

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07086

研究課題名(和文)死細胞DNA分解酵素群の相分離による時空間的機能制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of spatiotemporal control mechanism of dead cell DNA degrading enzymes by phase separation

研究代表者

水田 龍信(Mizuta, Ryushin)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：50297628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNase (別名DNase1L3)はDNase 1ファミリーに属するDNA分解酵素で、DNase 1とともに血流中に存在する。漏出したクロマチンはまずDNase で大きく切断され、cell-free DNA (cfDNA)として血流中に放出される。その後、DNase 1で細かく裁断されるが、その時間的・空間的使い分けのメカニズムは不明であった。我々は相分離クロマチンへの親和性の差が、その使い分けの差を生み出していること、またcfDNAの生成には一部DNase 1の関与もあることを見出した。さらにDNase 1には抗腫瘍活性があることを遺伝子欠損マウスの実験で明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は20年にわたるDNase 1を中心とした死細胞DNAの分解研究の集大成であるとともに、DNA分解と相分離の関連を見出した事により、新たな展開の道を開いた。より普遍的には、生命現象の根本に相分離を位置づけ、個別の事象を統一的に捉えなおすきっかけになることが期待される。またDNase 1の抗腫瘍活性の発見は新規治療戦略の創出という点で、臨床的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：DNase (also known as DNase1L3) is a DNA-degrading enzyme that belongs to the DNase 1 family and is present in the bloodstream together with DNase 1. The leaked chromatin is first largely cleaved by DNase 1 and released into the bloodstream as cell-free DNA (cfDNA). It is then finely cut by DNase 1, but the mechanism of its temporal and spatial differentiation was unknown. We found that the difference in affinity to phase-separated chromatin creates the difference in its differentiation, and that DNase 1 is also involved in the generation of cfDNA. Furthermore, experiments with gene-deficient mice revealed that DNase 1 has antitumor activity.

研究分野：免疫学、分子生物学

キーワード：DNase DNase1L3 DNase 1 相分離 cfDNA 抗腫瘍効果 クロマチン Histone H1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞死には大きく分けてアポトーシスとネクローシスがあり、アポトーシスの指標として有名なヌクレオソーム単位の DNA の断片化は、大阪大学の長田らにより単離・同定された CAD という酵素が担っているとされている。しかしながら DNA 断片化を起こす酵素は CAD 以外にも DNase (別名 DNase1L3)、DNase 1 などがあり、それぞれの役割や、使い分けに関しては不明な点が多い。特に DNase は、約 20 年前に東京理科大学の田沼らが発見した酵素であるが、その生理的役割に関してはほとんど明らかになっていなかった。我々は当初より田沼らと共同で、分子レベル、細胞レベル、個体レベル(遺伝子改変マウスの作成を含む)の解析を行ってきた。その結果、ネクローシスの際にも DNA の断片化が起こり、それを司る酵素が DNase や DNase 1 であることが明らかになった(Mizuta et al. *PLOS ONE*, 2013)。また、血液中には DNase、DNase 1 が存在し、ネクローシス細胞の DNA の分解に関与し(Koyama et al. *Genes to Cells*, 2016)、さらに、活性化した好中球から放出される好中球細胞外トラップ (NET) を分解し、血栓形成を抑制することを報告した(Jiménez-Alcázar et al. *Science*, 2017)。また分解された DNA はいわゆる cell-free DNA (cfDNA)として血液中に存在し、出生前診断やがんの診断に応用できることを明らかにした(Watanabe et al. *BBRC*, 2019)。cfDNA の解析は低侵襲の liquid biopsy として、またがんゲノム医療の基盤技術として最近注目を集めている。NET に関しては、がん転移の足場になっているという説や、最近、COVID-19 感染の重症化の要因に血栓形成があり、それを引き起こしているのが、好中球活性化による NET 形成であると言われている。そのため、NET を分解する DNase、DNase 1 に大きな関心が寄せられている。しかしながら、その両者の使い分けに関してはいまだ完全には解明されていない、最適な投与プロトコールの確立には至っていない。

