

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 個体における細胞ストレス応答代謝産物の遺伝生物学的解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)：

研究代表者

三浦 正幸 (東京大学大学院薬学系研究科 教授)

3. 研究実施概要

生体が健常な状態を維持しているその背景には、常に受ける様々なストレスに個体が巧みに応答していることがある。細胞内のストレス情報伝達機能の研究は目覚ましい進展を見せているが、個体という細胞社会の中で、細胞や組織間の相互作用に注目したストレス応答研究は未だ少なく解明されるべき課題が多い。本研究では個体におけるストレス応答を、代謝という観点から遺伝生化学的に全身性及び、細胞レベルの応答を明らかにすることを目標に実施した。

細胞がストレスを受けた場合、その強さ、あるいは細胞のおかれた状態によって異なる応答が想定される。野生型では細胞が強いストレスを受けた場合、カスパーゼの活性化→アポトーシス→組織修復あるいは再生、といった生体反応が考えられる。この際、アポトーシス細胞から放出され周りの細胞の代償性増殖を促進する因子の存在が明らかになってきた。一方でカスパーゼの活性化が抑制された状態では細胞死不全、あるいはネクローシスが生じることによって二次的な変化が引き起こされる。本研究では、カスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* の機能欠損変異体が、創傷刺激に対して脆弱であるとの知見から、その分子メカニズムの解明に向けた研究から開始した。

創傷後の生体応答としてカスパーゼ活性化が生存維持に必須である。そこでカスパーゼインディケーターを発現させ、創傷刺激後のカスパーゼ活性化部位を特定したところ、創傷後 30 分で創傷部位とは離れた腸においてカスパーゼ活性化が観察された。腸で特異的にカスパーゼ活性化を抑制すると *dapaf-1* の機能欠損変異体と同様に創傷刺激に対して脆弱になった。

dapaf-1 の機能欠損変異体の創傷後の脆弱性には体液中の液性因子が関わることを予想されたため、野生型及び変異体ショウジョウバエ体液サンプルを採取して、プロテオミクス解析を行った。プロテオミクス解析の結果、創傷ストレス刺激後の *dapaf-1* 変異体において発現上昇する蛋白質に関して、RNAi を用いたノックダウンによる機能解析を進めている。その結果、一つの遺伝子産物が創傷後の脆弱性に関わることが見いだされている。

メタボローム解析では、野生型と *dapaf-1* 変異体で顕著に異なる代謝産物としてサルコシンが同定された。*dapaf-1* 変異体は創傷のみならず飢我ストレス、酸化ストレスに対しても脆弱であり、その際にサルコシンの顕著な上昇が観察された。サルコシン合成酵素 (sarcosine dehydrogenase)、分解酵素 (glycine N-methyltransferase) がショウジョウバエにはゲノムにそれぞれ1つずつ遺伝がある。これら遺伝子の過剰発現系統、ノックダウン系統を得てサルコシンの代謝が制御出来るようになった。また、サルコシン代謝と密接な関わりのあるメチオニンサイクルの変調も *dapaf-1* 変異体で観察されている。これら代謝経路のストレス応答への関わりを解析を進めている。

ショウジョウバエ、マウスでのストレスシグナル動態解析系を構築し、生体での細胞死の役割に関して多くの知見をえた。マウスでは神経発生において顕著な細胞死が起こる神経管閉鎖期においてカスパーゼ活性化の役割が明らかになった。神経管閉鎖の危険因子として葉酸の不足がいわれているが、この経路はメチオニン代謝とともに、1カーボン代謝経路を構成しており、ストレス応答の観点で詳しい解析を進めている。

嗅覚神経系ではカスパーゼ依存的な軸索伸長・成熟機構があることが明らかになり、神経回路網の形成機構のみならず脳の恒常性の維持やその破綻によって引き起こされる疾患メカニズムの理解へとつながることが期待される。

ショウジョウバエにおいては、外感覚器形成過程の全てを1細胞レベルの解像度で追跡する系を確立した。そして細胞死シグナルの動態を新たに開発したカスパーゼ制御因子 IAP を可視化するプローブ PRAP によって詳細に観察した。外感覚器形成過程では分化に失敗した細胞が出現し、その細胞を特異的に取り除くことによって発生で生じる分化エラーを除去していることが明らかになった。

