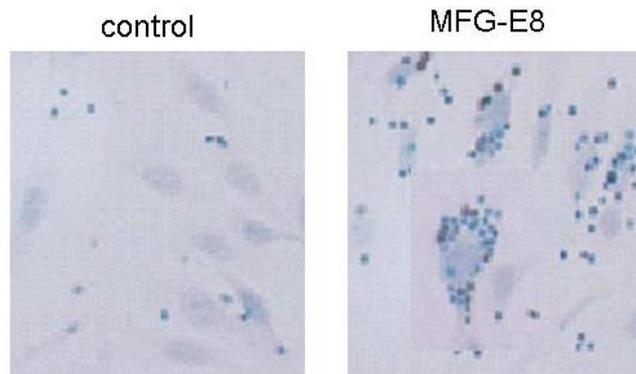


図19 NIH3T3によるアポトーシス細胞貪食へのMFG-E8の効果  
 インテグリンを強制発現したNIH3T3細胞にMFG-E8の存在、あるいは非存在下アポトーシスを起こした胸腺細胞と90分培養し、その後TUNELで染色した。

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(図19)。一方、MFG-E8のRGDモチーフをRGEに変えた変異体 (D89E) 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橋渡しする因子と結論した。

一方、ヒトやマウスのゲノムデータベースにMFG-E8と高い相同性(アミノ酸レベルで48%の相同性)を持つ因子を見出した。この因子はDel-1と呼ばれており、マウスの発生段階でのみ発現され、インテグリンに結合する能力を持つタンパク質と報告されている。Del-1がMFG-E8と高い相同性を示すことから私達はDel-1の組み換え体を作成し、アポトーシス細胞貪食への関与を検討した。その結果、この因子もMFG-E8と同様の効率でアポトーシス細胞に結合すること、NIH3T3細胞にDel-1を添加するとMFG-E8と同様にアポトーシス細胞の貪食を促進することを見出した。MFG-E8はチオグリコレートで刺激した腹腔マクロファージ、一方、Del-1は胸腺や肝臓由来の組織マクロファージで発現されており、その発現が両者間で明瞭に区別されていた。この結果は、アポトーシス細胞の貪食において、種類の異なるマクロファージがMFG-E8、Del-1を使い分けていることを示唆している。

ところで、これまでアポトーシス細胞の貪食に関与しているタンパク質として、数多くの因子が報告されている。このような複雑な系が存在する原因として、一個のマクロファージが多くの貪食関連分子を発現しているという可能性以外に、用い

られているマクロファージがheterogenous な細胞の集団であり、おのこのマクロファージは限られた因子を用いてアポトーシス細胞を貪食している可能が考えられる。このことを検討するためにSV40によって不死化したマウスマクロファージの細胞株、チオグリコレートにより活性化した初代腹腔マクロファージの貪食能を胸腺細胞、あるいは白血病細胞を標的として比較検討した。その結果、BAM3と呼ばれるマクロファージ細胞株はアポトーシスを起こした胸腺細胞を貪食できるが、WR19L T マウス細胞株は貪食できなかった(図20)。このことはBAM3マクロファージがより単純な貪食システムを保持していることを示唆している。

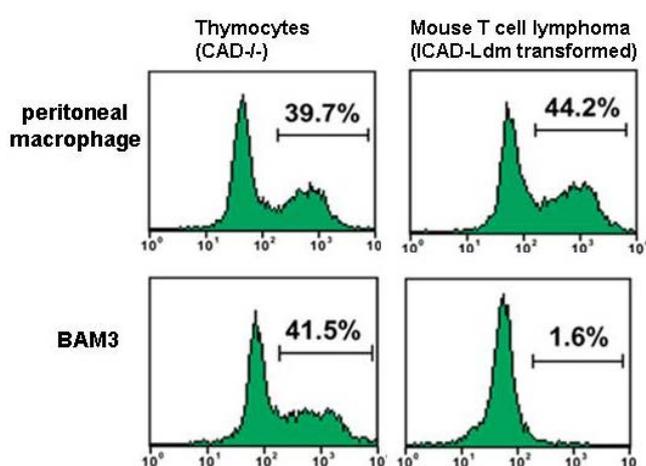


図20 腹腔マクロファージとマクロファージ細胞株の貪食能

チオグリコレートで活性化した腹腔マクロファージ、BAM3マクロファージ細胞株をアポトーシスを起こしたCAD欠損マウスからの胸腺細胞、カスパーゼ抵抗性のマウスT細胞株(WR19L)と共に培養した後、TUNEL染色し、FACSで解析した。CAD欠損細胞、ICAD-Ldm細胞はそれ自身ではDNAを分解しないが、マクロファージにより貪食されるとTUNEL陽性になる。

そこで、BAM3細胞を抗原としてハムスターを免疫し、数千のハイブリドーマを樹立した。このハイブリドーマのなかからBAM3による胸腺細胞貪食を阻害する抗体を同定し、その抗体によって認識されるタンパク質を精製し、これがSHPS-1と呼ばれる受容体であることを見いだした。SHPS-1は主にマクロファージに発現するタンパク質であり、CD47をリガンドとする。胸腺細胞はCD47を構成的に発現していた。一方、WR19L細胞はCD47を発現せず、CD47の発現ベクターを強制的にWR19L細胞に導入すると、この細胞はアポトーシス後、BAM3細胞に貪食された。さらに、NIH3T3細胞にS

HPS-1を発現させると、この細胞はCD47を発現するアポトーシス細胞を貪食したが非発現細胞は貪食できなかった。一方、アポトーシス細胞に暴露されるPSをMFG-E8の変異体(D89E, 上述) を用いてマスクするとアポトーシス細胞はSHPS-1を発現するNIH3T3細胞に接着するが、貪食はされなかった。以上の結果から、アポトーシス細胞の貪食は2段階から成り立っていると結論した。まづ、CD47発現アポトーシス細胞がSHPS-1 を介してマクロファージへ接着する、ついで、アポトーシス細胞はMFG-E8などのPS 結合タンパク質によって貪食される。

#### 発表論文

1. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182-187 (2002).
2. Tada, K., Tanaka, M., Hanayama, R., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Tethering of apoptotic cells to phagocytes through binding of CD47 to SHPS-11. *J. Immunol.*, in press.
3. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K. & Nagata, S. Expression of Del-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells. *Submitted to publication*

## (2) 研究成果の今後期待される効果

アポトーシスは、長い間、細胞の形態変化としてのみ記述され、その分子機構など不明であった。しかし、線虫を用いた研究からアポトーシスが遺伝子によって制御されていることが見出され、かつサイトカインによるアポトーシス誘導の実験系が確立され、アポトーシス関連の論文は過去10年、指数関数的に増加した。このような背景のもとで、本研究はアポトーシス時に見られるゲノムDNA分解の分子機構とその生理作用を明らかにすることを目的として行った。以下、本研究で得られた成果に関して国内外の研究の現状を紹介するが、本研究代表者らの成果は絶えず、この分野をリードしていると考えている。また、本研究の成果はアポトーシスにおけるDNA分解の分子機構を明らかにし、その基礎的研究の発展に寄与するばかりでなく、自己免疫疾患、貧血、白内障などの種々の疾患の発症機序の解析にも大きく貢献するものと考えられる。

