〔生化学　第81巻　第9号，pp. 765–779，2009〕

総　説

DNA分解の分子機構及び生理作用

川　根　公　樹

DNAは遺伝情報を担う，生命の根幹たる物質である．しかし，アポトーシスや細胞の分化などにおいて，このDNAを積極的に分解する局面が生体内には存在する．私達はDNA分解という不思議な現象に魅せられ，“どのような機構でDNAは分解されるのか？”“何のためにDNAは分解されるのか？”との素朴な疑問に答えるべく一貫して研究を進めてきた．その結果，遺伝子欠損マウスを用いた解析などにより，生体内では，局面ごとに個々のDNA分解酵素が，他では代替できない形でDNA分解を担っていることを明らかにした．そして，これらDNA分解が妨げられると，致死性貧血，関節リウマチ，リンパ球発生異常，白内障などの疾患をもたらすことを見出し，DNA分解が重要な生理作用であることを証明した．私達の研究により得られた知見を中心に，DNA分解の分子機構，生理作用について紹介したい．

1. はじめに

DNAが分解される．この現象を初めて知ったとき，私の心中には意外だという思いが生じた．DNAから転写されたRNA及び，RNAから翻訳されたタンパク質はいずれも機能を終えると分解される．これに対し，DNAは生命の設計図の原本であるため，半保存的複製によって一旦合成されると，修復や組換えなどの一部の変化を除き，代謝されることなく存在し続ける．つまり，DNAは細胞中で分解されることはないであろうに，というのが意外だと感じた理由の正体である．しかし実際，生体内では，この大事なDNAを積極的に分解している局面が存在する．細胞の死，アポトーシスを起こした細胞では，その染色体DNAが断片化，分解される．私達は，このアポトーシスの時に起こるDNA分解に興味を抱き，研究を始めた．そして，研究が進展していく過程で，アポトーシスのみならず，赤血球の脱核やレンズ細胞の最終分化のステップなどでも自身のDNAが分解されることに着眼するに至った．私達は一貫して，どのような機構でDNAは分解されるのか？なぜDNAは分解されなくてはならないのか？という素朴な問いかけに対して研究を進め，これまでにいくつかの意外な答を明らかにすることができた[1]．すなわち私達は，遺伝子改変マウスの解析などにより，生体内でのそれぞれの局面において，DNA分解を担っている責任酵素を明らかにした．そして，DNA分解が破綻すると，マウスは貧血，関節炎，白内障などの疾患を発症することを示し，DNA分解が生体にとって重要な生理反応であることを証明した．予想外の発見の連続であった一連の研究を振り返り，どのように研究が展開していったのか，当時の思いを交えながら紹介したい．

2. CAD/ICADシステムによるアポトーシス細胞でのDNA断片化

まず，私達の研究のスタートとなったアポトーシスから本稿を始めたい．アポトーシスは秩序だった細胞の死で，生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている[2]．細胞膜上のFas受容体などを介して細胞にアポトーシスを誘導する刺激が加わると，細胞死のシグナルは，アダプター分子Fas-associated death domain（FADD）を経て，カスパーゼと呼ばれる一群のシステインプロテアーゼに伝達され

京都大学大学院医学研究科分子生物学教室（〒606–8501 京都市左京区吉田近衛町）
Molecular mechanisms and physiological roles of DNA degradation
Kohki Kawane（Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe, Sakyo, Kyoto 606–8501, Japan）
本総説は2008年度奨励賞を受賞した．

る．FADDの下流で活性化されたカスパーゼ8は，続いてカスパーゼ3を切断して活性化し，活性化カスパーゼ3が様々な基質を切断することで細胞に死をもたらす[3]．最終的にアポトーシス細胞は，近傍の貪食細胞によって貪食され，速やかに除去される[4]．アポトーシスの特徴として，核の凝集や，細胞膜の表層と内層における構成脂質の非対称性の崩壊などの変化が知られているが，これに加えてDNAの断片化が挙げられる[5]．アポトーシス細胞では，ヌクレオソームのリンカー部分で染色体DNAが切断され，実際，死細胞から抽出したDNAの電気泳動を行うと，ヌクレオソーム単位の整数倍の長さのDNAがはしご状に検出される（**図1B**）．DNA断片化は，アポトーシスの概念が初めて提唱された時から既に報告されていた現象で，以来アポトーシスを判定する基準の一つとされるほどにその重要性が認知されてきた．それにもかかわらず，DNA断片化の分子機構及び生理的意義は依然として不明なままであった．

私が長田重一先生の研究室に修士課程の大学院生として所属した時，ちょうどそこでは，アポトーシス細胞で働くDNA分解酵素caspase-activated DNase（CAD）とその抑制タンパク質inhibitor of CAD（ICAD）の同定がなされたところであった．長田研究室の江成政人，坂平英樹らは，アポトーシス細胞でのDNA断片化が，カスパーゼ3の活性化に依存して起こること，しかしタンパク質分解酵素であるカスパーゼ自体には直接DNAを分解する能力はないことに着目した．すなわちカスパーゼ3によって活性化されるDNA分解酵素（deoxyribonuclease：DNase）の存在を想定し，タンパク質精製によってこれを同定することを試みた．彼らは，非アポトーシス細胞（生存細胞）抽出液を活性化カスパーゼ3によって刺激し，基質として単離核を加えることで，*in vitro*においてアポトーシス時のDNA断片化を再構成することに成功した．そして，このDNA断片化活性を指標に，70gものマウスリンパ節を材料に用いた大変な労力のタンパク精製の末，DNA分解酵素としてCADを単離した[6]．同時に彼らは，生存細胞中にはCADによるDNA分解を抑制する活性が存在することも見出し，抑制活性の責任分子としてICADを同定した[7]．そして両分子の詳細な解析により，DNA分解の分子機構が明らかとなった（図1A）．CADは生存細胞中においては，ICADと複合体を形成し，そのDNase活性は抑制されている．ここにアポトーシス刺激が加わると，カスパーゼ3が活性化され，ICADを切断し，フリーになったCADがDNAの断片化を引き起こす．また，ICADはCADに結合する単なる抑制因子であるだけでなく，分子シャペロンと協調して，リボソームで翻訳されたCADペプチド鎖を機能的な構造に折り畳む働きも有していた[8]．このことは，活性を抑制するICADが存在する状況でしか，CADは機能タンパク質として決して産生されないことを意味し，細胞は，CADが作用することを強く警戒していると解釈できる．染色体DNAの分解は細胞にとって致命的なカタストロフィであり，生命は万全の安全装置とともにCAD/ICADシステムを進化させたのであろう．では，そこまで警戒すべきDNA分解を敢えて実行しなくてはならない必然性とは，一体何なのであろうか？

3. マクロファージ内で働くもう一つのDNA分解機構

私達は，この問いに答を得ようと，CADノックアウト（KO）マウスを作製し，解析を行った．CAD KOマウスより調製した胸腺細胞に，ステロイドであるデキサメタゾンでアポトーシスを誘導した後，細胞から抽出したDNAの電気泳動を行って，DNAの断片化を調べた．すると，CAD KO細胞ではDNAの断片化が完全に抑制されていた（図1B）．加えてパルスフィールド電気泳動を行い，断片化の初期過程に起こると考えられている部分的切断についても解析したが，高分子DNA断片の形成も観察されなかった（図1C）．さらに，アポトーシス細胞として肝細胞や赤血球前駆細胞株を用いたり，アポトーシスの刺激としてFasリガンド，エトポシド等の抗がん剤，紫外線などを用いた場合でも同じ結果が得られた[9]．すなわち，CADは死細胞内でDNA断片化を担う唯一の酵素であり，この結論は細胞や刺激の種類に依存せず，すべてのアポトーシスに普遍的にあてはまると考えられた．

次に私達は，DNA断片化の生理的意義について解析を進めた．生理的意義の一つの可能性として，生命の根幹たるDNAを切断することで細胞に死を誘導していることが考えられた．そこで，アポトーシスの刺激を加えたCAD KO細胞は死を免れているかどうかについて，細胞死の指標の一つであるホスファチジルセリンの細胞膜表層への露出をアネキシンVの結合によって定量した．すると，DNAの断片化が起きないCAD KO細胞でも野生型細胞と同様の効率で，細胞死が起きていることがわかった．従って，DNA断片化は細胞を死にいたらしめるのに必要なわけではないことが判明し，何のためにDNAを切断するのかが，益々大きな疑問となった．私達は，CAD KOマウスが何らかの異常を示すことでその答えが得られるだろうと期待したが，予想に反してCAD KOマウスは顕著な表現型を示さなかった．

その理由として，CAD欠損条件下では完全に抑制されているはずのDNA分解が，実は体内で起きていたことが，長田研究室のMcIlroyらの解析により明らかとなった[10]．彼らは，CADが機能しないマウスにガンマ線を照射して胸線細胞にアポトーシスを誘導した後，摘出した胸腺の組織切片を用いて*in vivo*でのDNAの断片化を解析した．すると，CADの機能しない胸腺においても，DNAの

断片化を検出するTUNEL染色のシグナルが観察され，CADの作用が欠損してもDNAが分解されるという，先述の結果と一見矛盾する像が得られた．しかしこのマウスの胸腺切片を，免疫染色及びTUNEL染色の二重染色によって詳細に解析したところ，すべてのTUNELシグナルは，貪食細胞であるマクロファージの内部に存在しており，DNAの断片化はマクロファージ内でのみ起こっていることがわかった．これに対し野生型ではマクロファージの内部以外にも胸腺全体に渡って多くのTUNELシグナルが観察された．このシグナルは貪食される前の死細胞由来であり，通常死細胞内ではCADが盛んにDNAを分解していることが確かめられた．すなわちCADが機能しないと，死細胞内でのDNA断片化は完全に抑制されているが，貪食された後に，マクロファージのリソソーム内で依然としてDNAが分解されることが明らかとなった．