細胞社会の中では細胞同士の競合的なふるまいが観察され、このふるまいは組織再編やがん原性細胞の監視に重要である。組織再編では再編部位での局所のカスパーゼ活性化と細胞増殖とが相互作用し、細胞の入れ替わりを制御することが明らかになった。細胞競合は新生がん原性細胞の組織からの排除に関わるが、遺伝学的なスクリーニングによって、エネルギー代謝に関わる遺伝子が、このプロセスに関わることを明らかにした。

老化過程では様々なストレス関連遺伝子が上昇し、神経変性のリスクが高まる。24ヶ月齢マウスの脳では、カスパーゼ9が活性化するが、この活性化はカスパーゼ3の活性化を伴わず、細胞死の誘導をしているのではないことが明らかになった。老化脳ではイニシエーターカスパーゼの活性化はあるものの、アポトーシスが抑制された状態にあり、このアポトーシス機能の低下が慢性的な生体ストレス応答の増大につながる可能性が考えられる。

ショウジョウバエを用いた遺伝子過剰発現スクリーニングによって19Sプロテアソームの構成因子Rpn11が神経変性を抑制することを見いだした。Rpn11の発現が老化によるプロテアソーム活性低下を抑制し、神経変性の進行を遅らせる事を明らかにした。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

本研究では、カスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* の機能欠損変異体ショウジョウバエが創傷刺激に対して脆弱であることを見出し、その分子メカニズムの解明に取り組んできた。その結果、創傷後に腸で特異的カスパーゼ活性化が起こり、腸でのカスパーゼ活性化抑制系では傷害刺激に高感受性を示すこと、加齢に伴いプロテアーゼ活性が低下すること、体液の移入実験から *dapaf-1* の機能欠損変異体の創傷後の脆弱性には体液中の液性因子が関わることなどを明らかにした。また、野生型および変異体の体液のプロテオーム解析により、創傷ストレス刺激後に自然免疫系の蛋白質発現が上昇すること、メタボローム解析により、ザルコシンが増加し、メチオニンサイクルが変調することなどを明らかにした。ショウジョウバエでの解析に加え、マウスでの研究も行われ、老化脳においてカスパーゼ9が活性化するもののアポトーシスは抑制されること、カスパーゼ9や *apaf-1* ノックアウトマウスを用いて、カスパーゼ9が嗅神経細胞軸索の投射や成熟を制御することなどを明らかにした。これらの研究は、極めて独創性の高い研究と位置づけることができる。研究成果は、質の高い国際誌に着実に発表されてきている。現段階では特許出願するような研究成果は得られていない。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

取り組んだどのテーマも独自性の高い研究であり、国内外に類似研究がなく、従って、学術的インパクトは極めて大きい。カスパーゼ活性化を可視化する方法の開発など、技術的にインパクトのある成果も挙げている。ショウジョウバエで見出した知見を基盤として、カスパーゼの活性化不全を示すモデル動物を用いた研究からも、神経管閉鎖期におけるカスパーゼの役割の解明など、幾つもの成果が得られてきており、今後、ヒトの疾患との関連性から社会的インパクトを与える可能性も出つつある。メタボローム解析から、ザルコシンの同定を経て、カスパーゼとメチオニンサイクルとの関連性を発見するなど、戦略目標に大きな貢献をした。

4-3. 総合的評価

分子遺伝学的手法に適したショウジョウバエの変異体を用い、傷害ストレス応答におけるカスパーゼの生理的意義を明らかにし、感度の向上したメタボローム解析やプロテオーム解析により、メチオニン経路のサルコシン代謝がストレス応答に関わることが示されたことなど、新規性の高い成果を挙げている。創傷部位とは離れた腸においてカスパーゼの活性化が起きることを示した成果もすぐれたものである。ショウジョウバエ変異体の解析から遺伝子破壊マウスを用いた研究への新たな展開も評価できる。研究領域の成果にてらして、十分な成果が得られたものと評価できる。