### アポトーシス細胞で活性化されるDNase

アポトーシス時に死細胞で活性化されるDNaseに関してはこれまで、国内外のグループから、数多くの分子がその候補分子として提示された。1998年、私たちのグループとアメリカWangらのグループからカスパーゼによって活性化されるDNase (CAD,あるいはDFF, DNA fragmentation factor) が同定され、この論争に決着がついたかに思われた。しかし、Wangらはその後、ミトコンドリアから放出されるendonuclease Gと呼ばれるDNaseがCADとともに死細胞内でDNA断片化を引き起こすとNature誌に発表し、分野は一転、混乱した。我々のCAD欠損細胞を用いた結果はCADがアポトーシス細胞内でDNA切断を起こす唯一の分子であることを示すものであり、この混乱を収束させると考えている。ところで、DNase IIは線虫ではNuc-1と呼ばれ、programmed cell deathにおいて死細胞のDNAを分解する因子として遺伝学的に同定された。しかし、この因子が死細胞内で作用するのか、貪食細胞で作用するのか、線虫を用いた研究結果は混乱している。私たちが、DNase II欠損マクロファージを用いてこの酵素がマクロファージで作用することを証明したことは、この論争にも決着つけるものである。

## アポトーシス時のDNA分解の生理作用と自然免疫

アポトーシス時に染色体DNAが切断されることは古くから知られており、アポトーシスのマーカーとして用いられるとともに、DNA切断が細胞を死へと導くと考えられた。我々の結果はDNAの切断は細胞死には必須ではないが、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であった。この成果はNature Immunol.誌に発表されたが、この論文のrefereeのコメントは、「This would be a landmark paper」であった。我々の研究成果が、如何に独創的、かつ分野をリードしているか示すコメントと考えている。

細菌の構成成分による自然免疫の活性化の機構に関しては、大阪大学の審良教授を始め国内外の数多くのグループにより、活発に研究が行われている。しかし、本来、我々自身が持っているDNAによって免疫が活性化される点に関しては、ごく最近、アメリカのグループからDNAとその抗体の複合体がB-リンパ球を活性化する可能性が指摘されたのみである。我々の結果はマウスやショウジョウバエのDNAそれ自身が自然免疫を活性化する可能性を指摘するものである。自己のDNAが抗原として自己免疫疾患を引き起こすことは知られているが、自己反応性のDNAが体内でどのように産生され、免疫系を活性化するかは明らかにされていない。本研究の成果は体内で絶えず起こっているアポトーシスによるDNA切断の異常が免疫系を活性化する可能性を指摘するものであり、自己免疫疾患の原因解明の糸口となろう。

## 赤血球や目レンズ無核細胞の産生の分子機構

赤血球や目のレンズ細胞には核が存在しない。しかし、これまでの赤血球やレンズの分化過程に関する研究は、形態学的解析が多く、脱核の分子機構に迫ろうとする研究はほとんど存在しない。今回の私達の研究の結果、赤血球の核はマクロファージによって貪食されること、レンズ繊維細胞の核は自食作用 (autophagy) によって分解されることが示された。これらの結果は、赤血球やレンズ細胞の分化機構を解析する上で大変有用な成果と考えている。

血球貪食症 (hemophagocytosis) と呼ばれ、赤血球がマクロファージに貪食される原因不明の病気が知られている。私達の結果はマクロファージが赤芽球からの核を貪食するという結果である。もし、マクロファージが核ばかりでなく細胞自身を貪食するとすればこの血液貪食症は説明できるのではなかろうか。今後、マクロファージがどのような機構で赤芽球の核のみを貪食するのか検討する必要がある。

一方、私達はレンズの核が除去されないと白内障を発症することを見いだした。白内障の多くは老人性であり、これらの白内障は遺伝性の白内障を誘起するDLADの欠損によるものとは考えられない。しかし、遺伝性の白内障の患者は存在する。これらの患者でDLAD遺伝子をスクリーニングし、DLAD遺伝子に異常を同定することができれば、DNaseを用いた治療も可能になるであろう。また、自食作用 (autophagy) は主に酵母の遺伝学を用いて研究されている。レンズでの核、ミトコンドリア、小胞体などの除去過程が自食作用で進行することが確認できれば、ほ乳動物における自食過程の良いモデルとなるであろう。

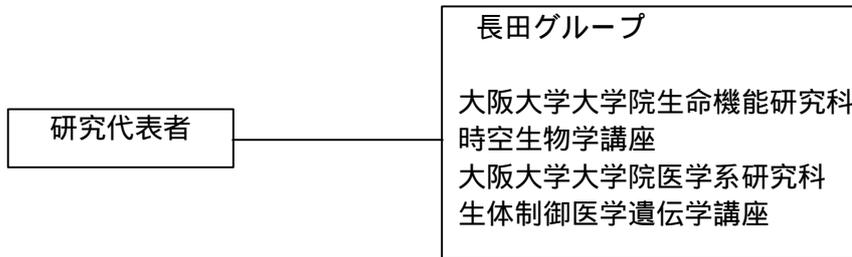
### **アポトーシス細胞の貪食の分子機構とその生理作用**

マクロファージはアポトーシス細胞を貪食するが健康な細胞を貪食することはない。アポトーシス細胞とマクロファージの間には厳密な認識機構が存在すると考えられる。これまでに、数多くの分子がその候補として発表されている。たとえば、アポトーシス細胞に発現する分子としてphosphatidylserine (PS)、ICAM-3、糖鎖、マクロファージ側の分子としては、レクチン、CD14, PS receptor (PSR), scavenger receptor などである。このなかでも、PSRはPSを認識し、貪食を媒介する分子として報告されているが、この分子はマクロファージ以外の細胞にも普遍的に発現しており、PS-Rがアポトーシス細胞の貪食に直接関与している可能性は低い。一方、我々が単離したMFG-E8はPSに直接結合し、より直接的に貪食に関与していると考えられる。

アポトーシス細胞が貪食されないとこの細胞は二次的にネクローシスに落ち入り、細胞内分子が遊離され自己免疫を誘起するとされている。今後、MFG-E8遺伝子欠損マウスなどを構築し、貪食の生理作用を明かにすることができれば、貪食と自己免疫疾患との関わりが明かになるであろう。ところで、線虫においてはアポトーシス細胞の貪食には少なくとも2通りの経路の存在が報告されている。今回、我々はアポトーシス細胞の貪食が2段階で進むことを示したことは数多くの貪食関連分子の作用機構を解析する上で、有用であろう。