よって，アポトーシス時のDNA分解には異なる二つの機構が存在することがわかった．死細胞内で働くCADに加え，マクロファージ内に存在する別のDNaseの存在が示唆された．そこで我々が候補として着目したのは，至適pHを酸性側に持ち，リソソームに局在することが知られていたDNaseIIと呼ばれるDNaseである．DNaseIIの線虫ホモログ*nuc-1*に変異を持つ線虫では，アポトーシスを起こした細胞のDNA分解が妨げられるというHorvitzらの報告[11]も，DNaseIIが，私達が探し求めるもう一つのDNaseである可能性を示唆していた．私達は，体内でのDNA分解を完全に阻害するためには，この二つの機構を共に破壊する必要があると考えた．従って，最終的にCAD及びDNaseIIのダブルノックアウトマウス（DKO）を作製することを計画し，DNaseII KOマウスの作製に着手した．

4. DNaseIIが担う，アポトーシス以外でのDNA分解の発見

するとDKO作製を待たずして，DNaseII KOマウスは出生することなく胎生致死であった[12]．発生時期を追跡した解析により，ほとんどのDNaseII KO胎仔は胎生14.5日目（E14.5）からE17.5の間の胎生後期に死亡し，出生後に生存しているマウスは1例も存在しないことがわかった．胎生後期のDNaseII KO胎仔は体色が顕著に白く，重篤な貧血所見を示した（**図2A**）．実際，末梢の全赤血球数は野生型の1/10にまで減少していた．アポトーシスのDNA分解に関与すると考えられたDNase欠損の結果，貧血を呈し胎生致死となるという予想外の結果が得られ私達は戸惑ったが，赤血球造血に異常をきたしている可能性を考え，解析を進めることにした．

胎生期の造血は，E8.0頃から開始される胎仔型造血とE12.0頃から胎仔肝臓で行われる成体型造血（成体での造血も引き続きこのタイプであるのでこう呼ばれる）の二つが存在する．胎仔型造血では，形成される赤血球は胎生型ヘモグロビンを持つが，成体型造血では成体型ヘモグロビンを持つ．加えて，胎仔型造血で形成される赤血球は他の体細胞と同様，核を有するのに対し，成体型造血で形成される赤血球に核は存在しない．成体型造血では，赤血球前駆細胞から赤血球が最終分化する際に，脱核とよばれる現象によって核が放出されるからである．DNaseII KOでの貧血所見はE12.5付近では明らかでなく，E14.5以降から発現し徐々に重篤化するので，胎仔肝臓での成体型造血に異常を生じている可能性が考えられた．私達はまず，DNaseII KO胎仔肝臓において酸性DNaseの活性が消失しているかを調べた．胎仔肝臓の組織抽出液にプラスミドDNAを加え，酸性条件化で反応させたところ，野生型からの抽出液は強いDNase活性を示した．これに対し，DNaseII KO胎仔肝臓からの抽出液ではこの活性が消失していた（図2B）．この結果より，DNaseII KOマウスではリソソームにおけるDNA分解能力が著しく低下していることが予想され，私達は，このマウスでDNAの分解不全が起きている可能性を期待した．そこでE14.5における胎仔肝臓の組織切片を作製し，組織学的解析を行ったところ，KOの胎仔肝臓では，野生型では決してみられない巨大な細胞が，組織一面に多数観察された．マクロファージのマーカーであるF4/80に対する免疫染色の結果，この細胞は異常に肥大化したマクロファージであると判明した．そして，DNAを特異的に染色するフォイルゲン染色を行ったところ，細胞内部が強く染色され，大量のDNAが存在することが示された（図2C）．電子顕微鏡を用いてこの細胞を詳細に解析した結果，細胞内部には，DNAで満たされたリソソームが多数観察された．成体型造血がさかんに行われている胎仔肝臓では夥しい数の脱核された核が処理される必要がある．よって，DNaseII KOマウスで観察される肥大化したマクロファージは，赤血球前駆細胞から脱核された核を貪食したものの，核DNAを分解することができず，リソソームに蓄積したものと結論された．

赤血球造血において，赤血球前駆細胞及び赤血球にDNaseIIが必要なわけではないことを確かめる目的で，造血幹細胞を含む胎仔肝臓の細胞を，ガンマ線照射した野生型マウスに移植する移植実験を行った．ホストマウスは，移植なしでは造血幹細胞が死滅しているため，造血不全で死亡する．しかし，野生型マウスの胎仔肝臓細胞を移植すれば，幹細胞が生着して造血を行うため，ホストマウスは生存する．ここで，DNaseII KOマウスからの胎仔肝臓細胞を用いて移植を行っても，ホストマウスは生存した．さらにこのホストマウスの末梢血細胞のマーカー解析により，DNaseII KOドナー細胞に由来する赤血球が確かに存在することが確認された．これらより，DNaseIIを欠損す

る赤血球前駆細胞でも正常な環境下では増殖及び赤血球へ分化する能力を有することがわかった．赤血球造血は造血島と呼ばれる構造で行われることが知られている．造血島では，中央に一つのマクロファージが位置し，多くの赤血球前駆細胞がマクロファージと接着を保った状態で増殖，分化する．このことからもマクロファージが造血を制御する可能性は十分あり得ると考えられた．よって，移植実験の結果は，このマウスでの造血異常が，赤血球自体の異常によるものではなく，DNaseII 欠損の結果，未分解 DNA を蓄積したマクロファージに起因するという考えを強く示唆した．

以上より，赤血球が成熟する際に脱核された核はマクロファージに貪食され，その核 DNA は DNaseII の働きによって分解されることがわかった（図 2D）．脱核過程は細胞死ではないため，CAD は活性化されず DNaseII が一手にその分解を担う．DNaseII が欠損すると，マクロファージのリソソームに未分解 DNA が蓄積し，赤血球前駆細胞の分化，増殖が妨げられて赤血球の発生不全が起きると結論した．この結果は，DNA の分解が血球細胞，ひいては個体の発生に必須な役割を果たしていることを明らかにした初めての報告となった．それでは，なぜマクロファージに DNA が蓄積すると造血が妨げられるのか？　その理由が明らかになったのはさらに解析の進んだ後のことであり，本稿でも，もう少し後の部分で詳しく述べたい．

5. 再びアポトーシスにおける DNA 分解

赤血球分化過程での脱核についての発見は，私達にとってまったく予期し得ぬものであり，逆遺伝学の威力と醍醐味を十分享受する結果となったと言える．私達はここで再び当初の目的に立ち返って，アポトーシス時の DNA 分解について研究を進めることにした．アポトーシス時の DNA 分解は CAD 及び DNaseII 双方によって担われているという私達の仮説を検証するため，マクロファージに死細胞を貪食させて，マクロファージ内の DNA の蓄積を調べる，*in vitro* の貪食–DNA 分解実験を行った．図 1B の DNA 分解を調べた実験では，培養系には死に行く細胞しか存在しないが，この実験では貪食細胞を役者として加えることで，生体内での DNA 分解がより忠実に再現される（死細胞内でも貪食細胞内でも DNA 分解が行われる）系を構築した．具体的には，野生型もしくは CAD KO マウスより調製した胸線細胞にアポトーシスを誘導し，野生型もしくは DNaseII KO 胎仔の胸腺から調製したマクロファージと共培養して貪食及び DNA 分解を行わせた[13]．その後，マクロファージをフォイルゲン染色により染色し，細胞内の DNA の蓄積を調べた（**図 3A**）．野生型マクロファージでは，貪食した死細胞由来の DNA は速やかに分解されるため，死細胞が野生型，CAD KO いずれの場合でも DNA の残存はほとんどみられない．一方，DNaseII KO マクロファージに貪食させた場合，死細胞が野生型であってもマクロファージ内に DNA の残存がみられた．この時，さらに死細胞に CAD KO 細胞を用いると DNA の蓄積は一層顕著となり，DNaseII KO マクロファージ内部は未分解 DNA で満たされてしまった．この結果は私達の仮説を強く支持した．

そこで，生体内においても CAD と DNaseII がアポトーシス時の DNA 分解を担っていることを証明するため，交配により CAD/DNaseII DKO マウスを作製し，解析を行った[13]．すると T 細胞のセレクションの過程で大量のアポトーシスが起こる胸線において，DNaseII KO（DNaseII single KO を表す），CAD/DNaseII DKO のいずれにおいても DNA をリソソームに蓄積して肥大化したマクロファージが多数観察された．続いて，電子顕微鏡を用いて詳細に観察を行ったところ，DNaseII KO，DKO のマクロファージでは，蓄積された DNA の形状に相違があることがわかった（図 3B）．DKO ではリソソーム内に繊維状の構造物が観察され，未分解の高分子 DNA が蓄積していると考えられるのに対し，DNaseII KO では蓄積物は粒子状であり，切断を受けた DNA が蓄積していることを表していた．DNaseII KO では，死細胞が貪食される前に CAD の作用で DNA はヌクレオソーム単位にまで分解されるが，マクロファージに貪食された後はそれ以上分解が進まず，断片化された状態でリソソームに蓄積するためと結論した．以上の結果より，生体内においてアポトーシス時の DNA 分解は死細胞内の CAD と貪食細胞内の DNaseII が協調的に担っていることが証明できた（図 3C）．

では，胸線においてアポトーシス由来の DNA が蓄積すると，生体に何らかの不都合が生じるのだろうか？　野生型，CAD KO，DNaseII KO，CAD/DNaseII DKO の四者で，E17.5 の胸線の大きさを比較すると，CAD KO では野生型と差はないが，DNaseII KO の胸線は野生型より小さく，DKO ではさらに矮小化していた（図 3D）．実際，含まれる胸線細胞の数も，DNaseII KO では野生型の 30%，DKO では 12% にまで大きく減少していた．この表現型は 4 者における DNA の蓄積の度合いによく相関しており，アポトーシス由来の DNA 蓄積によって T 細胞の発生が妨げられたと考えられた．これによって私達は，アポトーシスでの DNA 分解の不全が生体の恒常性を乱すことを遂に明らかにし，アポトーシスでの DNA 分解が生体にとって重要な生理反応であることを証明できたわけである．加えてこの結果は，アポトーシスでは，ただ細胞が死ぬだけでは不十分で，死後に適切に処理される過程も同等に重要であるとの考えをもたらし，細胞死の理解に新たな側面を加えることとなった．

