

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」
平成19年度採択研究代表者

三浦 正幸

東京大学大学院薬学系研究科・教授

個体における細胞ストレス応答代謝産物の遺伝生化学的解明

§ 1. 研究実施の概要

生体は常に様々なストレスにさらされているが、ストレスを受けた細胞の応答に個体は巧みに反応して健全な状態を維持する。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、細胞や組織間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。我々は生体ストレス応答を個体レベルで明らかにするために、遺伝学的研究に優れたショウジョウバエを用いて研究を進めている。細胞死の実行に重要なカスパーゼは様々なストレスに応じて活性化するが、その活性化の程度や様式によって生体に多様な反応を引き起こすことが明らかになってきた。本年度の研究では、カスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* の機能欠損変異体が、傷害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を多方面から行った。体液の移入実験から *dapaf-1* の機能欠損変異体の傷害後の脆弱性にはシステミックな因子が関わる事が予想されたため、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、プロテオミクス及びメタボローム解析を行った。プロテオミクス解析の結果、創傷ストレス刺激後に自然免疫系の蛋白質の発現上昇が観察され、さらに *apaf-1* 変異体では危険信号因子として作用しうる蛋白質が上昇していた。キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計を用いたメタボローム解析では、野生型と *dapaf-1* 変異体、創傷の有無によって変化するメタボロームがいくつか同定された。創傷刺激による自然免疫系の活性化は、正常な発生・成長過程で多くの細胞死がおこるステージにおいても観察され、その活性化は *dapaf-1* 変異体でさらに増強した。よって創傷のみならず組織のリモデリングでもカスパーゼに依存した自然免疫系の調節があることが示唆された。ストレスシグナルの流れを生体イメージングで明らかにする目的で、創傷後におこるカスパーゼの活性化を組織レベル解析し、創傷後に腸でのカスパーゼ活性化が観察された。カスパーゼの活性化はその内在性阻害因子 DIAP1 によって調節されているが、その活性は DIAP1 蛋白質代謝によって調節されている。DIAP 代謝を生体イメージングに寄って捉えることの出来る新規プローブ PRAP の開発に成功したため、今後、カスパーゼインディケータ SCAT とともにストレスシグナルの生体イメージング解析を行って行く。ほ乳類でのカスパーゼ活性化を可能にする SCAT 発現マウスの開発にも着手した。さらに、組織学的にカスパーゼを検出しうる抗体の検討も行き、老化脳

においてカスパーゼ9が活性化することを見いだした。

§ 2. 研究実施体制

(1)「三浦」グループ

① 研究分担グループ長: 三浦 正幸 (東京大学大学院、教授)

② 研究項目

個体における細胞ストレス応答代謝産物の遺伝生化学的解明

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

【1. 傷害ストレスによる体液変化のプロテオーム解析】

dapaf-1 変異体は傷害刺激によって数日後には致死になる。*dapaf-1* 変異体傷害後 48 時間の体液を取得して、野生型にその体液を移入すると、*dapaf-1* 変異体と同じような時間経過をへて致死になった。この活性は、加熱によって失活する。高速遠心濾過ユニットを用いて分子量による分画を行ったところ、活性は分子量1万以上の分画で検出された。これらのことから致死性誘導に関わる分子候補として蛋白質を想定し、体液のプロテオミクス解析を行った。キャピラリーを用いた体液取得法によってサンプルを得て、首都大学東京・磯辺研究室との共同によって分析を行った。野生型、*dapaf-1* 変異体それぞれに傷害刺激あり/なしの条件で実験を行い、48 時間後に体液を採取して分析を行った。その結果、野生型、*dapaf-1* 変異体において、創傷刺激を与えた個体の体液では複数の自然免疫系蛋白質が誘導されてきた。*dapaf-1* 変異体においては自然免疫系蛋白質に加え、危険信号(デンジャー)因子候補分子も創傷刺激後に観察された。自然免疫系分子の発現を定量的 RT-PCR によって調べたところ、多くの分子は創傷刺激後に変異体で野生型よりも過剰に RNA レベルでの発現上昇が認められている。

興味深いことに、創傷刺激後48時間で *dapaf-1* 変異体において体液に出現してくる蛋白質遺伝子の発現を若齢・老齢個体で比較してみると、いずれも老化個体で著しい発現上昇が認められた。これらは創傷ストレスと老化に共通するストレス応答産物である可能性があり、注目して研究を続けている。ショウジョウバエは成虫においても多くの細胞死が観察される組織、ステージがあり、内在的にカスパーゼが関与するストレス応答がおこると予想した。実際にプロテオミクスで同定されたストレス応答産物の遺伝子発現は組織での細胞死がおこる時期に一致して上昇した。そしてこれらの遺伝子は *dapaf-1* 変異体においてさらに増加した。これはアポトーシスの阻害が強いストレス応答を引き起こしている可能性を示唆するものであり興味深い。また、老化に伴ってアポトーシスが阻害されることもほ乳類脳で観察しており(後述)、老化に伴って強いストレス応答がおこることと何らかの関連性を考えている。

