

第7期第1回創発セミナー

大隅基礎科学創成財団は2023年10月3日午後4時から「生化学に魅せられた50年一豚の肝臓から細胞の死」と題した創発セミナーをオンラインで開きました。講師はアポトーシス（細胞死）の原理、生理作用の解明で世界的に高い評価を得ておられる大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任教授の長田重一氏。参加者約100人がQ&A含め午後5時半まで熱心に聞き入りました。以下にその講演の要旨を報告します。

公益財団法人大隅基礎科学創成財団
理事 大谷 清

講演『生化学に魅せられた50年一豚の肝臓から細胞の死』

大阪大学免疫学フロンティア研究センター
特任教授 長田 重一

■長田重一氏の略歴■

1972年東京大学理学部卒業、77年東京大学理学系大学院博士（医科学研究所・上代淑人教授）、スイス・チューリッヒ大学(Charles Weissmann 教授)に留学、東京大学医科学研究所助手、(財)大阪バイオサイエンス研究所研究部長、大阪大学医学部教授、京都大学医学研究科教授を経て2015年から大阪大学免疫学フロンティア研究センター 特任教授



1994年 Emil von Boehring Prize(ドイツ)、1995年 Robert Koch Prize(ドイツ)、Prix Lacassagne(フランス)、Debrecen Award(ハンガリー)、2000年恩賜賞・学士院賞、2001年文化功労者顕彰、2013年慶應医学賞などを受賞。2006年日本生化学会会長、2007年日本分子生物学会理事長。日本学士院会員、チューリッヒ大学名誉博士、Foreign Associate, National Academy, USA

■講演要旨■

生化学に触れたきっかけは昭和43年(1968年)、東大で受けた丸山工作教授の「遺伝子の分子生物学」(ジェームズ・D・ワトソン著)を使った講義。生物を分子の言葉で語れることに強い印象を受け、この世界に飛び込もうと決心した。大学院に進むときに東大医科学研究所の上代淑人(かじろよしと)教授の研究室を希望、「研究室は満杯だ」と言われたが、「流しの上に木板を乗せた実験台でいいなら来い」と、なんとか入れてもらった。

与えられた仕事は、リボソーム(注1)上でペプチド鎖を延長する因子を豚の肝臓から精製すること。米国でのウサギ網状赤血球を用いた研究の追試で、品川の東京食肉市場で新鮮な豚の肝臓を手に入れ、米国と同じ手法で実験したが、1年やってもうまくいかない。ある時、この因子が不安定なことに気づき、工夫して安定化させると米国からの報告とは分子量の全く異なる分子が見つかった。修士2年の時だった。「他人の論文は著名誌に掲載されたものでも追試不能のことがある。50%の論文はジャンク?」、自分で考え、仕事をすることで良い答えが出せた経験は貴重で、

以来、やみつきになった。

1977年に博士号を取り留学を考えた頃、世界では組換え DNA 技術が開発され、cDNA(相補的 DNA、注 2)クローニングが注目され、生物学のやり方が変わろうとしていた。ぜひこの技術を学びたいと考え、上代先生に相談。先生の紹介でチューリッヒ大学のチャールズ・ワイスマン教授の研究室に 1977 年 11 月から。ワイスマン教授は毎朝 8 時「What's new, Dr. Nagata?」。

ワイスマン研究室では 1978 年からインターフェロン (IFN) を研究することになった。組み替え DNA 技術を使ってインターフェロン cDNA がクローニングできればこれを用いてインターフェロンを大量に供給できる。その頃、インターフェロンは抗ウイルス作用ばかりでなく抗がん作用も報告されヒトへの投与が試みられていた。世界中の研究者がその cDNA を単離しようと競っていた。ワイスマン研では最初、谷口維紹(ただつぐ)先生が担当されていたが、78 年末に癌研に戻られたので、その後を私がやることになった。

インターフェロン産生細胞の mRNA を用いて cDNA ライブラリーを作成、このライブラリーからインターフェロン遺伝子を探す作業だった。センダイウイルスをヒト白血球に感染させて mRNA を調製、その mRNA から cDNA を作成し、大腸菌へ導入、2 万個のクローンからなる cDNA ライブラリーを作成した。ついでインターフェロン遺伝子を持つクローンの同定作業が始まった。それぞれの大腸菌クローンからプラスミド DNA を調製、センダイウイルスで感染させた白血球からの mRNA と反応させた。インターフェロン遺伝子を持つプラスミドであればインターフェロン mRNA を結合するはずである。その mRNA を回収してアフリカツメガエルの卵母細胞に注射し、その培養液のインターフェロン活性を調べる。ワイスマン教授のアドバイスだった。

この作業を 8 ヶ月続け、いくつかの陽性クローンを同定した。そこで、その大腸菌から抽出液を調製すると、インターフェロン活性を示すものが見つかった。大腸菌がヒトインターフェロンを産生していた。忘れもしない 79 年 12 月 24 日、クリスマスイブだった。ダボスでクリスマス休暇を楽しんでいたワイスマン教授に報告すると彼は休暇から研究室へ直帰。正月返上で、大腸菌で産生されたインターフェロンの性質を解析、ヒト細胞で産生された分子と同等であることを確認した。ワイスマン教授は 1 月 15 日、ハーバード大学でセミナー、記者会見、その内容が翌日の New York Times の 1 面で報道された。論文を 2 週間で書き上げ、ロンドンの Nature 編集部を持ち込み、3 月 27 日号に掲載された。