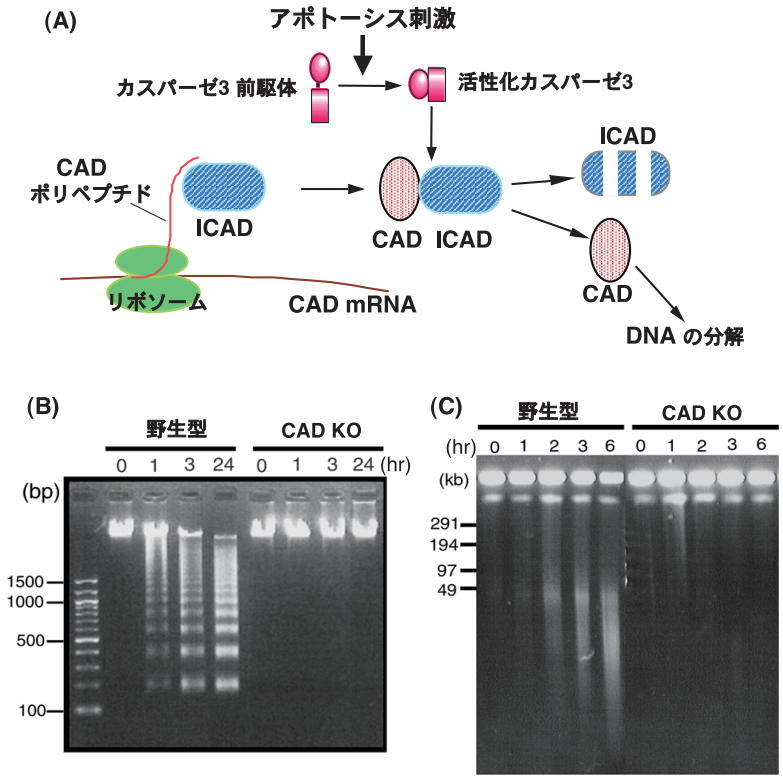


図1　CAD/ICAD システムによる DNA 断片化
(A)CAD/ICAD システムの模式図．(B)(C)野生型または CAD KO 胸腺細胞にデキサメタゾンでアポトーシスを誘導した後，経時的に DNA を抽出し，電気泳動によって DNA の断片化を調べた．(B)ではコンベンショナルなアガロース電気泳動により，ヌクレオソームユニットへの断片化を検出．(C)ではパルスフィールド電気泳動を用い，ラージスケールでの DNA 断片化を検出．

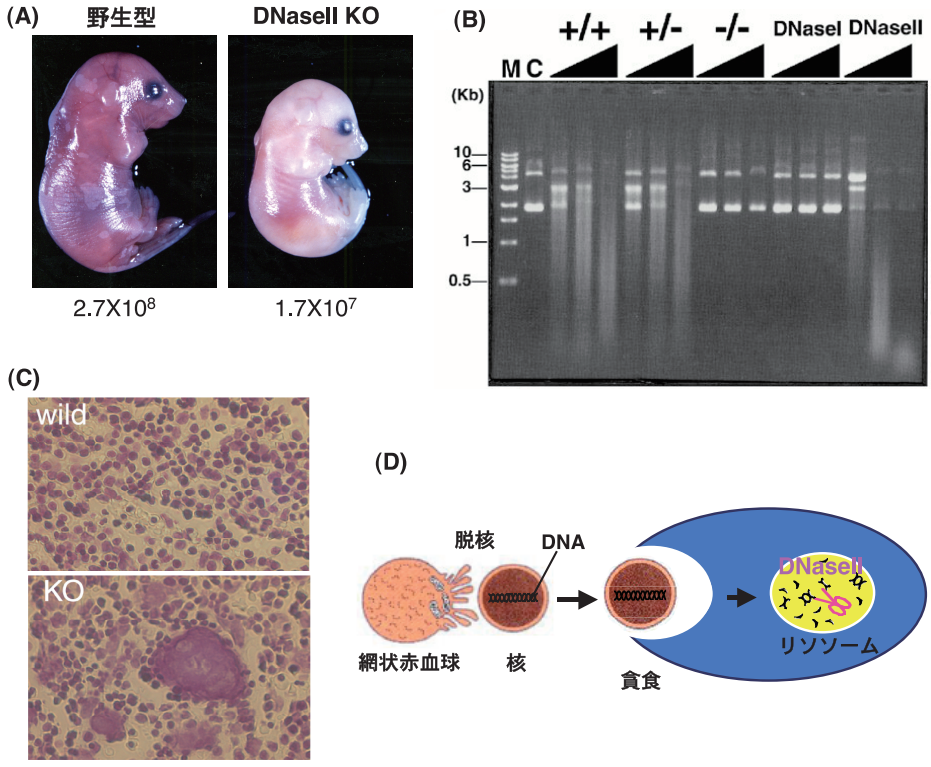


図2　DNaseII は赤血球前駆細胞より脱核された核 DNA の分解を担う
(A)E17.5 における野生型，DNaseII KO 胎仔の写真．写真の下には末梢の全赤血球数を示す．(B)胎仔肝臓の組織抽出液に含まれる酸性 DNase 活性の測定．DNaseII +/+，+/−，−/−マウスの胎仔肝臓抽出液もしくはウシ DNaseI タンパク質もしくはブタ DNaseII タンパク質（それぞれについて3点のタンパク質濃度で測定）に，プラスミド DNA を加え，EDTA 存在化の酸性条件で反応させた後，DNA を電気泳動した．この実験条件下では，中性 DNase である DNaseI の活性は検出されず，酸性 DNase の DNaseII の活性を強く検出することがわかる．M：DNA サイズマーカー，C：未分解プラスミドをコントロールとして泳動（C)E14.5 における野生型，DNaseII KO 胎仔肝臓切片をフォイルゲン染色した．DNA が特異的に紫に染色される．KO では肥大化したマクロファージ内部に大量の DNA が存在する．(D)脱核された核 DNA 分解の模式図．脱核された核はマクロファージによって貪食され，DNaseII の働きで完全分解される．

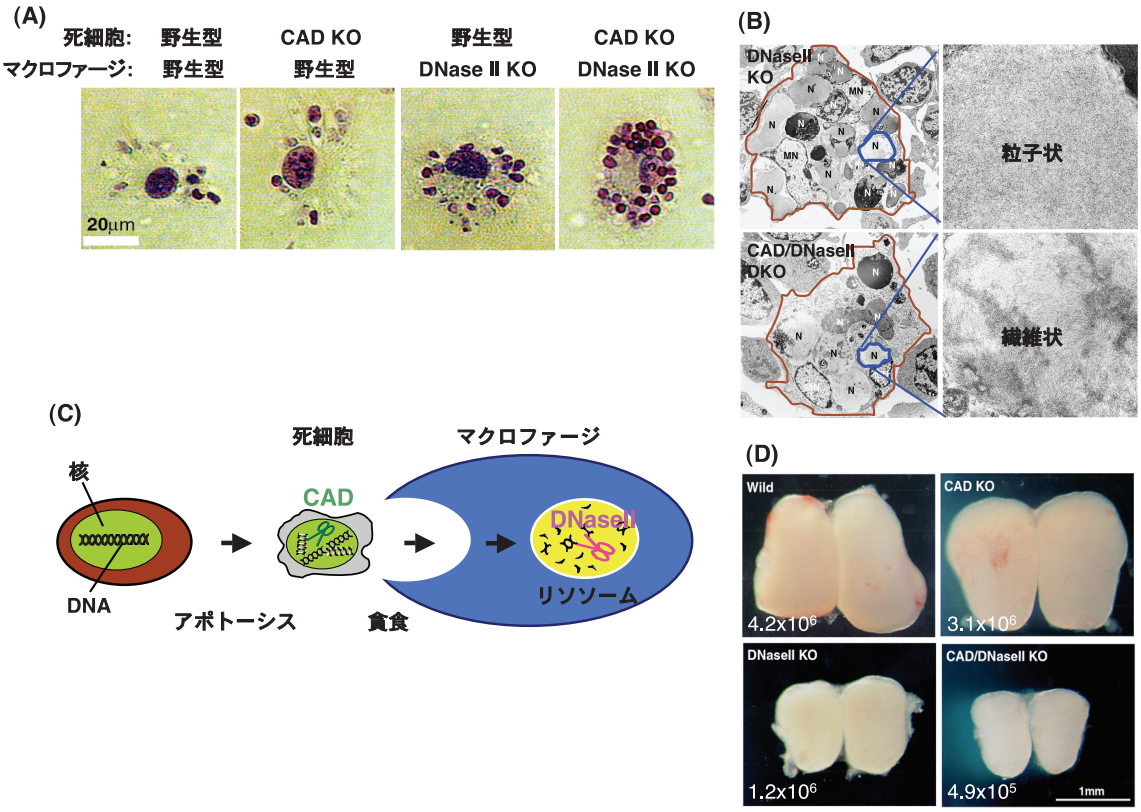


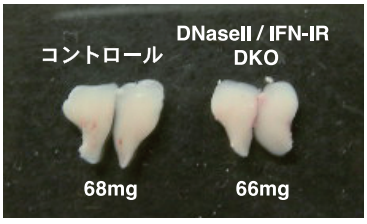
図 3

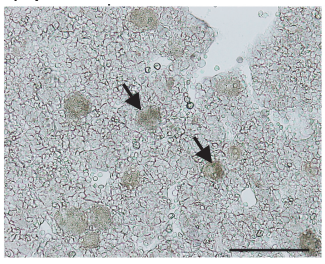
(A)

遺伝子名	発現増加量（DNaseII KO / 野生型）
IFN-γ -inducible GTPase	31.0 倍
IFN-inducible chemokine IP10	27.7 倍
2'-5'oligo(A) synthetase	17.5 倍
serum amyloid A3	16.6 倍
IFN regulatory factor (IRF-7)	16.2 倍

(B)

遺伝子型	IFN-β	DNA蓄積	胸腺細胞数
WT	1.0	なし	100
CAD KO	1.9	なし	74
DNaseII KO	8.1	断片化DNAが蓄積	30
CAD/ DNaseII KO	86.3	未分解DNAが蓄積	12