#### 4. 研究実施体制

##### (1) 体制



CAD の作用機構・生理作用の解析を担当

## (2)メンバー表

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
長田 重一	阪大・医 阪大・生命	教授	総括	平成10年12月～ 平成15年11月
福永 理己郎	阪大・医 阪大・生命	助教授	アポトーシスのシグナル伝達	平成10年12月～ 平成15年11月
福山 英啓	阪大・医 阪大・生命	助手	CAD, ICADの変異マウス	平成10年12月～ 平成14年3月
竹田 潤二	阪大・医	教授	CAD, ICADの変異マウス	平成10年12月～ 平成15年11月
佐子山 豈彦	阪大・医	助手	ショウジョウバエのCAD, ICAD	平成10年12月～ 平成15年11月
横倉 隆和	阪大・医	学術振興会 特別研究員	ショウジョウバエのアポトーシス	平成10年12月～ 平成13年3月
Dorian McIlroy	阪大・医	学術振興会 特別研究員	CAD, ICADの作用機構	平成10年12月～ 平成11年8月
坂平 英樹	阪大・医	大学院生 学振研究員	CAD, ICADの作用機構	平成10年12月～ 平成13年3月
下崎 康治	阪大・医	大学院生	CADの分子機構	平成10年12月～ 平成13年3月
横山 英樹	阪大・医	大学院生 学振研究員	ショウジョウバエのCAD, ICAD	平成10年12月～ 平成14年3月
福永 理恵	阪大・医	CREST技術員	アポトーシスのシグナル伝達	平成11年1月 平成15年11月
三輪 桂子	阪大・医	CREST技術員	アポトーシス細胞の貧食	平成11年1月～ 平成15年11月
熊谷 さおり	阪大・医	CREST研究補助員	事務補助	平成11年1月 平成13年2月
瀬戸 百合子	阪大・医	CREST研究補助員	研究補助	平成11年4月 平成15年6月
田中 正人	阪大・医 阪大・生命 理化学研究所	助教授 チームリーダー	アポトーシス細胞の貧食	平成11年8月～ 平成15年11月
山崎 俊夫	阪大・蛋	助教授	CAD, ICADの構造解析	平成12年4月～ 平成13年3月
原山 雅子	阪大・医	CREST研究補助員	研究補助	平成12年4月～ 平成15年11月
青山 佐知	阪大・医	CREST研究補助員	事務補助	平成13年1月～ 平成15年1月
松村 博隆	阪大・医	CREST研究員	ネクローシスの分子機構	平成13年4月～ 平成15年2月
川根 公樹	阪大・医 阪大・生命	大学院生 助手	Dnase の変異マウス	平成13年4月～ 平成15年11月
向永 直美	阪大・医	大学院生	ショウジョウバエのCAD, ICAD	平成13年4月～ 平成15年3月
華山 力成	阪大・医	大学院生	アポトーシス細胞の貧食	平成14年4月～ 平成15年11月
藤井 麻紀子	阪大・医	CREST研究補助員	事務補助	平成15年1月～ 平成15年11月

## 5 . 研究期間中の主な活動

### (1)ワークショップ・シンポジウム等

該当なし

### (2)招聘した研究者等

氏 名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Dr. Stanley J. Korsmeyer (Professor, Howard Hughes Institute, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard University, U.S.A.)	「Mitochondrial Gateway to Apoptosis」の題で 講演 その後アポトーシス に関して長田グループと 討論のため。	大阪大学・医学部 ・遺伝学教室	平成13年10月 24日 -27日

## 6 . 主な研究成果物、発表等

(1)論文発表 (欧文原著 55件、欧文総説 7件、和文総説 9件)

### 原著論文

1. Mizuki, M., Ueda, S., Tagawa, S., Shibayama, H., Nishimori, Y., Shibano, M., Asada, H., Tanaka, M., Nagata, S., Koudera, U., Suzuki, K., Machii, T., Ohsawa, M., Aozasa, K., Kitani, T. & Kanakura, Y. Natural killer cell-derived large granular lymphocyte lymphoma of lung developed in a patient with hypersensitivity to mosquito bites and reactivated Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Hematol.* **59**, 309-315, 1998
2. Kawane, K., Fukuyama, H., Adachi, M., Sakahira, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. & Nagata, S. Structure and promoter analysis of murine CAD and ICAD genes. *Cell Death & Differ.* **6**, 745-752 (1999).
3. McIlloy, D., Sakahira, H., Talanian, R.V. & Nagata, S. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* **18**, 4401-4408 (1999).
4. Sakahira, H., Enari, M., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S. Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr. Biol.* **9**, 543-546 (1999).
5. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L and ICAD-S. *J. Biol. Chem.* **274**, 15740-15744 (1999).
6. Hashimoto, W., Osaki, T., Okamura, H., Robbins, P.D., Kurimoto, M., Nagata, S., Lotze, M.T. & Tahara, H. Differential antitumor effects of administration of rIL-18 or rIL-12 are mediated primarily by Fas-FasL and perforin induced tumor apoptosis respectively. *J. Immunol.* **163**, 583-589 (1999).
7. Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N., Jenkins, N., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S. & Baba, A. Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VAPC1) receptor. *Genomics* **58**, 90-93 (1999).
8. Kakinuma, C., Takagaki, K., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Uemura, A. & Shibutani, Y. Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol. Pathol.* **27**, 412-420 (1999).
9. Kaser, A., Nagata, S. & Tilg, H. Interferon alpha augments activation-induced T cell death by upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression. *Cytokine* **11**, 736-743 (1999).
10. Kuwano, K., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Suda, T., Kunitake, R., Maeyama, T., Miyazaki, H. & Hara, N. Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **104**, 13-19 (1999).
11. Miwa, K., Hashimoto, H., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S. & Suda, T. Therapeutic effect of an anti-Fas ligand monoclonal antibody on lethal graft-versus-host disease. *Int.*