【2. 傷害ストレスによる体液変化のメタボローム解析】

生体でのストレスシグナルとして低分子物質(ATPなど)が危険信号伝達因子として機能すること

が知られている。傷害後の *dapaf-1* 変異体体液を野生型に注入する実験においてみられる致死性が、体液を注入前に加熱することでみられなくなることから、体液中の致死誘導分子候補として蛋白質を想定した。一方この実験において、体液を注入して致死性があらわれる時期に時間差があることを考慮すると、低分子物質などの代謝産物がストレス応答の初期、あるいは後期に経時的に蓄積することが予想され、メタボローム解析の重要性が考えられた。ショウジョウバエ体液でのメタボローム解析はサンプルが微量であることから解析が難しく、これまでは全く行われていなかった。そこで、ストレス応答性の体液代謝産物を解析するために、慶應義塾大学・曾我研究室と共同でキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計における体液サンプルのメタボローム解析の条件を検討し、微量なショウジョウバエ体液サンプルでの解析が可能になった。野生型と *dapaf-1* 変異体、創傷の有無によって変化するメタボロームがいくつか同定されたので、これら代謝産物の代謝に関わる酵素の過剰発現、あるいはノックダウンショウジョウバエを用いて解析を進めている。

【3. ストレスシグナルの生体での動態解析】

傷害刺激において個体が耐性を獲得するためのカスパーゼ活性が必要とされる組織の特定を遺伝学的に行った。具体的には、上皮、脂肪体細胞、腸、ヘモサイト(免疫担当細胞)といった組織や細胞で特異的にカスパーゼ阻害遺伝子 *p35* を発現させ、傷害後の致死率を調べた。その結果、脂肪体組織と腸に *p35* を発現させると傷害刺激に脆弱になった。そこで、これら組織における傷害後のカスパーゼ活性化をモニターする実験を行った。脂肪体組織と腸に、CFP-YFP の FRET をベースに構築したカスパーゼインディケーター SCAT3 を発現させ、傷害刺激を与えて継続的に FRET 比率を観測した。その結果、FRET 比率の変化にみられるカスパーゼの活性化は、低レベルではあったが刺激後 15 分で腸において観察された。現在、傷害後のカスパーゼ活性動態変化をより高い検出感度と空間時間分解能により生体イメージングするために、光学系構築やサンプリングの工夫を試みている。

【4. カスパーゼ活性化を伴う生体ストレスに関与する遺伝子のスクリーニング】

上記カスパーゼの生体イメージングによって腸でのカスパーゼ活性化が創傷刺激後に観察されたため、腸でのカスパーゼ活性化の機能を見る目的で、腸特異的 Gal4 ドライバーによってカスパーゼ阻害遺伝子 *p35* を発現させた。このショウジョウバエに創傷刺激を与えると *dapaf-1* 変異体と同様な致死性を示すことが明らかになった。そこで、創傷刺激に関係する遺伝子をスクリーニングする目的で、腸特異的に遺伝子をノックダウンする系統を用いたスクリーニングを開始した。

【5. 新たなストレスシグナル動態解析プローブの開発】

動物細胞では進化的に保存された内在性カスパーゼ阻害遺伝子として IAP (Inhibitor of Apoptotic Protein) が知られている。IAP は E3 ユビキチンリガーゼであり代謝回転のはやい短寿命蛋白質である。IAP 蛋白質の量的な調節によってカスパーゼ活性の調節が行われているため、IAP 分解を生体内でリアルタイムに可視化することでカスパーゼ活性化シグナルの時空間的な解析が可能になると考えられる。ショウジョウバエ DIAP1-venus (GFP variant) を作成し、細胞死刺激によって細胞死が誘導され venus による蛍光の消失がみられるトランスジェニックショウジョウバエ

を作成した。このプローブは、DIAP1 に変異を導入することでカスパーゼとの結合は出来ないがプロテアソームによって内在性の DIAP1 と同様に分解されるようにデザインされている (Pre-apoptosis signal detecting probe based on DIAP1 degradation: PRAP と命名)。生体イメージングにおいては十分なプローブの発現が必要であるが、PRAP は高レベル発現させてもカスパーゼ阻害による細胞死には影響が無かった。PRAP を用いての単一細胞レベルでの生体イメージングが可能になったことから、組織傷害時におけるカスパーゼ活性化シグナルの動態を SCAT とともに今後解析していく(2)。

【6. マウス老化脳でのカスパーゼ活性化】

ほ乳類の解析に SCAT を用いた解析系を構築中であるが、これと平行して組織化学的にカスパーゼ活性化細胞を検出する系の構築を行った。神経系や免疫系で重要な働きをするセマフォリン7A がカスパーゼ9 によって特異的に切断されることを見だし、この切断されたセマフォリン7A を組織化学によって検出する抗体を用いて、脳の老化におけるカスパーゼの活性化を解析した。その結果、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(1)。このように、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る。ショウジョウバエでは老化に伴って創傷刺激で誘導されるストレス応答分子が顕著に上昇しているが、マウス脳の解析から類推するとアポトーシス機能の低下が生体でのストレス応答の増大につながる可能性が考えられる。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Ohsawa, S., Hamada, S., Asou, H., Kuida, K., Uchiyama, Y., Yoshida, H., and Miura, M.: Caspase-9 activation revealed by Semaphorin 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. *J. Neurosci.* 29, 11385-11392, 2009

doi:10.1523

2. Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Temporal regulation of Drosophila IAP determines the dual functions of caspases in sensory organ development. *J. Cell Biol.* 187, 219-321, 2009

doi:10.1083