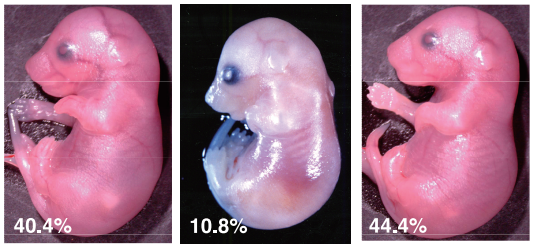


図 4

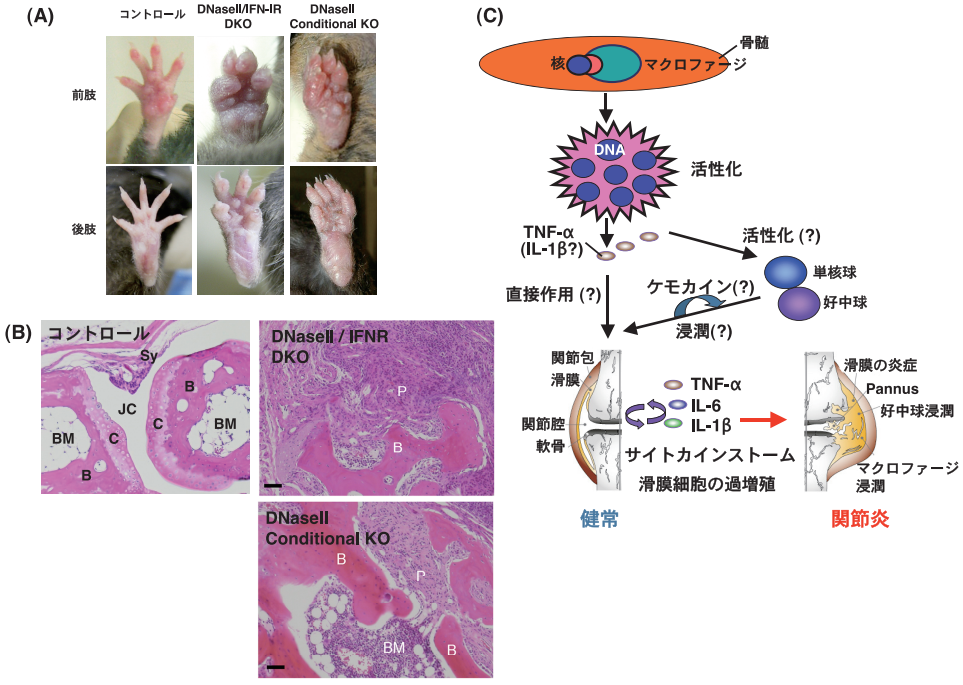


図 5　成体での DNaseII 欠損は関節炎を引き起こす

(A)10 カ月齢以上を経過した各遺伝子型マウスの前後肢の写真．(B)10 カ月齢以降の各遺伝子型マウスの関節部組織切片を HE 染色した．健常状態（コントロールマウス）では，2 本の骨の間には関節腔が存在し，数層の細胞からなる滑膜が関節を囲んでいる．DNaseII 欠損では pannus（炎症性肉芽組織）が形成され激しい炎症が起きている．B；骨，BM；骨髄，C；軟骨，JC；関節腔，P；pannus, Sy；滑膜（C)DNaseII 欠損マウスでの関節炎発症のモデル図．図の一部に文献 45）の図を改変したものを転載．

図 3　CAD と DNaseII が協調的に，アポトーシス細胞の DNA 分解を担う

(A)*in vitro* 貪食–DNA 分解アッセイ．アポトーシスを誘導した胸腺細胞とマクロファージを 3 時間共培養後フォイルゲン染色した．用いた死細胞とマクロファージの遺伝子型を示し，それぞれのパネルに，代表的な一つのマクロファージの像を示す．細胞中央の大きなシグナルはマクロファージの核 DNA．小さなシグナルは貪食した死細胞由来の DNA．(B)DNaseII KO, CAD/DNaseII DKO の E16.5 胸腺における，DNA を蓄積したマクロファージの電子顕微鏡写真．データは大阪大学医学部第一解剖学教室　内山安男先生（現　順天堂大学）の研究室との共同研究によって得られたものである．茶色の線で囲まれるのが肥大化した一つのマクロファージ．青の線で囲んだ一つのリソソームの拡大像を右のパネルに示した．拡大像では，両遺伝子型における蓄積された DNA の形状の違いがわかる．MN；マクロファージの核，N；貪食した死細胞由来の核 DNA（C)アポトーシス時の DNA 分解の模式図．(D)E17.5 各遺伝子型胎仔の胸腺の写真．パネル内部には，含まれる胸腺細胞の数を示す．

図 4　マクロファージの産生する IFN-β が血球細胞の発生阻害を引き起こす

(A)E14.5 胎仔肝臓から調製した RNA を用いた gene-array 解析の結果．DNaseII KO では，IFN によって遺伝子発現が誘導される遺伝子群が強く発現していた．代表的ないくつかの遺伝子において，野生型マウスでのシグナルを 1 とした時の DNaseII KO マウスでのシグナルの増加を表に示した．(B)各遺伝子型の E17.5 胸腺における IFN-β 遺伝子の発現．野生型マウスでの発現量を 1 とした時の相対値を示し，胸腺での DNA 蓄積の状態，胸腺に含まれる細胞数（野生型を 100 とした時の相対値）を，表に並べて比較した．IFN-β 遺伝子の発現パターンは DNA 蓄積の程度，T 細胞発生阻害の程度とよく相関する．(C)E14.5 DNaseII KO 胎仔肝臓切片に対し，IFN-β アンチセンスプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．茶色が IFN-β のシグナルを示している．DNA を蓄積して肥大化したマクロファージが IFN-β を発現していることがわかる（矢印）．(D)E17.5 におけるコントロールマウス，DNaseII KO マウス，DNaseII/IFN-IR DKO マウスの写真．パネル内部にはヘマトクリット値（血液中の赤血球容積を表す）を示す．(E)生後のコントロールマウスと DNaseII/IFN-IR DKO マウスにおける胸腺の写真．胸腺の重量を下に示す．

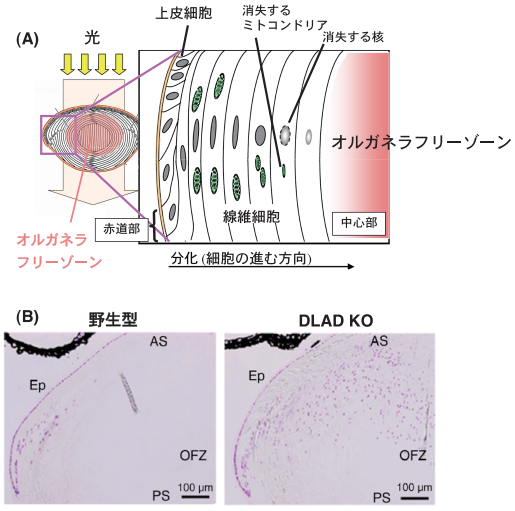


図 6　レンズ線維細胞での DNA 分解は DLAD が担う

(A)レンズにおける線維細胞の終末分化と細胞内小器官の分解の模式図．図の一部に文献 46）の図を改変したものを転載．(B)野生型，DLAD KO マウスにおけるレンズ切片のフォイルゲン染色像．AS；前方，Ep；上皮組織，PS；後方，OFZ；オルガネラフリーゾーン

6. 未分解DNA蓄積と血球細胞発生異常をつなぐもの

ここまでで，赤血球分化時の脱核由来DNA分解はDNaseIIが，アポトーシス由来のDNA分解はCADとDNaseIIの双方がそれぞれ担っていることがわかった（図2D，図3C）．二つの異なる局面でのDNA分解に共通項として見出せることは，分解が妨げられると，未分解DNAがマクロファージ内に蓄積するということである．そして，胎仔肝臓では赤血球，胸腺ではT細胞と，細胞種は異なるものの，いずれもDNAを蓄積したマクロファージ近傍に存在する血球細胞の発生が妨げられるということである．私達は，この赤血球，T細胞の発生不全はともにDNAを蓄積したマクロファージを起因とし，同一の機構を介して起こっている可能性を考えた．では，なぜ自己由来のDNAの蓄積が血球細胞の発生を妨げるのだろうか？その機構が次に明らかにすべき私達の疑問となり，研究は新たなステップへと展開した．

その機構について，私達は二つの可能性を考えた．一つは，通常マクロファージは血球細胞の増殖，分化，生存などを促進する働きを有しているが，DNAを蓄積したマクロファージは機能不全に陥り，このサポート能力が失われたという仮説である．もう一つの可能性は，DNAの蓄積が何らかの刺激となり，マクロファージにストレス反応もしくは活性化を惹起した結果，血球細胞を傷害する作用をもたらしたという仮説である．この二つの可能性を検証し，血球細胞の発生が妨げられた機序にヒントを得るため，私達はDNAの蓄積した臓器における遺伝子発現の変化を網羅的に解析した．すなわち，赤血球発生が抑制されているDNaseII KOの胎仔肝臓を用いてgene-array解析を行った[14]．すると，DNaseII KO胎仔肝臓では，インターフェロン（IFN）によって誘導される一群の遺伝子が強く発現している結果が得られ，私達は驚いた．例えば，DNaseII KOにおいて，IFN-γ-inducible GTPaseは野生型と比較して31倍に，IFN誘導性ケモカインであるIP10は27.7倍にも発現上昇していた（**図**4A）．そこで，IFN自身の遺伝子発現が誘導されているかどうかを，ノーザンハイブリダイゼーションによって調べたところ，DNaseII KOではIFN-β，IFN-γの発現が上昇していた．IFNは抗ウイルス作用を持つ，自然免疫の代表的なサイトカインであり，DNaseII KOの胎仔肝臓では自然免疫が活性化されているという予期せぬ事実が明らかとなった．IFNは臨床で投与された場合，しばしば貧血の副作用を伴うことが報告されている．IFNが赤血球造血に及ぼす影響を調べるため，マウス胎仔肝臓より調製した赤血球前駆細胞に，IFN-βもしくはIFN-γを添加し，48時間培養後の生細胞数を測定した．その結果，IFN-γでは増殖抑制効果はそれ程顕著ではなかったが，IFN-βを添加した場合，濃度依存的に増殖抑制効果がみられた．これらより，DNaseII KOマウスでの造血異常にIFN-βが関与していることが示唆され，二つの仮説のうちの後者が正しいのではないかと考えられた．