我々のこれまでの研究により、血液中に漏出した DNA は最初に DNase で大きく切断され、その後 DNase 1 で細かく分解されるという時間的・空間的制御の存在が明らかになっている。またその制御の要因として Histone H1(以下 H1)の関与を見出していた(Kijima et al. *BBRC*, 2019)。H1 はヌクレオソーム間にあるリンカー部位に結合するタンパク質で、H1 存在下では DNase 1 のクロマチン分解活性は阻害されるが、DNase の分解活性は阻害されないことは分かっていた。しかしながら、そのメカニズムに関しては全く不明であった。ところが最近、H1 が「液-液相分離」を起こすタンパク質で、ヘテロクロマチンなどの高次構造の形成などに関与することが報告された(Turner et al. *PNAS*, 2018)。液-液相分離とは、均一な溶液が複数の液相に分離する現象で、分離した相は水に浮いている油のような状態 = 「液滴」になる。液-液相分離は、実は身近な物理現象で、細胞内には幾種類もの液滴が存在し、核小体などもその一つである。このような細胞内の液滴においては、特定のタンパク質の濃度が高く、そのタンパク質が関与する化学反応が起こりやすくなっている。また液滴を形成するタンパク質には Low complexity domain (LCD) という特徴的なアミノ酸配列の存在が報告されていて、実際 H1 にも N 末端、C 末端にそれぞれ一つずつそのドメインが存在する。興味深いことに、DNase は DNase 1 よりも約 30 アミノ酸長い C 末端を有するが、これが LCD であることを我々は見出した。以上のことから、相分離を起こしたクロマチンへ DNase はアクセスしやすく、DNase 1 はアクセスしにくいのではないかという仮説を抱くようになった。

### 2. 研究の目的

本研究では、死細胞 DNA の分解処理において、相分離現象がどの様に関与しているのかを検討するとともに、我々が作成した遺伝子改変マウスを用いて、それぞれの DNase の役割の全容を解明することを目的とした。この研究は 20 年にわたる DNase を中心とした死細胞 DNA の分解研究の集大成であり、DNA 分解と相分離を結び付けた点に新規性がある。また DNA の分解という特殊な状況においても、相分離の関与の可能性を見出したことから、全ての生物現象の根幹には相分離現象がある可能性を示唆し、これまで細分化していた各研究分野を相分離という概念で統一的に捉えなおすきっかけになるという点で普遍性がある

### 3. 研究の方法

本研究では死細胞 DNA の分解メカニズムの解明を基本テーマにし、相分離の関与を検証する。そのため階層性を意識し、生化学的解析、細胞レベルの解析、そしてマウスを用いた生理学的解析を行う。

#### (1) 生化学 相分離した H1 液滴の生成条件の検討と DNase の活性比較

試験管内で、H1 と DNA 断片を適度な比率で混ぜ合わせると、相分離が起こり、液滴形成が見られることは報告されているが、塩濃度が低く、生体内での環境を模したものではない。DNase 活性を比較するためには、Plasmid DNA を用い、生理的塩濃度、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  の存在下、H1 : DNA の最適比を決定する必要がある。これらの条件検討を行った後、DNase あるいは DNase 1 と反応させた時の DNA 切断活性を検討する。

#### (2) 細胞生物学 細胞内局在と機能ドメインの探索

DNase は DNase 1 ファミリーに属し、アミノ酸構造はきわめて類似している。唯一の違いは C 末端で、DNase は約 30 アミノ酸長く、そこには核移行シグナル様の配列もある。コンピュータ解析から、この C 末端が相分離を起こすタンパク質に特有の LCD であることを見出ししている。そこでまず、このドメインと蛍光タンパク質を融合させたものを細胞に発現させ、局在を観察する。

### (3) 遺伝子改変マウスを用いた各種 DNase の生理的役割

現有の CAD 遺伝子欠損マウス、DNase 遺伝子欠損マウス、CAD/DNase 二重遺伝子欠損マウス、CAD/DNase /DNase 1 三重遺伝子欠損マウスを用い、各種細胞死誘導後の血液中の DNase 1、DNase 活性と細胞死症状の進行の相関を検討する。また、cfDNA 生成への影響を観察する。さらに DNase に関しては、発がん抑制の可能性が指摘されているため、各種発がんモデルを使って、その関与を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 液滴形成による DNase の DNA 切断活性の増強

相分離した DNA に対する酵素の DNA 切断活性を検討するために、まず生理的塩濃度、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  の存在下での、H1 と Plasmid DNA による相分離液滴形成の条件検討を行った。その結果、DNA 量を固定し、H1 量を増やしていくと、量比が 1:0.25 の時に液滴が出現し、1:1 を超えると相分離から相転移へ移行し、不溶性の凝集体が出来た。つまり、相分離液滴の形成には適度の H1 と DNA が必要で、液滴形成後 DNase や プラスミンでそれぞれ DNA や H1 を分解すると液滴が解消されることも明らかとなった。液滴形成の条件が確定したので、その条件下で、DNase 1 あるいは DNase と反応させた時の DNA 切断活性を検討した。その結果、H1 量に比例して DNase 1 の DNA 切断活性は低下していき、相分離液滴形成が、その活性に関してはマイナスに働いていた。これに対して DNase に関しては、一過性に DNA 切断活性が亢進し、相分離液滴形成が、プラスに働くことが明らかとなった。なお作成した液滴に相分離阻害剤として広く知られている 1.6 hexandiol を添加すると液滴が消えることから、H1 と Plasmid DNA によって作られた液滴は確かに相分離液滴であることが確認された。