- Immunol.* **11**, 925-931 (1999).
12. Moriwaki, M., Itoh, N., Miyagawa, J., Yamamoto, K., Imagawa, A., Yamagata, K., Iwahashi, H., Nakajima, H., Namba, M., Nagata, S., Hanafusa, T. & Matsuzawa, Y. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* **42**, 1332-1340 (1999).
  13. Samali, A., Hivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S. & Orrenius, S. Apoptosis: Cell death defined by caspase activation. *Cell Death & Diff.* **6**, 495-496 (1999).
  14. Sugimoto, N., Fukuda, Y., Saito-Ohara, F., Kamiyama, R., Nakagawara, A., Mukae, N., Nagata, S. & Inazawa, J. The human caspase-activated DNase (CAD) gene: genomic structure, exonic single-nucleotide polymorphisms, and a highly polymorphic dinucleotide repeat at the CAD locus. *J. Hum. Genet.* **44**, 408-411 (1999).
  15. Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y. & Nagata, S. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J. Cell Biol.* **151**, 1247-1255 (2000).
  16. McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K.-i., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes & Develop.* **14**, 549-558 (2000).
  17. Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., Sakahira, H. & Nagata, S. Identification and developmental expression of inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**, 21402-21408 (2000).
  18. Sakahira, H., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* **275**, 8091-8096 (2000).
  19. Yokoyama, H., Mukae, N., Sakahira, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**, 12978-12986 (2000).
  20. Otomo, T., Sakahira, H., Uegaki, K., Nagata, S. & Yamazaki, T. Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nature Struct. Biol.* **7**, 658-662 (2000).
  21. Uegaki, K., Otomo, T., Sakahira, H., Shimizu, M., Yumoto, N., Kyogoku, Y., Nagata, S. & Yamazaki, T. Structure of the CAD domain of caspase-activated DNase and interaction with the CAD domain of its inhibitor. *J. Mol. Biol.* **297**, 1121-1128 (2000).
  22. Cossarizza, A., Stent, G., Mussini, C., Paganelli, R., Borghi, V., Nuzzo, C., Pinti, M., Pedrazzi, J., Benatti, F., Esposito, R., Røsok, B., Nagata, S., Vella, S., C., F. & De Rienzo, B. Deregulation of the CD95/CD95L system in lymphocytes from patients with primary, acute HIV infection. *AIDS* **14**, 345-355 (2000).
  23. 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. & Baba, A. Mice with markedly reduced PACAP (PAC(1)) receptor expression by targeted deletion of the signal peptide. *J. Neurochem.* **75**, 1810-1817 (2000).
  24. Morita, Y., Naka, T., Kawazoe, Y., Fujimoto, M., Narazaki, M., Nakagawa, R., Fukuyama,

- H., Nagata, S. & Kishimoto, T. Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced cell death in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5405-5410 (2000).
25. Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Burdon, J.-C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. & Reisdorf, P. The death receptor Fas (Apo1/CD95) is a direct transcriptional target of the tumor suppressor protein p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 3867-3872 (2000).
26. Okuda, Y., Sakoda, S., Fujimura, H., Nagata, S., Yanagihara, T. & Bernard, C.C. Intrathecal administration of neutralizing antibody against Fas Ligand suppresses the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 164-168 (2000).
27. Ryo, K., Kamogawa, Y., Ikeda, I., Yamauchi, K., Yonehara, S., Nagata, S. & Hayashi, N. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 2047-2055 (2000).
28. Sakamaki, K., Kanda, N., Ueda, T., Aikawa, E. & Nagata, S. The eosinophil peroxidase gene forms a cluster with the genes for myeloperoxidase and lactoperoxidase on human chromosome 17. *Cytogenet. Cell Genet.* **88**, 246-248 (2000).
29. Sotozono, C., Sano, Y., Suzuki, T., Tada, R., Ikeda, T., Nagata, S. & Kinoshita, S. Soluble Fas ligand expression in the ocular fluids of uveitis patients. *Curr. Eye Res.* **20**, 54-57 (2000).
30. Tamada, K., Shimozaki, K., Chapoval, A.I., Zhu, G., Sica, G., Flies, D., Boone, T., Hsu, H., Fu, Y.-X., Nagata, S., Ni, J. & Chen, L. Modulation of T cell-mediated immunity in tumor and graft *versus* host disease models through LIGHT costimulatory pathway. *Nature Med.* **6**, 283-289 (2000).
31. Tamada, K., Shimozaki, K., Chapoval, A.I., Zhai, Y., Su, J., Chen, S.-F., Hsieh, S.-L., Nagata, S., Ni, J. & Chen, L. 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 (2000).
32. Ueno, Y., Ishi, M., Yahagi, K., Mano, Y., Kisara, N., Nakamura, N., Shimosagawa, T., Toyota, T. & Nagata, S. Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft *versus* host disease. *Hepatology* **31**, 966-974 (2000).
33. 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).
34. 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 (2001).
35. Itai, T., Tanaka, M. & Nagata, S. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF $\alpha$ -converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2074-2082 (2001).

36. 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).
37. 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).
38. 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).
39. 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).
40. 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).
41. 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).
42. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182-187 (2002).
43. Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y. & Nagata, S. Activation of the innate immunity in Drosophila by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. *Genes & Develop* **16**, 2662-2671 (2002).
44. Sakahira, H. & Nagata, S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3364-70. (2002).
45. Koike, H., Horie, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Nagata, S. & Takeda, J. Efficient biallelic mutagenesis with Cre/loxP-mediated inter-chromosomal recombination. *EMBO Rep* **3**, 433-7 (2002).
46. 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).
47. Takakuwa, T., Dong, Z., Nakatsuka, S., Kojya, S., Harabuchi, Y., Yang, W.I., Nagata, S. & Aozasa, K. Frequent mutations of Fas gene in nasal NK/T cell lymphoma. *Oncogene* **21**, 4702-5 (2002).
48. Takayama, H., Takakuwa, T., Tsujimoto, Y., Tani, Y., Nonomura, N., Okuyama, A., Nagata, S. & Aozasa, K. Frequent Fas gene mutations in testicular germ cell tumors. *Am. J. Pathol.* **161**, 635-41 (2002).
49. Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Iida, T., Okada, K. & Nagata, S. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in

- apoptotic DNA degradation. *Nat. Immunol.* **4**, 138-144 (2003).
50. Nagase, H., Fukuyama, H., Tanaka, M., Kawane, K. & Nagata, S. Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation. *Cell Death & Differ.* **10**, 142-143 (2003).
  51. Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y. & Nagata, S. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* **424**, 1071-1074 (2003).
  52. Contin, C., Pitard, V., Itai, T., Nagata, S., Moreau, J.F. & Dechanet-Merville, J. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 32801-9 (2003).
  53. Ogawa, H., Murayama, A., Nagata, S. & 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).
  54. Ogawa, H., Ueda, T., Aoyama, T., Aronheim, A., Nagata, S. & Fukunaga, R. A SWI2/SNF2-type ATPase/helicase protein, mDomino, interacts with myeloid zinc finger protein 2A (MZF-2A) to regulate its transcriptional activity. *Genes to Cells* **8**, 325-339 (2003).
  55. Tada, K., Tanaka, M., Hanayama, R., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Tethering of apoptotic cells to phagocytes through binding of CD47 to SHPS-1. *J. Immunol.*, in press

## 総説

### 欧文

1. Nagata, S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genetics* **33**, 29-55 (1999).
2. Nagata, S. Biddable death. *Nature Cell Biol.* **1**, E143-E145 (1999).
3. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 12-18 (2000).
4. Nagata, S. Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nature Med.* **6**, 502-503 (2000).
5. Nagata, S. Apoptosis. *Fibrinolysis & Proteolysis* **14**, 82-86 (2000).
6. Nagata, S. Breakdown of chromosomal DNA. *Cornea* **21**, S2-S6 (2002).
7. Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. & Fukuyama, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differ.* **10**, 108-116 (2003).