次に，胸腺でのT細胞の発生抑制にもIFN-βが関与している可能性を検討した．IFN-βはT細胞に対しても，発生過程の細胞増殖を$CD25^+CD44^-$プレTステージで抑制することが報告されている．DNaseII/CAD DKOマウスのE17.5胸腺に含まれるT細胞の分化段階をフローサイトメトリーで解析したところ，プレTステージ付近で発生が抑制されている結果が得られた[13]．さらに，胸線におけるIFN遺伝子の発現をリアルタイムPCRによって定量し，野生型，CAD KO，DNaseII KO，CAD/DNaseII DKOの四者で比較した[13]（図4B）．IFN-αの発現は四者において有意な差は認められなかった．IFN-γは，DNaseII KO及びCAD/DNaseII DKOで野生型の約10倍の発現上昇がみられたが，両者の間に差は認められなかった．これに対し，IFN-βの遺伝子発現は，CAD KOでは野生型と差はないが，DNaseII KOでは野生型の8倍，さらにDKOでは80倍もの大きな上昇がみられた．四つの遺伝子型におけるIFN-βの遺伝子発現のパターンは，それぞれにおけるDNAの蓄積及び，T細胞発生抑制のパターンとよく相関していた．

以上の結果より，赤血球及びT細胞の発生を抑制している原因は，共にIFN-βの過剰産生であることが強く示唆された．そこで，IFN-βを産生している細胞を同定するため，DNAの蓄積した胎仔肝臓で，*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったところ，DNAを蓄積したマクロファージがIFN-βを発現していることがわかった[14]（図4C）．さらに先述の*in vitro*貪食–DNA分解の系（図3A）においても検討を行ったところ，CAD KO死細胞を貪食して未分解DNAを蓄積したDNaseII KOマクロファージでは，IFN-βの遺伝子発現が上昇することが確認できた[15]．この結果は，DNaseII KOマクロファージによるIFN-βの産生が，他の細胞を介すなどいくつかの反応を経た後の二次的反応ではなく，未分解DNAの蓄積によってマクロファージに直接誘導される反応である可能性を強く示唆した．

産生されたIFN-βの作用が血球細胞発生抑制の原因であることを遺伝学的に証明するため，IFNのレセプターとDNaseIIのDKOマウスの作製を行った[14]．IFN-βのレセプターであるtype-I IFN receptor（IFN-IR）が野生型である場合，DNaseII KOマウスは決して誕生しないが，DNaseII/IFN-IR DKOマウスは，何とほぼメンデルの法則に従って誕生した．E17.5のDNaseII/IFN-IR DKOマウスは，野生型と比較しても，体色，ヘマトクリット値ともに差はなく，赤血球造血が正常レベルにまで回復していた（図4D）．また，生後の胸線の大きさもDNaseII/IFN-IR

DKOと野生型との間に差は認められず，T細胞発生抑制の異常も同時に解除されていた（図4E）．一方，IFN-γのレセプターであるtype-II IFNRとDNaseIIのDKOマウスは誕生することはなかった．以上の結果により，DNA分解不全によって起こる病態の機序が次のように明らかとなった．赤血球の脱核由来のDNAが分解されずにマクロファージに蓄積すると，マクロファージは活性化され，IFN-βを産生する．産生されたIFN-βは赤血球前駆細胞に細胞傷害性を示し，貧血の結果マウスは死亡する．アポトーシス細胞のDNAがマクロファージに蓄積すると，ここでもIFN-βが産生され，T細胞の発生を抑制する．従って，このDNAは完全に自己の分子でありながら，分解されるべき局面で分解されないと自然免疫を活性化して血球細胞の発生を妨げることが明らかとなった．自己DNAが自然免疫を活性化させる分子機構については現在も不明な点が多く残されているが，後の章でいくらか議論したい．

7.　成体では，DNaseIIが欠損すると関節炎を発症する

IFN-βがキーファクターであることを示し，DNA分解不全によって起こる異常の機序が明らかとなることで，私達の疑問に対する答は得られた．しかし一方で，DNaseII遺伝子の欠損はマウスに胎生致死をもたらすため，成体（adult stage）での解析を不可能にしていた．私達は，成体でのDNaseIIの働きも知りたいと考え，二つの系統の遺伝子改変マウスを用いることにした．一つは先述のDNaseII/IFN-IR DKOマウスである（図4D）．このマウスでは致死性貧血が解除されており成体での解析が可能となった．これに加え，Mx1-Cre/loxPシステムを用いた，薬剤誘導型のDNaseIIコンディショナルKOマウス（CKO）を作製した．このマウスはpoly(I)：poly(C)を腹腔内投与すると，Creリコンビナーゼが発現し，不可逆的にDNaseII遺伝子を破壊する．生後1カ月の時点でpoly(I)：poly(C)を投与することにより，多くの組織でDNaseIIを欠損する成体マウスを得た．

私達は，DKO及びCKOではいずれも観察を続けるにつれて前肢と後肢の末端が腫脹してくることに気づいた[16]（**図5A**）．腫脹は加齢とともに増悪化し，指が変形するとともに，関節部の可動性が著しく低下した．この所見は，DKOでは生後2カ月前後から観察され，6カ月までには全例で腫脹が認められた．CKOにおいてもpoly(I)：poly(C)投与後，同様のタイムコースでこの異常が観察されたので，この腫脹はDNase II遺伝子単独欠損の効果によるものと結論した．この2系統のマウスは同一の表現型を示したことより，以降，本稿では二つを併せてDNase II欠損マウスと表記する．私達は，このマウスがヒト関節リウマチ（rheumatoid arthritis：RA）に類似した関節炎を発症しているのではないかと考えた．RAは，人口の約1%近くが罹患する社会的に重大な慢性炎症性疾患である[17]．RAでは，関節を覆う滑膜組織の滑膜細胞が過増殖し，pannusとよばれる肉芽様の炎症組織を形成する．炎症は慢性的に進行し，軟骨，骨が破壊され，関節部において可動性低下や強い痛みなどがもたらされる．RAの原因については不明の点が多いが，T細胞やB細胞，炎症性サイトカインなどが関与する自己免疫疾患と考えられている．

そこで私達は，DNase II欠損マウスの関節部の組織切片を用い，組織学的解析を行った（図5B）．DNase II欠損マウスでは滑膜細胞が過増殖し，そこにリンパ球，マクロファージ，好中球などの免疫細胞も浸潤しており，pannusが形成されていた．pannusは関節腔を埋め尽くし，浸食の結果，軟骨は消失していた．骨も激しく破壊され，骨髄と骨外部が貫通している部位も認められた．これら組織像はヒトRAの病理像によく類似していた．

RAでは関節の炎症部位で，大量の炎症性サイトカインが産生されることが報告されている．そこで，DNase II欠損マウスの関節組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現を，リアルタイムPCRによって定量した．すると欠損マウスでは，正常マウスに比べ，TNF-αが10倍，IL-1βが20倍，IL-6が100倍にも大きく発現上昇しており，激しい炎症が起きていることを裏付けると共に，このマウスでみられる関節炎がヒトRAに類似していることをさらに支持した．

次に，なぜDNase II遺伝子の欠損で関節炎が起こるのか，その原因を探った．未分解DNAを蓄積した器官が発症に関与している可能性を考え，様々な組織の検索を行ったところ，脾臓や骨髄などの造血器官においてDNAを蓄積したマクロファージが多数観察された．赤血球前駆細胞由来のDNAが蓄積していると考えられ，胎生期のみならず成体においても，DNaseIIが脱核由来のDNA分解を担っていることがわかった．そして，DNase II欠損マウスの骨髄，脾臓ではTNF-α遺伝子の発現が，野生型マウスに比べ約2倍に上昇していることを見出した．この上昇は，四肢の腫脹が観察され始める時期である2.5カ月齢以前から既に観察された．加えて血清中に含まれるTNF-αの濃度をELISAにより測定したところ，野生型マウスでは検出限界（20 pg/ml）以下なのに対し，欠損マウスでは，やはり2.5カ月齢以前から約100 pg/mlに達するTNF-αが検出された．さらに，骨髄切片を用いた免疫染色を行った結果，DNAを蓄積したマクロファージがTNF-αを産生していると結論した．

TNF-αはRA発症において重要な役割を果たしている代表的な炎症性サイトカインであり，TNF-αトランスジェニックマウスが関節炎を発症する[18]ことからも，RA発症のトリガーとなりうると考えられている．DNaseII欠損マウスにおいて，TNF-αが関節炎発症に関与しているかを

明らかにするため，TNF-αに対する中和抗体を，まだ腫脹が観察されない1カ月齢の時点から欠損マウスに投与し，発症に与える影響を調べた．PBS投与DNaseII欠損マウスでは2カ月から3.5カ月齢の間に四肢の腫脹が観察されたが，中和抗体を投与したDNaseII欠損マウスでは明確な腫脹は観察されなかった．また，炎症の重篤度の指標となる，血清中のMMP-3（matrix metalloprotease-3）濃度を測定したところ，PBS投与群では野生型の4倍に上昇しているのに対し，抗体投与群では上昇はみられなかった．すなわち，抗TNF-α中和抗体の投与は，このマウスでの関節炎発症を抑制することがわかった．抗体投与の実験が一過的な効果をみているにすぎない可能性を否定するため，DNaseII/IFN-IR/TNF-α三重欠損（triple KO：TKO）マウスを作製し，長期的な経過観察を行ったところ，生後12カ月齢の時点でも関節炎の発症はほとんど観察されず，TNF-αが発症に必須な役割を果たしていることを証明した（未発表）．

RAでは，B細胞，T細胞といった獲得免疫が発症に関与していると考えられている．そこで，機能的なB細胞及びT細胞を共に欠損するRag2欠損マウスとの交配を行い，DNaseII/IFN-IR/Rag2三重欠損マウスを作製したところ，Rag2欠損下においても関節炎は発症した（未発表）．すなわち，このマウスでの関節炎は獲得免疫非依存性であることがわかった．この結果は同時に，最近RAへの関与が注目されているTh17細胞及びIL-17も発症に必須ではないことを意味している．