### (2) C 末の LCD による DNase の相分離クロマチンへの局在

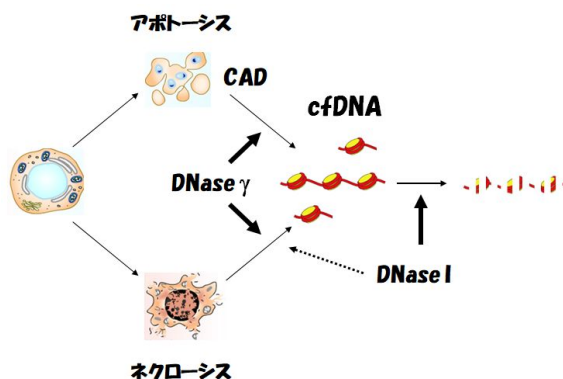
前述のごとく液滴を形成するタンパク質には LCD という特徴的なアミノ酸配列が存在し、それを検証する解析ソフトが存在する。H1、DNase、そして DNase 1 のアミノ酸配列を基に LCD の有無を検討すると H1 には N 末端、C 末端にそれぞれ一つずつそのドメインが存在するが、DNase 1 には無い。DNase は DNase 1 よりも C 末が約 30 アミノ酸ほど長く、そこが LCD 様の構造をしていることが明らかとなった。そこでまず、このドメインと蛍光タンパク質を融合させたものを細胞に発現させ、局在を観察したところ、この C 末融合蛋白は、ヘテロクロマチンと核小体に局在することが明らかになった。いずれも細胞内の相分離液滴として知られていて、ヘテロクロマチンには H1 も局在する。以上より、DNase は相分離液滴の一種であるクロマチンにアクセスしやすく、それは DNase C 末端の LCD によるものであることが明らかになった。一方、DNase 1 には LCD が存在せず、クロマチンにはアクセスしにくいと予想される。また DNase 1 は G actin によって不活化されることが知られていることから、細胞内のクロマチンにアクセスし、それを切断する確率はかなり低いものと考えられる。

### (3) cfDNA の生成と抗腫瘍効果

cfDNA の生成への DNase 1 の寄与 我々はこれまでに DNase と CAD が血流中に存在する DNA すなわち cfDNA の生成に関与することを明らかにしている。しかしながら CAD/DNase 遺伝子の二重欠損マウスでも微量の cfDNA が検出された。そこで CAD/DNase /DNase 1 遺伝子の三重欠損マウスを用いて検討を行ったところ、cfDNA は全く検出されなくなった。したがって、DNase 1 は cfDNA の分解だけではなく、極めて限定的ながら、その生成にも寄与することが明らかになった。

DNase の抗腫瘍効果 以前より DNase

活性とがん患者の予後の関連性が報告されていた。実際にデータベース上で腫瘍内での DNase の発現を検討すると、多くの腫瘍でその発現の低下が見られ、更にそれは悪性度と相関していた。そこで担癌マウスを作成したところ、DNase 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて腫瘍の増殖が速く、抗腫瘍免疫効果の低下が考えられた。実際、腫瘍内の活性化樹状細胞と T 細胞の数は野生型に比べて、DNase 遺伝子欠損マウスで少なく、DNase 活性と抗腫瘍効果の関連性を確認した。



DNaseによる血液中DNA(cfDNA)生成のメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 WATANABE Taiki, TAKADA Shuhei, ONOZATO Mayu, FUKUSHIMA Takeshi, MIZUTA Ryushin	4. 巻 84
2. 論文標題 The difference of chows affects mouse physiological conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 582 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li Wenling, Nakano Hideki, Fan Wei, Li Yuanyuan, Sil Payel, Nakano Keiko, Zhao Fei, Karmaus Peer W., Grimm Sara A., Shi Min, Xu Xin, Mizuta Ryushin, Kitamura Daisuke, Wan Yisong, Fessler Michael B., Cook Donald N., Shats Igor, Li Xiaoling, Li Leping	4. 巻 8
2. 論文標題 DNASE1L3 enhances antitumor immunity and suppresses tumor progression in colon cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.168161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北村 大介  (Kitamura Daisuke)  (70204914)	東京理科大学・研究推進機構生命医学研究所・教授   (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

米国	NIEHS	University of North Carolina		
----	-------	------------------------------	--	--