### 和文

1. 長田重一 「過熱しているアポトーシス研究」特集「アポトーシスへの情報伝達経路と疾患」長田重一 企画 「実験医学」羊土社 Vol.17, 1598-1602 頁, 1999

年 9 月

2. 長田重一 「細胞の誕生と死」山本雅 編 共立出版 1-198 頁, 2001 年 9 月
3. 川根公樹、福山英啓、長田重一 「赤血球造血機構における DNaseII の役割」  
「実験医学」羊土社 Vol.19, 1858-1860 頁, 2001 年 9 月
4. 松村博隆、長田重一 「Fas を介するネクローシスのシグナル伝達機構」  
「実験医学」羊土社 Vol.19, 1735-1740 頁, 2001 年 8 月
5. 大友崇紀、上垣浩一、坂平英樹、長田重一、山崎俊夫 「Caspase-activated  
DNase(CAD)とそのインヒビター ICAD の CAD ドメイン複合体の立体構造と機能」  
「蛋白質核酸酵素」 Vol.46, 233-239 頁, 2001 年 3 月
6. 川根公樹、福山英啓、長田重一 「赤芽球の脱核機序の新しい展開」  
「Annual Review 血液 2003」中外医学社 42-49 頁, 2003 年 1 月
7. 向永直美、川根公樹、長田重一 「感染症とアポトーシスにおける新展開」  
「臨床と微生物」近代出版 Vol.30, 233-238 頁, 2003 年 5 月
8. 長田重一 「細胞の死 (アポトーシス)」  
「国際歯科学士会日本部会雑誌」国際歯科学士会日本部会 Vol.34 No.1, 7-15 頁, 2003 年 5 月
9. 長田重一 「細胞の死、貧食、DNA の分解」  
「学術月報」日本学術振興会 Vol.56, 1048-1053 頁, 2003 年 10 月

## (2) 口頭発表

招待講演 (国際会議 57件、国内学会 83件)

### 国際会議

1. Nagata, S. (December 5, 1998) Caspase-activated DNase and its inhibitor, US-Japan and France-Japan Joint Meeting on Immunology, Kobe Portpia Hotel, Kobe, Japan
2. Nagata, S. (January 28, 1999) Apoptosis by Fas death factor, 6th DBMS/IBS workshop, Grenoble Villardde Lans, session chair, Grenoble, France
3. Nagata, S. (January 30, 1999) Fas death factor, German-Japan Immunology Meeting, Max-Planck-Institute, Freiburg, Germany
4. Nagata, S. (February 5, 1999) The Fas death factor, Mayo Clinic seminar, Mayo, Minnesota, USA
5. Nagata, S. (February 9, 1999) Apoptosis by Fas death factor, Miami Nature Biotechnology Winter Symposium, The Radisson Deaville Resort, Miami, USA
6. Nagata, S. (March 12, 1999) Molecular mechanisms for Fas-mediated apoptosis, US-Japan Joint Workshop on Recent Advance in Cancer Research, Hotel New Otani, Tokyo, Japan
7. Nagata, S. (April 7, 1999) Molecular mechanisms for Fas-mediated apoptosis, Keystone Symposia, Beaver Run Resort, Colorado, USA
8. Nagata, S. (May 8, 1999) Caspase-activated DNase and its inhibitor, Cold Spring Harbor, Symposium on Proteolysis, Session chair, Cold Spring Harbor, New York, USA
9. Nagata, S. (June 7, 1999) Apoptosis, Plenary Lecture, IFCC-WorldLab, Forte da Basso Congress Center, Firenze, Italy
10. Nagata, S. (August 12, 1999) Caspase-activated DNase and its inhibitor, EMBO workshop, Institute of Experimental Medicine, Praha, Czech Republic
11. Nagata, S. (September 31, 1999) Apoptosis by death factor, Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
12. Nagata, S. (October 11, 1999) Apoptosis by Fas death factor, 6th IUBMB Conference, Seoul Hilton Hotel, Seoul, Korea
13. Nagata, S. (November 1, 1999) Apoptosis and cancer, The 27<sup>th</sup> meeting of the international society for oncodevelopmental biology and medicine, Kyoto International conference hall, Kyoto, Japan
14. Nagata, S. (November 14, 1999), DNA fragmentation in apoptosis, Keynote Address, The Seventh-ECDO-ESH European Conference on Apoptosis, Metropolitan Hotel, Ein Gedi, Israel
15. Nagata, S. (December 11, 1999) DNA fragmentation during apoptosis, The 4<sup>th</sup> Korea-Japan Cancer Research Workshop, Kyoto Park Hotel, Kyoto
16. Nagata, S. (December 13, 1999) Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis, The

- 16<sup>th</sup> Radiation Biology Center International Symposium, Co-op Inn Kyoto, Kyoto
17. Nagata, S. (January 21, 2000) T cell and target cell death, Keynote Address, Keystone Symposia, Hilton of Santa Fe, New Mexico, USA
  18. Nagata, S. (February 5, 2000) Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis, French-Japanese Meeting on Immunology, Hotel West End, Nice, France
  19. Nagata, S. (February 23, 2000) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis, U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Symposium, Bethesda Marriott, Bethesda, USA
  20. Nagata, S. (March 16, 2000) Molecular mechanism of apoptosis, and its abnormality, 2nd International Symposium of AGENE, Tokyo
  21. Nagata, S. (April 3, 2000) Apoptosis by death factors, Plenary Lecture, Eighth Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease, Davos, Switzerland
  22. Nagata, S. (May 16, 2000) Breakdown of Chromosomal DNA during Apoptosis, 8<sup>th</sup> International TNF Congress, Trondheim, Norway
  23. Nagata, S. (June 28, 2000) Apoptosis by Fas death factor, Plenary Lecture, 15<sup>th</sup> International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, ACT CITY HAMAMATSU, Hamamatsu, Shizuoka
  24. Nagata, S. (September 3, 2000) Fas-ligand Induced apoptosis, Joint Swiss-Japanese Scientific Seminar “ Cytokines: Roles in Physiology and Pathology “, Wolfsberg Executive Development Centre, Ermatingen, Switzerland
  25. Nagata, S. (September 11, 2000) Apoptotic DNA fragmentation, Japan-Sweden Immunology Meeting, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
  26. Nagata, S. (October 17, 2000) DNA fragmentation during apoptosis, 10<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Radical Research, Kyoto International Conference Hall, Kyoto
  27. Nagata, S. (October 30, 2000) Apoptosis, Plenary Lecture, 11<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Sydney Convention & Exhibition Center, Sydney, Australia
  28. Nagata, S. (November 14, 2000) DNA fragmentation by phagocytes, and its abnormality, The session Chair, The Bunbury Center meeting on “Getting Rid of the Bodies”, The Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
  29. Nagata, S. (February 16, 2001) Apoptotic DNA degradation, The 5<sup>th</sup> AACR/JCA Joint Conference Molecular Biology and New Therapeutic Strategy: Cancer Research in the 21<sup>st</sup> Century, Maui, Hawaii
  30. Nagata, S., (March 25, 2001) Apoptosis, Keynote Address, 16<sup>th</sup> Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
  31. Nagata, S. (April 1, 2001 ) Chromosomal DNA Degradation during Apoptosis, 2001 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Orlando Orange Country Convention Center, Orland, USA
  32. Nagata, S. (April 26, 2001 ) DNA degradation during apoptosis and other process, 11<sup>th</sup> International Conference on Second Messengers and Phosphoproteins, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia
  33. Nagata, S. (July 18, 2001) Apoptotic DNA fragmentation, Gordon Research Conference on Cell Death, The Queen’s College, Oxford, UK
  34. Nagata, S. (August 27, 2001) Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the