以上より，DNaseII欠損マウスで関節炎が発症する機構は次のように考えられる[19]（図5C）．赤血球造血時の脱核由来DNAが分解されずに脾臓や骨髄のマクロファージに蓄積した結果，マクロファージは活性化されてIFN-βのみならず，TNF-αを産生する．TNF-αは現時点における発症のトリガーの有力候補である．TNF-αは血流にのって体内を循環し，炎症刺激に対して感受性が高いと考えられている関節の滑膜細胞を刺激する．この結果，滑膜細胞の増殖が促されると共に炎症性サイトカインやケモカインの産生が誘導され，滑膜炎の引き金が引かれる．あるいはTNF-αの作用は滑膜細胞に直接的なものだけではなく，単核球，好中球などを活性化させ，滑膜組織に浸潤させることでも炎症に寄与しているかもしれない．いずれにせよ，こうしてTNF-α，IL-1β，IL-6などの炎症性サイトカインが互いに互いの産生を増幅しあう，サイトカインストームと呼ばれる状態が関節に形成されて炎症は増悪化し，最終的に骨破壊に至る重篤な関節炎を導くと結論した．TNF-αのみならずIL-6，IL-1βなどの炎症性サイトカインも病態に深く関わっている可能性が十分考えられる．DNAを蓄積したマクロファージにおいてIL-6，IL-1βの産生が亢進していないか，及びこれらサイトカインのブロックが発症を抑制する効果を持つか，現在解析を続けている．

DNaseII欠損マウスの解析の結果より，成体においてもDNA分解が恒常性の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにできた．また，根本原因が未だ明らかでない関節炎において，DNAの分解異常という思いもよらない現象が，発症の原因となり得る可能性を示した．DNaseII欠損マウスは，C57BL/6，C57BL/6及び129の混在，BALB/cなど複数の遺伝背景（系統）で発症が観察される．これまでに報告されている関節炎モデルマウスでは，発症が遺伝背景に依存する事例が多いことを考えると，DNaseIIの欠損は，発症に対する強いリスクファクターということができる．最近，ドイツのグループが，ヒトDNaseII遺伝子近傍の一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）を解析したところ，RA患者では，DNaseII遺伝子の5′領域に存在するSNPを両アレルに持つ確率が，非RA対照群の2倍高頻度でみられるという結果を報告したこと[20]は注目に値する．RA患者において，DNAの分解異常やマクロファージの恒常的な活性化が発症のリスクファクターの一つであるかどうか，今後慎重に検討する必要があるだろう．そして，DNaseII欠損マウスでの関節炎は獲得免疫非依存的で，サイトカイン依存的であることがわかった．このことはT細胞，B細胞の関与が重要と考えられているRAにおいて，実はマクロファージや自然免疫の活性化のみでも発症を成立させ得るという可能性を示唆する．近年，自己抗原が存在せず，自然免疫やサイトカイン産生の異常により発症する免疫疾患がクローズアップされ，自己炎症性疾患という枠組みが提唱されている[21]．RAは，多様な原因及び機序により発症する，ヘテロな疾患の集合体と考えられている．RAの一部の群が，自己炎症性疾患の基準をみたす可能性があるのではないだろうか．RAの原因や発症機序については未だに不明な点が多く残されている．DNaseII欠損マウスは，ヒトのRAと類似した特徴を持つ優れた疾患モデル動物として，発症機構の解明や新規治療法の開発に貢献することが期待される．

8. 未分解DNA蓄積からのシグナル伝達機構

致死性貧血及び胸腺発達阻害，または関節炎において，発症のキーファクターであるIFN-β，TNF-αはいずれもDNAを蓄積したマクロファージが産生していると考えられるが，自己DNAの蓄積がサイトカイン産生を誘導する機構は一体何であろうか？　自己DNA蓄積によるシグナル伝達経路の分子機構を明らかにするため，DNaseII KOマウスと，サイトカイン誘導に関与する可能性のある候補分子との多重欠損マウスを作製して，貧血を免れて誕生するかどうか解析した．IFN-βは微生物感染時に遺伝子発現が強く誘導されるが，この誘導には転写因子IFN regula-

tory　factor（IRF）-3及びIRF-7が重要な役割を果たしている[22]．そこで，IRF-3及びIRF-7とDNaseIIとの三重欠損マウスを作製した．すると，IRF-3/IRF-7/DNaseII　TKOマウスでは，胎仔肝臓でのIFN-βの誘導が著しく抑制されており，DNaseII/IFN-IR　DKOマウスとほぼ同等の確率で貧血を免れて誕生した[23]．よって，DNaseII欠損状況下での自己DNAからのIFN-β誘導には，IRF-3及びIRF-7が関与しており，微生物感染時と同一の転写因子が用いられていることがわかった．それでは転写因子の上流で未分解DNAを認識する分子は何であろうか？　Toll様受容体（Toll-like receptor：TLR）のシステムは，細菌やウイルスの構成成分を認識し，自然免疫を活性化させることが知られており[24]，IRF-3/IRF-7を介してIFN-βを誘導する．TLRファミリーには二本鎖RNAを認識するTLR3など，核酸を認識するレセプターが存在する．中でもTLR9は細菌のDNAに高頻度に含まれる非メチル化CpG配列をリソソームにおいて認識し，シグナル伝達の起点となる[25]．私達は，自己のDNAであっても未分解のまま大量に蓄積した場合，核酸を認識するTLRを誤作動させてしまい自然免疫を活性化する可能性を考えた．そこでDNaseIIとTLRシステムの構成分子との多重KOマウスを作製し，解析を行った．TLR3またはTLR9とDNaseIIのDKO，すべてのTLRからのシグナル伝達に必須なアダプター分子であるMyD88及びTRIFとDNaseIIとのTKOマウスを作製したが，いずれの場合もマウスは1匹も誕生することはなかった[15]．加えて，これら多重欠損マウスの胎仔肝臓におけるIFN-βの遺伝子発現を定量したが，DNaseII単独KOと同程度の強いIFN-βの発現が依然として観察された．ところで，TLRはNF-κBの活性化を介してTNF-α等の炎症性サイトカインの産生も誘導する．関節炎発症に重要なサイトカイン産生についてもTLR9の関与を検討するため，DNaseII/IFN-IR/TLR9三重欠損マウスを作製したが，関節炎の発症は抑制されなかった（未発表）．これらの結果より，TLRのシステムは，未分解自己DNAによってサイトカインを誘導する際のシグナル伝達に必須ではなく，TLR以外にDNAを感知する経路が存在すると考えられた．長田研究室の岡部と佐野はこのシグナル伝達を担う分子を同定する目的で発現スクリーニングを行い，Eyes absent（EYA）が自身の有するセリン／スレオニン脱リン酸化酵素活性を介して，未分解DNAの蓄積によるサイトカイン産生に関与していることを見出した[26]．この発見は，自然免疫を活性化させるシグナル伝達経路において，今まで報告のなかった脱リン酸化反応の関与を示し当該分野にインパクトを与えた．EYAは，二本鎖RNA刺激などの，自然免疫を誘導する他のリガンドからのシグナル伝達にも関与するため，未分解DNAを認識する分子ではないが，EYAの同定，解析を突破口に未分解DNAからのシグナル伝達機構の全容が明らかとなることが期待される．

一方最近，リステリアやウイルスなどの感染時に，これら微生物由来のDNAが刺激となりIFN産生を誘導するシグナル伝達経路の存在が示され，哺乳類（自己）DNAを細胞にトランスフェクションすることでもこの反応を模倣できることが報告された．続いて，細胞質でDNAを認識するレセプターとしてDNA-dependent activator of IRFs/Z-DNA binding protein 1（DAI/ZBP1）が[27]，DNAからのシグナル伝達に関与するアダプター分子として，小胞体に存在するstimulator of interferon genes（STING）[28]などが報告された．さらに，細胞質にDNAが存在すると，IFN-βの誘導のみならずinflammasomeシステムを活性化させ，IL-1βの成熟，分泌を促すことが報告され，この時DNAを認識するセンサーとして，absent in melanoma 2（AIM2）が複数のグループにより相次いで報告された[29～32]．これらの機構は，感染微生物由来のDNAを細胞質で感知する生体防御機構と考えられているのに対し，DNaseII欠損マウスでは自己DNAはリソソームに蓄積している．蓄積した未分解DNAの一部が何らかの機構によってリソソーム外に輸送，もしくは漏洩しているかは明らかでないが，これら報告された分子を介したシグナル伝達が貧血や関節炎の発症に関与しているかを検討することは興味深いと考えられる．また，DNaseII欠損マウスのDNAを蓄積したマクロファージにおいて，TNF-αのみならずIL-1βの産生が上昇して関節炎発症に関与している可能性も検討する必要があろう．

9.　レンズ細胞でのDNA分解

赤血球のみならず，目のレンズ細胞も終末分化の過程で核を消失し，この時，核DNAも分解される．私達はレンズ細胞におけるDNA分解の分子機構，生理作用にも興味を持ち，解析を行った．まず，CADまたはDNaseIIがここでもDNA分解を担っている可能性を考え，CAD及びDNaseIIの遺伝子発現を定量したが，レンズにおける発現は検出できないか，他の組織と比較しても低いレベルであった．実際，CAD/DNaseII　DKOマウスにおいて，レンズ細胞にDNAが蓄積する像は観察されなかった．ところで，DNaseIIに類似したDNaseとして，DNaseIIとのアミノ酸配列の相同性を37.9%有するDNaseII-like acid DNase（DLAD）の存在が報告されていた[33]．DLADのマウス各組織における遺伝子発現を調べたところ，レンズにおいて強い発現がみられ，かつその発現は他の組織ではほとんどみられないことがわかった．そこで，DLAD　KOマウスを作製し，レンズに着目して解析を行った．レンズは，外面を一層の上皮細胞が覆っているが，レンズ赤道面において，この上皮細胞がレンズ内部へと移動を開始する（**図6A**）．この移動過程で，上皮細胞は線維細胞へと徐々に分

