



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Activation of the innate immunity in <i>Drosophila</i> by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation  |
| Author(s)    | 向永, 直美   |
| Citation     | 大阪大学, 2003, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43944">https://hdl.handle.net/11094/43944</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 向 永 直 美  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学)  |
| 学位記番号      | 第 17605 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 15 年 3 月 25 日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科生体制御医学専攻   |
| 学位論文名      | Activation of the innate immunity in <i>Drosophila</i> by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation.<br>( <i>Drosophila</i> におけるアポトーシス時未分解 DNA による感染免疫経路の刺激) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 長田 重一<br>(副査)<br>教授 近藤 寿人 教授 辻本 賀英  |

### 論文内容の要旨

#### [目的]

アポトーシスは不必要な細胞を除去していく過程でありその生化学的な特徴として染色体 DNA の断片化を伴う。この過程は CAD (caspase-activated DNase) およびその阻害タンパク質、ICAD (Inhibitor of CAD) により制御されている。アポトーシス時には活性化された caspase により ICAD が切断、不活性化され自由になった CAD が染色体 DNA を断片化する。さらに最近この DNA の分解には貪食細胞、リソソームに存在する DNase II の関与も示唆されている。このように DNA 分解における分子メカニズムについては詳細な解析が行われてきたが、その生理的な役割は明らかとされていない。そこで発生過程において多くの細胞がアポトーシスにより除去され遺伝学的解析の容易な *Drosophila* を用い、DNA 断片化の生理的な役割を明らかとすることを目的とした。

#### [方法ならびに成績]

##### 1. *Drosophila* ICAD (dICAD) 欠失 line の樹立

dICAD 欠失 line は P-element の挿入による Local hop mutagenesis により樹立した。具体的には、dICAD 遺伝子の下流 60 kbp に P-element が挿入された line を同定し、この P-element を段階的に mobilize させた。これら P-element の位置は Long-PCR 法により検討し、最終的に開始コドンの上流 17 bp の位置に P-element の挿入された line を樹立した。この line においては ICAD のみならず CAD タンパク質も消失しており、CAD/ICAD 変異 line として解析可能であることが示された。

##### 2. *Drosophila* DNase II (dDNase II) 変異 line の同定

ほ乳類 DNase II との類似性を持つ CG7780 遺伝子を COS 細胞に発現させ CG7780 タンパク質の酵素活性を検討したところ、酸性条件下において顕著な DNase 活性が認められた。この結果より CG7780 遺伝子を *Drosophila* DNase II と結論した。一方、低い酸性 DNase 活性を持つ DNase-1<sup>10</sup> の dDNase II 遺伝子変異の可能性を検討した。その結果、DNase-1<sup>10</sup> より単離した dDNase II cDNA においては 223 番目のセリンがアスパラギンに置換する塩基変異を含んでいた。さらにこの変異 dDNase II を COS 細胞に発現させた場合、そのタンパク質は殆ど酸性 DNase 活性を示

さなかつた。これらの結果より DNase-1<sup>10</sup> は dDNase II 変異 line であることが示された。

### 3. アポトーシス時の DNA 断片化への CAD、DNase II の関与、及び DNA の蓄積

*Drosophila* において、卵、胚発生過程にアポトーシスにより細胞が除去されることが知られている。そこでこれらの過程の DNA 断片化を dICAD 欠失 line、dDNase II 変異 line において linker-mediated PCR により検討した。いずれの過程においても野生型 line においてはヌクレオソーム単位の DNA ladder が検出された。一方、dICAD 欠失 line では全く DNA ladder が認められず CAD がアポトーシス時の DNA 断片化に不可欠であることが示された。これに対し dDNase II 変異 line においては、DNA ladder は減少せず、むしろ増加していた。また、dICAD、dDNase II 両欠損 line においては全く DNA ladder は観察されなかつた。これらの結果より CAD、DNase II は卵、胚発生過程のアポトーシスにおいて異なる機構で DNA 分解に関与していることが明らかとなった。

さらに dDNase II 変異 line の ovary を Acridine orange 染色したところ多くの未分解 DNA の蓄積が認められた。この DNA の蓄積は dICAD、dDNase II 両欠損 line においても認められた。これに対し、dICAD 欠失 line において DNA は全く蓄積していなかつた。

### 4. 蓄積 DNA による抗菌ペプチドの誘導

ほ乳動物においては非メチル化 DNA により感染免疫経路が活性化されることが知られている。そこで蓄積した DNA による *Drosophila* の感染免疫経路活性化の可能性を検討した。抗菌ペプチドの発現を Northern blotting により検討したところ野生型、dICAD 欠失 line においてその発現は認められなかつた。これに対し、DNA の蓄積が認められる dDNase II 変異 line においては抗菌ペプチドの発現が誘導されていた。さらにこの発現レベルは dICAD、dDNase II 両欠損 line において促進されていた。これらの結果よりアポトーシス時の未分解 DNA は *Drosophila* における感染免疫経路を活性化することが示唆された。

#### [総括]

以上より *Drosophila* 発生過程のアポトーシスにおける DNA 断片化には CAD/ICAD 及び、DNase II が関与していることが明らかとなった。さらに DNA が分解されずに蓄積した場合感染免疫経路が過って活性化されることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

アポトーシスは不必要な細胞を除去していく過程であり、生化学的な指標として染色体 DNA の断片化が知られてきた。私達はアポトーシス時に活性化され染色体 DNA を断片化する DNase、CAD 及びその阻害タンパク質 ICAD を同定し、さらにこれらの分子による DNA 断片化機構が *Drosophila* においても保存されていることを明らかにしてきた。このように DNA 断片化機構は生物を通して広く保存されているが、その生理的な役割は未だ明らかにされていない。

そこでその意義を明らかにするため *Drosophila* CAD/ICAD の変異 line を樹立した。さらにほ乳類において貪食細胞中で DNA を分解することの知られる DNase II が *Drosophila* にも存在することを示し、その変異 line を同定した。これらの変異 line の解析によりアポトーシス細胞の DNA は dCAD によりヌクレオソーム単位に分解され、その後貪食細胞内で DNase II により分解されることが示唆された。さらに DNase II を欠損した場合、未分解 DNA が蓄積し、DNA の蓄積する line では感染免疫経路が活性化され抗菌ペプチドが誘導されることを見出した。

本研究はアポトーシス時の DNA 分解が過った免疫応答を起こさない為に必要であることを示唆し、DNA 分解の生理的な意義を明らかにしたことは学位の授与に値すると考えられる。