- mouse fetal liver, Plenary Lecture, 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, The Keio Plaza Inter-Continental, Tokyo, Japan
35. Nagata, S. (October 5, 2001) DNA fragmentation in apoptosis, Karolinska Institute Nobel Conference on Apoptosis-Mechanisms and Implications for Human Disease, ASA/Radisson hotel, Stockholm, Sweden
  36. Nagata, S. (November 2, 2001) DNA degradation during apoptosis and erythropoiesis, Dr. Josef Steiner Cancer Foundation & Swiss Society for Oncology Joint Symposium, University of Bern, Bern, Switzerland
  37. Nagata, S. (January 8, 2002 ) Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis and erythropoiesis, Osaka University NIH Forum, National Institutes of Health, Bethesda, USA
  38. Nagata, S. (February 13, 2002 ) Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis and Erythropoiesis, AACR Special Conference in Cancer Research, Hilton Waikoloa Resort, Waikoloa, Hawaii
  39. Nagata, S. (March 23, 2002) Death receptor in liver injury, Congress on Hepatic Inflammation and Immunity 2002, The San Luis Resort, Galveston, Texas, USA
  40. Nagata, S. (May 31, 2002) DNA fragmentation during apoptosis and erythropoiesis, 4th International Cell Death Society Symposium "The Mechanisms of Cell Death", Noosa Lakes Resort, Noosa, Australia
  41. Nagata, S. (June 20, 2002) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis and erythropoiesis, 11<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage, Niigata Citizen Plaza, Niigata, Japan
  42. Nagata, S. (July 6, 2002) DNA Degradation during apoptosis and erythropoiesis, Plenary Lecture, 31st Annual Meeting "International Society for Experimental Haematology", The Fairmont Queen Elizabeth Hotel, Montreal, Canada
  43. Nagata, S. (September 2, 2002) Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis and Phagocytosis, The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Programmed Cell Death, The Hall of Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai, China
  44. Nagata, S. (October 11, 2002) Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis and phagocytosis, 10<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis "Charming to Death", The Pasteur Institute, Paris, France
  45. Nagata, S. (October 28, 2002) Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis and phagocytosis, The Second JSPS Science Forum, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
  46. Nagata, S. (November 13, 2002) Molecular Mechanism of Apoptosis, Plenary Lecture, The 15th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC 2002 FUCHU), Fuchu-no-mori Theater, Tokyo, Japan
  47. Nagata, S. (January 27, 2003) Apoptosis, Kyoto University COE international Symposium, Kyoto International Conference, Kyoto, Japan
  48. Nagata, S. (February 8, 2003), Breakdown of chromosomal DNA during apoptosis and Phagocytosis, Keynote Address, Keystone Symposia on Cell Biology "Molecular Mechanisms of Apoptosis", Fairmont Banff Springs Hotel, Banff, Canada
  49. Nagata, S. (February 22, 2003) Apoptosis and phagocytosis of apoptotic cells, International Symposium on Regulation of Immune Response in Health and Disease, Senri Life Science Center, Osaka, Japan

50. Nagata, S. (June 3, 2003) Apoptosis, Keynote Address, 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR), Osaka International Convention Center, Osaka, Japan
51. Nagata, S. (July 8, 2003) Apoptotic DNA degradation and its failure, XIX International Congress of Genetics, Melbourne Convention Center, Melbourne, Australia
52. Nagata, S. (August 21, 2003) Apoptosis and Phagocytosis, International Symposium on "How close are we from cancer cure?", Hotel Grand Hyatt Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
53. Nagata, S. (September 15, 2003) DNA degradation during apoptotic cell death, Keynote Address, Global Arthritis Research Network "3<sup>rd</sup> World Congress for Arthritis in Summit", Sheraton Resort Phenix Seagaia, Miyazaki, Japan
54. Nagata, S. (September 19, 2003) DNA degradation and its failure, Session Chair, The Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Programmed Cell Death, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.
55. Nagata, S. (October 1, 2003) Apoptosis and Phagocytosis, Plenary Lecture on The 13<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis, Kyoto International Conference, Kyoto, Japan
56. Nagata, S. (October 30, 2003) DNA degradation and its failure in Programmed Cell Death and Other developmental Processes, The 16<sup>th</sup> Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology, Shonan Village Center, Kanagawa, Japan
57. Nagata, S. (November 11, 2003) DNA degradation during apoptotic cell death, Special Lecture on The 3<sup>rd</sup> General Meeting of the International Proteolysis Society, Hotel Grand Court Nagoya, Nagoya, Japan

## 国内学会など

1. 長田重一 (平成10年12月19日) アポトーシスの分子機構 第21回分子生物学会 シンポジウム講演 パシフィコ横浜 神奈川
2. 長田重一 (平成11年1月8日) 昭和大学ハイテクリサーチセンター開設記念セミナー 昭和大学 東京
3. 長田重一 (平成11年1月12日) アポトーシスの分子機構 「糖鎖リモデリングと細胞コミュニケーション」 特別講演 大阪大学 大阪
4. 長田重一 (平成11年2月15日) アポトーシスの分子機構 横浜市立大学大学院医学学術セミナー 横浜市立大学 神奈川
5. 長田重一 (平成11年2月19日) TNF受容体系とアポトーシス 第14回ピタミンDショップ 教育講演 横浜プリンスホテル 神奈川
6. 長田重一 (平成11年3月12日) Molecular Mechanism for Fas-mediated Apoptosis 日米合同ワークショップ「最近のがん研究の進歩」 ホテルニューオータニ 東京
7. 長田重一 (平成11年4月4日) アポトーシスの分子機構 第25回日本医学会総会 特別講演 東京国際フォーラム 東京
8. 長田重一 (平成11年4月19日) Fasを介したアポトーシスとその異常 第61回日本血液学会総会 サテライトシンポジウム 東京国際フォーラム 東京