化を行い，伸長して細長い形態に変化するとともに，レンズの透明性に重要なクリスタリンが盛んに合成される．さらに細胞がレンズ内部に到達するにつれ，核，ミトコンドリア，リボソームなどの細胞内小器官が分解されて終末分化を遂げる．この結果，レンズ中央部には細胞内小器官が存在しない細胞集団からなる領域が形成され，オルガネラフリーゾーンと呼ばれる．終末分化した細胞は新陳代謝することなく，個体の生涯を通じてオルガネラフリーゾーンの構成細胞であり続ける．私達は，DLAD KOマウスのレンズ組織切片をフォイルゲン染色したところ，オルガネラフリーゾーンにおいても未分解DNAが存在していることを見出した[34]（図6B）．さらに免疫染色，電子顕微鏡を用いた解析により，DLAD KOレンズでは，ミトコンドリアや核膜などの分解は正常に起こっているが，DNAだけが未分解のまま残存していることがわかった．レンズにおけるクリスタリンの産生や，細胞内小器官の大規模分解は，レンズの光散乱性を小さくし，光透過の機能を保証していると想像できる．そこで，DLAD KOマウスに光を照射し，網膜電図測定によって光を正常に感受しているかどうかを調べた．その結果，このマウスでは，野生型に比べて光の感受性が著しく低下していることがわかり，ヒトの白内障に相当する障害を発症していると結論された．よって，レンズでのDNA分解は光透過性を保証するために必須な反応であり，DLADがこの分解を担っていることが明らかとなった．

しかしレンズ内部にはマクロファージなどの貪食細胞は存在しない．また，DLAD KOレンズでは，オルガネラフリーゾーンの線維細胞のほとんどに未分解DNAの存在が観察された．このことは，造血時の脱核のケースとは異なり，線維細胞は自らの細胞内で自身の核DNAを分解していることを意味する．自身の核DNAの分解は自己崩壊の高いリスクを伴うので，CADの例でも明らかなように厳密な制御系の存在が必要である．DLADの生化学的性状と細胞内局在を調べたところ，DLADは至適pHを酸性側に持つ酸性DNaseであり，HeLa細胞に強制発現させた場合，リソソームへの局在が観察された[35]．次いでDLADに対するモノクローナル抗体を作出し，レンズ切片を用いて免疫染色を行ったところ，DLADタンパク質は上皮細胞には発現しておらず，核DNAが消失する少し前の分化段階の線維細胞において強く発現が誘導されることがわかった．さらに免疫電子顕微鏡を用いた解析により，誘導されたDLADは，始めリソソームに局在しているが，さらに分化が進んで細胞がオルガネラフリーゾーンの直前に到達する頃には，核内に局在が移行している様子が観察された．よって，DLADは厳密な発現制御と，リソソームへの局在による核DNAとの隔離により，不適切な分解事故を防いでいると考えられる．しかし，DLADを強制発現させたHeLa細胞の核DNAは分解されることはない．レンズでは，最終分化のある時期に，DLADの発現誘導に加えDNA分解を開始するための何らかの引き金が引かれる必要があると考えられるが，そのシグナルが何であるのか，及びリソソームに局在したDLADがいかにして核内のDNAを分解するのかはわかっていない．リソソーム，核膜が共に膜構造を消失し，DLADタンパク質の拡散によりDNAにアクセスすることが可能となるのか，リソソームが核膜と融合することでDLADが核内に送りこまれるのか，いくつかの可能性について今後の詳細な検討が必要である．また，核DNAのみならず，他の細胞内器官が消失する機構についてもまったく理解が進んでいない．リソソーム酵素が核DNAの分解を担っていることを明らかにした私達の知見は，核DNAに限らず，他の細胞内小器官の分解にもリソソーム系が関与する可能性を指摘した．リソソームを介した細胞内小器官の分解機構として，オートファジーがよく知られているが，既存のオートファジー分子のKOマウスではレンズや赤血球（赤血球も最終分化の際，核に加えて細胞内小器官を消失する）での細胞内小器官の消失に異常はみられないことが報告されている[36]．どのような機構が細胞内小器官の分解を担っているのか，今後の報告が待たれる．

10. 他にも興味深いDNA分解の局面が存在する

上記以外にも生体内でDNAが分解される局面が存在する．そのいくつかに関して現在までの知見を，私達以外のグループからの報告も含めてここで紹介したい．

DNaseIは二価イオン要求性を持つ，至適pHが中性のDNaseで，主に膵臓，肝臓などから分泌され，消化液や血清中に存在する．DNaseI KOマウスは，加齢後，自己抗体が検出されsystemic lupus erythematosus（SLE）型自己免疫疾患を発症する[37]．体液中に含まれる微量DNAの分解が妨げられ，DNA–自己抗原の複合体もしくはDNA–抗DNA抗体の免疫複合体が血清中に増加し，自己免疫反応が惹起される可能性が想定されるが，それをサポートするデータはまだ不十分で，詳しい発症機構は不明である．

皮膚表皮のケラチノサイトは基底層の幹細胞分裂によって生まれ，体表面に向かって移動しながら分化し，角質層に到達するまでに，レンズ線維細胞同様，細胞内小器官を消失する．ここでも，核DNAの分解が起こる．オーストリアのグループは，DNaseIのファミリーであるDNase1L2が，ケラチノサイトの最終分化過程で発現が強く誘導されること，及び*in vitro*でこの細胞分化を再現する培養系においてDNase1L2をノックダウンすると，形成された角質層の細胞にDNAが残存することを報告した[38]．皮膚の角質層は，レンズの線維細胞とは異なり，短期間の内に体外へ脱落するため，DNAが残存したところで生体に何らか

の障害が生じる可能性が容易には想像しづらい．DNase1L2 KOマウスにおいて皮膚表皮でのDNA分解が妨げられるかどうか，そしてDNAが残存した場合，生体に何らかの不都合が生じるかどうか，解析が待たれる．

細胞内には，核DNAに加えて，ミトコンドリア及び葉緑体が有する独自のDNAであるオルガネラDNAが存在する．これら細胞内小器官のオルガネラDNAが分解される興味深い現象として，細胞内小器官の母性遺伝とオートファジーを挙げたい．まず，細胞内小器官の母性遺伝とは，卵と精子が受精した際，精子由来のミトコンドリアもしくは葉緑体は受精卵に伝達されず，卵由来のもののみが新しい生命に受け継がれる現象である．精子由来のこれらオルガネラ及びオルガネラDNAはそもそも卵内部に侵入しないと長年信じられていた．ところが近年の解析により，オルガネラの卵への侵入自体は起こるが，その後速やかに分解されることが明らかとなり，この分解こそが母性遺伝の基盤であるとのパラダイム転換が起こった．西村，黒岩らのグループは，緑藻類に属する単細胞生物クラミドモナスにおいて，接合型mt(+)：(mating-type plus）と接合型mt(−）の二つの細胞が接合した際，接合型mt(−）由来の葉緑体DNAのみが選択的に分解される現象を明らかにした．次いで，接合型mt(+）のクラミドモナスに含まれる未同定のCa依存性DNaseが，接合型mt(−）由来の葉緑体DNA分解に関与することを示唆した[39]．また，彼らはメダカの受精時において，精子由来のミトコンドリアは卵内に侵入後崩壊するが，ミトコンドリアDNAはミトコンドリアの崩壊に先立って積極的に分解されることを報告し，受精時のオルガネラDNAの分解現象が動物でもみられることを示した[40]．いずれも分解をつかさどるDNaseの同定には至っていないが，この分解が妨げられた時，母性遺伝という奇妙な現象が成立しなくなるのか，もしくは受精卵に残存したDNAが何らかの細胞傷害反応を起こすのか，極めて興味深い．

もう一つの，オルガネラDNA分解が起こる局面はオートファジーであり，オートファゴソームにとりこまれたミトコンドリアはリソソームに運ばれ分解される．ミトコンドリアDNAもリソソームで分解されると考えられ，ほとんどの組織のリソソームにはDNaseIIが存在するので，オートファジーでもDNaseIIが分解を担っていると私達は予想しているが，それを示すデータはまだない．DNaseIIを欠損した細胞やマウスにオートファジーを誘導し，リソソームにミトコンドリアDNAが蓄積するかどうかを調べる必要があろう．しかし，ミトコンドリアDNAは複数コピーが一つのミトコンドリア内に存在するとはいえ，ゲノムサイズは16.5kb（マウス）と，核DNAのサイズに比べると桁外れに小さいため，未分解DNAの蓄積があっても，これを検出するのは困難かもしれない．

ここまでは自己DNAの分解に関して述べたが，生体内には外来DNAを分解する局面も存在する．私達は，DNaseII欠損マウスに細菌を投与した際，マクロファージや好中球内部に，細菌DNAと思われる，核DNAより小さいDNA染色のシグナルが多数観察されることを見出しており，とりこんだ細菌やウイルスのDNAを分解するのもやはりDNaseIIであると考えられる（未発表）．また，補食した生物由来の非自己DNAも食物消化の過程で分解されると考えられる．*nuc-1*（DNaseIIホモログ）変異体の線虫では，腸管内に，補食した大腸菌由来のDNAが検出される[41]．哺乳類において消化管内でDNA分解を担っている酵素がDNaseIIであるかは明らかではないが，膵臓で分泌されたDNaseIもその候補と考えられる．また，DLADはレンズ以外に唾液腺でも発現しており，一部が唾液に分泌されて，補食由来のDNA分解に関与しているかもしれない．捕食者由来のDNAを分解する意義としては，外来DNAが免疫系を過剰活性化するのを防ぐため，外来DNAが核DNAにとりこまれてゲノムの安定性を乱すのを防ぐため，分解産物を吸収し利用する栄養学的意義，などが考えられるが，答えは明らかではない．

11.　DNA分解の起源と進化についての考察

最後に，少し想像力を逞しくすることをお許し頂き，これまでの知見をもとに，DNA分解の起源と進化について考察してみたい．ここでは，自己DNAの複製，組換え，修復時などに限定領域のみを分解するDNA分解ではなく，配列非特異的にDNAをヌクレオチドにまで分解する，DNaseIIが行うような完全分解タイプの分解に焦点を絞って議論したい．DNaseIIのホモログは広く生物界に保存されており，植物，細菌にもその分布は及ぶ[42]．すなわちDNaseII及び完全分解タイプのDNA分解の起源は，単細胞生物に既にみることができるが，なぜ単細胞生物にこのようなDNaseが必要なのか？　考えうる答えは二つである．一つは，ウイルス等の望まざる侵入者のDNAを分解する生体防御機構としての意義，もう一つは体外にある遊離DNAもしくはDNAを有する生物を積極的に取り込んだ時（補食）にこれを分解し，分解産物を利用する栄養学的意味合いである．そして生物が多細胞化すると，個体全体の利益のために個体を構成する細胞が死ぬアポトーシスが進化した．*nuc-1*変異体の線虫ではアポトーシス細胞を貪食した細胞の内部に未分解DNAが蓄積する．また，前述のように，腸管内において，補食した大腸菌由来のDNAが検出される．しかし，*nuc-1*変異体は致死ではなく，少なくとも通常飼育環境では目立った表現型も報告されていない．単細胞時代に獲得したDNA分解機構を死細胞由来の自己DNAの分解にも転用したが，この時点で自己DNAの分解の生理的意義は乏しい（恒常性の維持に必