当時、インターフェロンは癌の magic drug と言われていた(決して Magic Drug ではなかったが、C 型肝炎の治療に広く使われた)せいもあって、反響は凄まじく、週刊誌 TIME、News Week、LIFE (教授と私の写真が掲載)などに取り上げられた。すると数千人のがん患者から問い合わせが殺到した。ワイスマン教授は「薬として使えるようになるには何年もかかる」と丁寧に答えていた。サイエンスが社会に如何に大きな影響を与えるかを知り、またそれにどう対応するかを彼から学んだ。

1 年後、大腸菌を用いてインターフェロンの大量生産、精製に成功、猿を使った実験を経て臨床試験へ。組み替えインターフェロンを臨床試験用に搬送しようとした前の晩、ワイスマン教授私に、「明日の朝、ここで倒れていたら、搬送を止める」とつげた後、自らに注射した。その自信と責任感に圧倒された。

1981 年暮れ、約 4 年間の留学を終えて医科研に助手として戻った。日本ではまだ動物を使った

DNA 組み換えをやる人がいない。チューリッヒと違って研究に必要な器具もお金もない。京都の国際会議でそのことを京都大学の中西重忠先生に愚痴ると「甘えるな、インターフェロンは君の仕事じゃない、ワイスマン教授の仕事だ。忘れろ。日本は皆何も無いところで頑張ってる」と叱責され、それから必死で仕事をした。

当時、医科研の講師だった浅野茂隆先生と、がん細胞が産生する白血球を増やす因子 (G-CSF) の研究を始めた。2 年半かけてその遺伝子を同定、86 年 1 月の Nature に掲載された。

86 年 11 月、京大名誉教授早石修先生からのお誘いで、大阪バイオサイエンス研究所に移籍した。十分な研究費と 10 人近いスタッフを抱える研究部の部長。早石先生「長田君、好きなことをすればいい。ホームランを打つことだけ考えなさい。ヒットはいらない」。大きな転機だった。

その少し前から東京都臨床医学研究所の米原伸さんとインターフェロン受容体の研究を始めていた。米原さん、インターフェロン受容体に対するモノクローナル抗体を樹立しようとしている過程で、抗体だけで細胞が死ぬ、という予想もしないことを見出し、その抗原を Fas と名付けた。

数年後、ヒト Fas をコードする cDNA を単離、これをマウス細胞に導入した。樹立された細胞を抗ヒト Fas 抗体で刺激すると、細胞は速やかに死滅した。細胞死にはネクローシス (壊死) の他に、プログラムされた死があることが知られていて、アポトーシス (apoptosis) と命名されていた。この過程では細胞は凝縮し、破裂することなく食細胞にとりこまれる。抗 Fas 抗体で死につつある細胞はアポトーシスに特異的な形状を持ち、また特異的な DNA 分解が起こることから、「Fas はアポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞膜タンパク質」と結論づけて Cell に投稿、1991 年掲載された。

新しい遺伝子が発見されると染色体のどこに存在するかに関心が向かう。マウス Fas 遺伝子を単離し、染色体の場所を探したところ、lpr (lymphoproliferation) 変異を起こす遺伝子の近くにあった。lpr 変異を持つマウスではリンパ球が異常増殖してリンパ節や脾臓が肥大し、自己免疫疾患を発症する。アポトーシスを起こす Fas が機能しなかったらリンパ節や脾臓が肥大するのではないかと考え、東大医科研から lpr マウスをもらって確かめると、予想通り Fas 遺伝子に変異が見つかった。

Fas は細胞を殺すためのシグナルを媒介する細胞膜タンパク質、受容体様の構造を持っていた。それでは Fas に結合するリガンド (受容体に結合する分子) (Death Factor) があるはず。しかしどんな細胞がリガンドを発現しているかがわからず、模索していたところ、面識のないマルセイユのピエール・ゴールドスタイン博士から「Fas リガンドを用いて細胞にアポトーシスを引き起こしているかもしれない細胞を見つけた。興味あれば送る」という FAX が届き、即答。細胞を送ってもらった。その細胞から cDNA ライブラリーを作成、Fas リガンド cDNA をクローニングしたところ、この分子は TNF α (tumor necrosis factor、腫瘍壊死因子) に類似した分子であることを見つけた。この論文を 1993 年 Cell 誌に投稿した。10 日後、査読結果の Fax が Cold Spring Harbor 研究所での『Cell Death』の国際会議に出席していた私のところに転送された。その会議に出席していたゴールドスタイン博士とコメントを見ながら硬く握手した。

1996 年に大阪大学医学部に移り、アポトーシス時に活性化される DNase (DNA を分解する酵素) の研究を始めた。アポトーシス時には DNA がヌクレオソームの単位 (180 塩基対) に切断される。このアポトーシス特異的な現象を引き起こす酵素を探そうとしたが、不安定でなかなか精