9. 長田重一 (平成11年4月24日) アポトーシスと病気 久留米大学分子生命科学研究所開設10周年記念講演会 久留米大学 福岡
10. 長田重一 (平成11年5月28日) Fasリガンドにより誘導されるアポトーシスとその異常 第6回日本臓器保存生物医学学会総会 教育講演 千里ライフサイエンスセンター 大阪
11. 長田重一 (平成11年6月20日) 兵庫県保険医協会創立30周年記念総会 神戸国際会議場 兵庫
12. 長田重一 (平成11年6月26日) Fasリガンドにより誘導されるアポトーシスとその異常 第3回細胞死研究会 テレビ愛媛EBCホール 愛媛
13. 長田重一 (平成11年7月30日) 免疫学会サマースクール かずさアカデミアパーク 千葉
14. 長田重一 (平成11年9月25日) アポトーシスの分子機構と病気 第41回歯科基礎医学学会学術大会・総会 教育講演 日本歯科大学 東京
15. 長田重一 (平成11年10月8日) アポトーシスとその異常 第72回生化学会大会 教育講演 パシフィコ横浜 神奈川
16. 長田重一 (平成11年10月10日) アポトーシスの分子機構とその異常 第4回金沢神経科学会議 特別講演 金沢
17. 長田重一 (平成11年10月29日) アポトーシスとネクローシスの分子機構 第58回日本脳神経外科学会総会 東京国際フォーラム 東京
18. 長田重一 (平成11年11月4日) Fasを介したアポトーシス 大阪大学蛋白質研究所セミナー 大阪
19. 長田重一 (平成11年11月7日) アポトーシス 第47回日本ウィルス学会 教育講演 パシフィコ横浜 神奈川
20. 長田重一 (平成11年11月29日) 細胞死と病気 山梨科学アカデミー 特別講演 山梨医科大学 山梨
21. 長田重一 (平成11年12月2日) アポトーシスの分子機構 第29回日本免疫学会総会 国立京都国際会館 京都
22. 長田重一 (平成12年2月17日) アポトーシスの分子機構 平成11年度生理学研究所研究会 特別講演 生理学研究所 愛知
23. 長田重一 (平成12年4月12日) アポトーシスの分子機構と病気 第89回日本病理学会 特別講演 大阪国際会議場 大阪
24. 長田重一 (平成12年5月9日) 21世紀における生命科学 金沢大学アイソトープ総合センター開設20周年記念講演会 金沢大学 金沢
25. 長田重一 (平成12年6月27日) 細胞死研究update 平成12年度文部省特定領域研究「神経細胞死制御」ワークショップ 特別講演 軽井沢プリンスホテル 長野
26. 長田重一 (平成12年7月24日) Molecular Mechanism of Apoptosis 萬有創立85周年記念シンポジウム 東京国際フォーラム 東京

27. 長田重一(平成12年8月26日)アポトーシスとサイトカイン 第7回ヘルペス感染症フォーラム 特別講演 大津プリンスホテル 滋賀
28. 長田重一(平成12年10月6日)Fasを介したアポトーシスの分子機構と生理作用 第59回日本癌学会総会 教育講演 パシフィコ横浜 神奈川
29. 長田重一(平成12年10月25日)細胞死制御の遺伝学 日本人類遺伝学会第45回大会 アクロス福岡 福岡
30. 長田重一(平成12年11月21日)細胞の死 平成12年度大阪大学開放講座 メイシアター 大阪
31. 長田重一(平成12年11月25日)アポトーシスの分子機構とその異常 第4回日本心血管内分泌代謝学会総会 教育講演 大阪大学 大阪
32. 長田重一(平成12年12月1日)アポトーシスの分子機構と疾患 第50回日本アレルギー学会総会 特別講演 パシフィコ横浜 神奈川
33. 長田重一(平成12年12月2日)アポトーシスの分子機構 第6回Kyoto Cornea Club 特別講演 京都都ホテル 京都
34. 長田重一(平成12年12月16日)Breakdown of chromosomal DNA in programmed cell death and other process 第23回日本分子生物学会年会 Okazaki Reiji Memorial Lecture 神戸ポートピアホテル 兵庫
35. 長田重一(平成13年1月15日)「アポトーシス」とは 平成12年度現代医学講座 薬業年金会館 大阪
36. 長田重一(平成13年1月20日)「アポトーシス」 平成6年度大阪大学医学部同窓会 特別講演 千里阪急ホテル 大阪
37. 長田重一(平成13年2月25日)アポトーシスにおけるDNAの切断 第19回高峰カンファレンス 品川ホテルパシフィック 東京
38. 長田重一(平成13年3月21日)アポトーシスの分子機構とその異常 第74回日本薬理学会年会 特別講演 パシフィコ横浜 神奈川
39. 長田重一(平成13年3月27日)細胞死の分子機構 第65回日本循環器学会学術集会総会・真下特別講演 国立京都国際会館 京都
40. 長田重一(平成13年3月28日)細胞死の分子機構 日本薬学会第121年会シンポジウム講演 ロイトン札幌 札幌
41. 長田重一(平成13年4月14日)アポトーシスの分子機構 第9回東海ニューロサイエンス研究会 特別講演 名古屋大学 名古屋
42. 長田重一(平成13年5月17日)アポトーシスと肝臓 第37回日本肝臓学会総会 教育講演 パシフィコ横浜 横浜
43. 長田重一(平成13年6月2日)染色体DNAの崩壊の分子機構と生理作用 第1回日本蛋白質科学会大会 特別講演 大阪大学 大阪
44. 長田重一(平成13年6月7日)細胞死の分子機構とその生理作用 2001年度日本放線菌学会大会 特別講演 大阪大学 大阪
45. 長田重一(平成13年6月21日)アポトーシス 医療研究会(洗心会) 特