須ではない）のかもしれない．むしろ，外来DNAの分解の方がより重要であり，*nuc-1* 変異体を食餌が潤沢ではない環境下や，あるいは微生物感染などのストレスに曝したならば，何らかの表現型を示す可能性があるのではないかと想像を働かせている．ショウジョウバエでは，自然免疫のシステムが発達し，外来微生物由来のDNAを分解するだけでなく感知し，生体防御反応を誘導する機構が形成される．こうなると，死細胞由来のDNAが未分解のままでは望まざる作用を発揮してしまう．CADホモログは線虫では確かな報告がまだないが，ショウジョウバエではCADホモログが存在する[43]ことは，昆虫では死細胞のDNA分解の重要性が増したことを示唆しているとも解釈できる．実際，DNaseII及びCADのホモログの機能しない二重変異ショウジョウバエでは，自然免疫が活性化され大量の抗菌ペプチドが産生されることがわかっている[44]．そして哺乳類においては，自然免疫系がさらに進化し，外来DNAの侵入が感知されるとIFN，TNF-α，IL-1，IL-6などのサイトカインが分泌される．このため，DNaseIIを欠損するマウスでは，サイトカインが構成的に発現され，炎症性疾患を引き起こしたり，血球細胞に細胞傷害作用を示し個体に死をもたらす事態まで生じたということであろう．哺乳類では赤血球造血において脱核のステップが加わったため（魚類，鳥類などでは脱核はみられず，赤血球は有核である），他の生物に比して処理すべき核DNAの量が飛躍的に上昇したことも，さらにDNA分解の重要性が増した一つの要因と考えられる．

まとめると，もともと侵入者または捕食者由来の非自己DNAを分解するために進化した完全分解タイプのDNA分解システムは，やがてアポトーシスの進化，赤血球分化過程における脱核過程の誕生とともに，不要な自己DNAを分解することにも転用された．これと並行して，生命が外来DNAを認識（分解だけではなく）して強力な自然免疫を活性化させる機構を獲得するにつれ，自己DNAがこの機構を誤作動させないための安全装置として，生体の恒常性の維持，及びついには生命の維持においても必須な役割を担うに至ったのではないか．これが，DNaseIIを中心に考察したDNA分解の変遷，進化についての私見である．

12. 結　　語

アポトーシスでのDNA分解に対する素朴な疑問に端を発した私達の研究は，広く生体内でのDNA分解を対象とする研究に発展した．DNA分解酵素は，そのいくつかが同定され，生化学的性状に関する研究が先行していたが，生体内での機能についてはほとんど不明であった．私達は，生体内においてDNAはいくつかの局面で積極的に分解されており，局面ごとにそれぞれのDNaseが他では代替できない形でDNA分解を担っていることを明らかにした（**表1**）．そしてこれらDNA分解が妨げられると，生体にとって様々な不都合が生じることを示し，DNA分解が重要な生理反応であることを証明した．DNAは自己の遺伝情報を担う重要な分子であることは言うまでもない．しかし一方で，“DNAは分解されるべき時に分解されないと生体に害を及ぼす危険な一面を合わせ持つ”．この逆説的で新規の概念に，今私達は到達している．

謝辞

本研究は，研究室内外の多くの方々との共同研究によるものです．これらの方々に，心から感謝致しますと共に，誌面の都合上お名前を挙げることができませんことをお詫び申し上げます．本研究は長田重一研究室の先輩方の先行研究のもと，多くの研究室のメンバーのご指導を頂き，多くのメンバーと協力して，皆で発展させることができたものです．特に，福山英啓さんは，未熟極まりない学生だった私を本当に辛抱強く御指導下さいました．そして，長田重一先生には，10年以上の長きに渡って一貫してご指導を頂き，これら研究のすべてを牽引下さるとともに，一つ一つの過程を共に楽しみ，時には共に苦しんで下さいました．お世話になったすべての方々にこの場をお借りしまして篤く御礼申し上げます．

文　　献

1）Nagata, S.（2005）*Annu. Rev. Immunol*., **23**, 853–875.
2）Vaux, D.L. & Korsmeyer, S.J.（1999）*Cell*, **96**, 245–254.

表1　生体内におけるDNA分解のまとめ
“DNAは危険な分子かもしれない”これが，私達が一連の研究から提唱するメッセージである．

局　面	DNA分解酵素	DNA分解異常のもたらす疾患	
アポトーシス	CAD及びDNaseII	T細胞発生阻害	
赤血球分化での脱核	DNaseII	胎仔	致死性貧血
		成体	関節炎
レンズ線維細胞の分化	DLAD	白内障	

3) Adams, J.M. (2003) *Genes Dev*., **17**, 2481–2495.
4) Ravichandran, K.S. & Lorenz, U. (2007) *Nat. Rev. Immunol*., **7**, 964–974.
5) Kerr, J.F., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972) *Br. J. Cancer*, **26**, 239–257.
6) Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998) *Nature*, **391**, 43–50.
7) Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998) *Nature*, **391**, 96–99.
8) Sakahira, H. & Nagata, S. (2002) *J. Biol. Chem*., **277**, 3364–3370.
9) McIlroy, D., Sakahira, H., Talanian, R.V., & Nagata, S. (1999) *Oncogene*, **18**, 4401–4408.
10) McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2000) *Genes Dev*., **14**, 549–558.
11) Wu, Y.C., Stanfield, G.M., & Horvitz, H.R. (2000) *Genes Dev*., **14**, 536–548.
12) Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2001) *Science*, **292**, 1546–1549.
13) Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Okada, K., Iida, T., & Nagata, S. (2003) *Nat. Immunol*., **4**, 138–144.
14) Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., & Nagata, S. (2005) *Nat. Immunol*., **6**, 49–56.
15) Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T., & Nagata, S. (2005) *J. Exp. Med*., **202**, 1333–1339.
16) Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, H., & Nagata, S. (2006) *Nature*, **443**, 998–1002.
17) Feldmann, M., Brennan, F.M., & Maini, R.N. (1996) *Cell*, **85**, 307–310.
18) Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., & Kollias, G. (1991) *Embo J*., **10**, 4025–4031.
19) Nagata, S. (2008) *Cytokine Growth Factor Rev*., **19**, 295–302.
20) Rossol, M., Pierer, M., Arnold, S., Keyszer, G., Burkhardt, H., Baerwald, C., & Wagner, U. (2009) *Ann. Rheum. Dis*., **68**, 1498–1503.
21) Samuels, J. & Ozen, S. (2006) *Curr. Opin. Rheumatol*., **18**, 108–117.
22) Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., & Taniguchi, T. (2005) *Nature*, **434**, 772–777.
23) Okabe, Y., Kawane, K., & Nagata, S. (2008) *Eur. J. Immunol*., **38**, 3150–3158.
24) Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006) *Cell*, **124**, 783–801.
25) Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., & Akira, S. (2000) *Nature*, **408**, 740–745.
26) Okabe, Y., Sano, T., & Nagata, S. (2009) *Nature*, **460**, 520–524.
27) Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., & Taniguchi, T. (2007) *Nature*, **448**, 501–505.
28) Ishikawa, H. & Barber, G.N. (2008) *Nature*, **455**, 674–678.
29) Roberts, T.L., Idris, A., Dunn, J.A., Kelly, G.M., Burnton, C.M., Hodgson, S., Hardy, L.L., Garceau, V., Sweet, M.J., Ross, I.L., Hume, D.A., & Stacey, K.J. (2009) *Science*, **323**, 1057–1060.
30) Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., & Fitzgerald, K.A. (2009) *Nature*, **458**, 514–518.
31) Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., & Alnemri, E.S. (2009) *Nature*, **458**, 509–513.
32) Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., & Superti-Furga, G. (2009) *Nat. Immunol*., **10**, 266–272.
33) Shiokawa, D. & Tanuma, S. (1999) *Nucleic Acids Res*., **27**, 4083–4089.
34) 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. (2003) *Nature*, **424**, 1071–1074.
35) Nakahara, M., Nagasaka, A., Koike, M., Uchida, K., Kawane, K., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2007) *Febs. J*., **274**, 3055–3064.
36) Matsui, M., Yamamoto, A., Kuma, A., Ohsumi, Y., & Mizushima, N. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **339**, 485–489.
37) Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., & Moroy, T. (2000) *Nat. Genet*., **25**, 177–181.
38) Fischer, H., Eckhart, L., Mildner, M., Jaeger, K., Buchberger, M., Ghannadan, M., & Tschachler, E. (2007) *J. Invest. Dermatol*., **127**, 24–30.
39) Nishimura, Y., Misumi, O., Kato, K., Inada, N., Higashiyama, T., Momoyama, Y., & Kuroiwa, T. (2002) *Genes Dev*., **16**, 1116–1128.
40) Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T., & Kuroiwa, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1382–1387.
41) Sulston, J.E. (1976) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*., **275**, 287–297.
42) Shpak, M., Kugelman, J.R., Varela-Ramirez, A., & Aguilera, R.J. (2008) *Mol. Phylogenet. Evol*., **47**, 841–854.
43) Yokoyama, H., Mukae, N., Sakahira, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2000) *J. Biol. Chem*., **275**, 12978–12986.
44) Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., & Nagata, S. (2002) *Genes Dev*., **16**, 2662–2671.
45) Nijenhuis, S., Zendman, A.J., Vossenaar, E.R., Pruijn, G.J., & vanVenrooij, W.J. (2004) *Clin. Chim. Acta*, **350**, 17–34.
46) Dahm, R., Gribbon, C., Quinlan, R.A., & Prescott, A.R. (1998) *Eur. J. Cell. Biol*., **75**, 237–246.