製できない。別の観点からアポトーシスのシグナルを調べていた大学院生が DNA の分解を阻害する因子が存在することを見つけた。この阻害因子は非常に安定で短期間に精製でき、この阻害因子を用いて DNase を捕まえることができた。逆の発想、逆から攻めた成果だった。

DNA 分解酵素 (CAD: caspase-activated DNase) は通常の細胞で働いては困る。この酵素はリボソームでの合成途上で、阻害因子と結合、阻害因子との 2 量体としてリボソームから遊離される。アポトーシスが起きるとカスパーゼというタンパク質分解酵素が活性化されて阻害因子を切断、自由になった CAD が 2 量体を形成、働き出す。実に巧妙な仕組みである。しかもこの CAD 2 量体はハサミのような形を作っていて、そのことが DNA をヌクレオソーム単位で切断することにつながっていた。この論文は 1998 年 1 月 1 日号の Nature に掲載され、その年に発表された世界の全の論文の中で最もよく引用された。Fas から CAD に繋がるアポトーシスのシグナル伝達は「Immunobiology」という教科書の表紙に取り上げられた。

サイエンスは突き詰めるほどわからない問題が出てくる。次に出てきた問いは、この DNA 分解酵素 CAD の生理作用。CAD をロックアウトしたマウスを作成し、このマウスから調製した細胞に試験管内 (in vitro) でアポトーシスを誘導すると、どの細胞でも DNA の分解は起きず、この酵素がアポトーシス時の DNA 分解を担う唯一の酵素であることが確認できた。ところが生体内 (in vivo) ではどの組織でも CAD がなくても DNA 分解が起きていた。

生化学を志す人間にとって、Vitro と Vito の結果が違っていることは納得できません。組織を丁寧に観察すると、生体内ではアポトーシス細胞はマクロファージに貪食され、死細胞の DNA はマクロファージのリソソーム (注 3) に存在する DNA 分解酵素 (DNase II) に分解されていた。実際、DNase II の遺伝子を欠損させると、アポトーシス細胞の DNA が未分解のままマクロファージに蓄積、マウスは強度の炎症反応を引き起こし、生まれるや否や死滅した。

次に出てきた疑問は、「マクロファージはアポトーシス細胞の何を認識して貪食しているのか」。マクロファージの表面タンパク質に対するモノクローナル抗体のライブラリーを作り、その中からアポトーシスの貪食を抑える抗体を探し、その抗原を同定した。その結果、アポトーシス細胞の表面に“eat me”シグナルとして露出されるフォスファチジルセリン (PtdSer) を認識する二つの分子 (Tim4 と MFG-E8) を見出した。これら因子を欠損させると、アポトーシスを起こした細胞が貪食されなくなるなり、死細胞はネクローシスを起こして破裂、細胞内因子が遊離される。これが免疫系を活性化し、自己免疫疾患を引き起こすことも見出した。

それでは、アポトーシス細胞はいかにして PtdSer を細胞の表面に暴露するのだろうか？ 脂質二重層からなる真核細胞の細胞膜で、PtdSer は内膜にのみ分布している。私たちは ATP11C と CDC50A からなる複合体をフリッパーゼ、PtdSer の細胞膜内膜での局在を維持する酵素として同定した。アポトーシス時には ATP11C はカスパーゼによって中央部で切断、失活する。同時に Xkr8 と呼ばれる分子が、カスパーゼにより活性化されリン脂質の通り道を提供、速やかに PtdSer を内膜から外膜に移層、細胞上面に暴露する。

毎日 10 の 9 乗から 10 乗もの細胞がアポトーシスを起こして死んでいく。何がその死を引き起こし、死滅する細胞で何が起り、なぜ死細胞だけ貪食されるのか、30 年前は何もわかっていなかった。これらが今、ほとんど解明された。細胞膜の非対称性はアポトーシス過程ばかりでなく、細胞融合などさまざまな生物学的過程で崩壊、PtdSer が暴露される。アポトーシスの研究から発

展した細胞膜リン脂質の研究は細胞死の研究だけでなく細胞生物学全般に影響を与えるものと考えている。

最後に私の恩師の先生方の言葉で講演を締めくくりたい。

上代淑人先生(1929-2011)

「full devotion in science , friendly atmosphere , continue excitement」

チャールス・ワイスマン教授(1931-)

「Enjoy science」

早石修先生(1920-2015)

「研究者は運、鈍、根。既成概念に囚われぬ鈍才の方が向いている」

「バカになれ、納得いくまで実験を繰り返せ」

以上

注：(編集者)

- 1 リボソーム：生体タンパク質合成（mRNA の翻訳）をする分子機械
- 2 cDNA：細胞内の mRNA の相補的な配列を持つ DNA のことで、cDNA の配列を調べることによって細胞内で発現している遺伝子について知ることができる。その中から目的の遺伝子を単離することを cDNA クローニングと呼ぶ。
- 3 リソソーム：さまざまな分解酵素を含む細胞内小器官