別講演 リーガロイヤルホテル 大阪

46. 長田重一(平成13年7月2日)細胞の運命を決めるしくみとその異常 大阪府立成人病センター開所記念講演 大阪府立成人病センター 大阪
47. 長田重一(平成13年7月6日)染色体DNAの崩壊の分子機構と生理作用 第8回細胞シグナル伝達研究会 特別講演 大阪医科大学 大阪
48. 長田重一(平成13年9月27日)アポトーシスの分子機構 第60回日本癌学会総会レクチャー パシフィコ横浜 横浜
49. 長田重一(平成13年10月8日)アポトーシスのメカニズム:細胞は何故死ぬ? 日本生物物理学会第39回年会 シンポジウム講演 大阪大学 大阪
50. 長田重一(平成13年10月12日)アポトーシスおよび発生過程におけるゲノムの崩壊 第11回日本耳科学会総会 特別講演 神戸国際会議場 神戸
51. 長田重一(平成13年10月13日)赤血球の核脱におけるDNaseIIの関与 第3回分子血液研究会 特別講演 アプロースタワー 大阪
52. 長田重一(平成13年10月25日)アポトーシス 第24回日本高血圧学会総会 特別講演 大阪国際会議場 大阪
53. 福山英啓、川根公樹、長田重一(平成13年10月28日)赤血球分化におけるDNaseIIの役割 第74回日本生化学大会 シンポジウム講演 国立京都国際会館 京都
54. 長田重一(平成13年11月15日)マクロファージによる赤血球の脱核 第43回日本臨床血液学会総会ランチョンセミナー ポートピアホテル 神戸
55. 長田重一(平成13年11月16日? 17日)アポトーシス:プログラムされた細胞死 第5回熊本大学遺伝子実験施設セミナー 熊本大学 熊本
56. 川根公樹、福山英啓、長田重一(平成13年12月9日)赤血球造血におけるDNaseIIの役割 第24回日本分子生物学会 シンポジウム講演 パシフィコ横浜 神奈川
57. 長田重一(平成14年2月23日)アポトーシスと造血における染色体DNAの分解 第28回 埼玉血液同好会 特別講演 埼玉共連ビル 埼玉
58. 長田重一(平成14年4月11日)アポトーシス 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター開所記念シンポジウム シンポジウム講演 川越プリンスホテル 埼玉
59. 長田重一(平成14年5月14日)アポトーシスと死細胞の貪食 第5回広島大学・広島がんセンター学術講演会 広島大学 広島
60. 長田重一(平成14年5月17日)アポトーシスと赤血球の脱核におけるDNAの分解 第3回Osaka Blood Club シンポジウム講演 ホテル阪急インターナショナル 大阪
61. 長田重一(平成14年5月24日)lprマウス 第49回日本実験動物学会総会 日本疾患シンポジウム シンポジウム講演 名古屋国際会議場 名古屋
62. 長田重一(平成14年6月12日)アポトーシスと死細胞の貪食 第28回日本

急性肝不全研究会 特別講演 大阪国際会議場 大阪

63. 長田重一(平成14年6月14日) アポトーシスと貪食 第106回近畿産科婦人科学会 特別講演 大阪大学 大阪
64. 長田重一(平成14年6月29日) アポトーシスと貪食 第75回日本内分泌学会 Molecular mechanism of apoptotic cell death 特別講演 大阪国際会議場 大阪
65. 長田重一(平成14年7月2日) アポトーシスとその細胞の貪食 日本炎症・再生医学会 特別講演 京王プラザホテル 東京
66. 長田重一(平成14年9月10日) 平成14年度生理学研究会 生理学研究所 岡崎
67. 長田重一(平成14年10月3日) アポトーシス 第61回日本癌学会総会 シンポジウム講演 東京国際フォーラム 東京
68. 田中正人、華山力成、長田重一(平成14年10月15日) 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 第75回日本生化学会大会 シンポジウム講演 京都国際会館 京都
69. 長田重一(平成14年11月1日) アポトーシスと死細胞の貪食 金沢大学がん研究所分子標的薬剤開発センター公開シンポジウム 特別講演 金沢大学 金沢
70. 長田重一(平成14年11月22日) Apoptosis and phagocytosis 九州大学生体防御医学研究所20周年記念国際シンポジウム 九州大学 福岡
71. 長田重一(平成14年12月7日) アポトーシスと死細胞の貪食 第14回分子糖病学シンポジウム 特別講演 大阪サンパレス 大阪
72. 華山力成、田中正人、長田重一(平成14年12月14日) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes 第25回日本分子生物学会年会 シンポジウム講演 パシフィコ横浜 横浜
73. 長田重一(平成14年12月23日) アポトーシス(細胞死)とは 国際歯科学士会2002年度年末集会・特別講演 帝国ホテル 東京
74. 長田重一(平成15年2月6日) 細胞死 大阪バイオサイエンス研究所創立15周年記念シンポジウム 大阪国際会議場 大阪
75. 長田重一(平成15年3月1日) アポトーシスにおける染色体DNAの分解と貪食 第7回遺伝子医療研究会・特別講演 千里ライフサイエンスセンター 大阪
76. 長田重一(平成15年3月19日) 細胞の死 第17回神戸大学大学院医学系研究科学術講演会 神戸大学、神戸
77. 長田重一(平成15年4月6日) アポトーシス 第26回日本医学会総会 シンポジウム講演 福岡サンパレス 福岡
78. 長田重一(平成15年5月31日) アポトーシスと貪食 第50回日本生化学会近畿支部例会 特別講演 大阪大学 大阪
79. 長田重一(平成15年7月29日) アポトーシスと貪食の分子機構 日本免疫

学会 免疫サマースクール2003 淡路夢舞台国際会議場 淡路島

80. 長田重一 (平成15年8月28日) 脱核とその異常 (Enucleation and its failure) 第65回日本血液学会総会・第45回日本臨床血液学会総会 シンポジウム講演 大阪国際会議場 大阪
81. 長田重一 (平成15年9月1日) 細胞は何故、そしてどのように死ぬ 科学技術振興事業団・第9回基礎研究報告会 コクヨホール 東京
82. 長田重一 (平成15年9月29日) 動物の発生過程におけるDNAの分解 平成15年度生理学研究所研究会 生理学研究所 岡崎
83. 長田重一 (平成15年11月28日) アポトーシスにおけるDNA分解とその異常 (DNA Degradation and its Failure in Programmed Cell Death and Other Developmental Processes) 第19回 WAKOワークショップ 全電通ホール 東京

### プレス発表

1. 長田重一 Scienceに掲載された「Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver.」について 文部科学省記者クラブ 東京 平成13年5月22日
2. 長田重一 Natureに掲載された「Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes.」について 文部科学省記者クラブ 東京 平成14年5月7日
3. 長田重一 Natureに掲載された「Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens.」について 文部科学省記者クラブ 東京 平成15年8月27日

(3) 特許出願（国内 4件、海外 1件）

国内

1. 長田重一，DNase II遺伝子機能欠損貧血症モデル非ヒト動物，  
出願番号：特願 2001-116050 出願日：平成13年4月13日
2. 長田重一，生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤および除去阻害剤，  
出願番号：特願 2001-354282 出願日：平成13年11月20日
3. 長田重一、白内障モデル動物  
出願番号：特願 2003-163346 出願日：平成15年6月9日
4. 長田重一、自己免疫疾患モデル動物  
出願番号：特願 2003-394623 出願日：平成15年11月25日

海外

1. 長田重一，生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤および除去阻害剤，  
出願番号：PCT/JP02/12053、出願日：平成13年11月19日

#### (4) 新聞報道等

##### 新聞・雑誌報道

- 「アポトーシス」平成13年1月4日、産経新聞
- 「赤血球の成熟の過程解明」平成13年5月25日、朝日新聞
- 「赤血球の「脱核」促す」平成13年6月11日、読売新聞
- 「Shigekazu Nagata」平成13年7月 Nature Med. 7, 759
- 「先端研究 日本に世界注目 論文の引用数」平成14年1月7日、日本経済新聞
- 「細胞の「自滅」で新現象」平成15年1月13日、日本経済新聞
- 「胎児期に目ができる際 DNA残ると白内障を発症」平成15年8月28日、山形新聞 他

##### 受賞

- 「恩賜賞・学士院賞」平成12年6月
- 「文化功労者顕彰」平成13年11月