

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。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。一方でカスパーゼの活性化が抑制された状態では二次的なネクロシスが生じ、その際に様々な危険信号分子が生体内に放出される。このような状況は生体の恒常性に関わる細胞死と再生が行われなくなった場合にも生じ、その場合には慢性的な炎症状態を引き起こすと考えられる。慢性的な炎症が癌や糖尿病、神経変性といった様々な疾患の根底にあることが最近注目されているが、カスパーゼの活性化不全を示すモデル動物を用いた解析はこのような慢性炎症時の生体応答を明らかにする上でも重要である。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、様々なストレス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開始し、さらに様々な病態モデル、老化といった異なった生体ストレスに対する応答を多方面から解析している。傷害後に腸で特異的にカスパーゼ活性化がおこり、腸でのカスパーゼ活性化抑制システムでは傷害刺激に高感受性を示した。腸での遺伝子不活性化による遺伝学的なスクリーニングによって、脆弱性に関与する遺伝子が得られている。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に関わることが予想されたため、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* 変異体で顕著に異なる代謝産物同定された。ショウジョウバエでの解析に加え、マウスでのカスパーゼ活性化動態解析系構築、カスパーゼ活性化不全マウスの解析をあわせて行うことで、進化的に保存されたストレス応答機構を明らかにしていく。

§ 2. 研究実施体制

(1)「三浦」グループ(研究機関別)

- ① 研究分担グループ長:三浦 正幸 (東京大学薬学系研究科、教授)(研究代表者)
- ② 研究項目・生体におけるストレス応答の遺伝学的、生化学的、細胞生物学的解析

§3. 研究実施内容

【創傷ストレスに対するカスパーゼを介した生体防御】

dapaf-1 依存性に関して様々なアレルでの遺伝学的な検討を詳細に行って、傷害ストレスに対する脆弱性は *dapaf-1* 変異に基づくことを明らかにした。さらに、傷害ストレスに対する脆弱性は、*dapaf-1* 変異体だけでなく、カスパーゼ阻害蛋白質 p35 の発現によっても観察されたことから、この表現型がカスパーゼ活性の低下に起因することが示唆された。次に創傷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。ショウジョウバエ Gal4/UAS 発現系を用いて、上皮、脂肪体組織、腸、血球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、創傷後の致死率を調べた。その結果、腸に *p35* を発現させると創傷刺激に対して脆弱になることが明らかになった。

【創傷ストレスにおけるカスパーゼ活性化と細胞間相互作用の解析】

創傷後のカスパーゼ活性化をモニターする実験系の構築を行った。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、あるいは CD8-PARP-Venus(カスパーゼ3による切断によって生じるネオエピトープを抗切断型 PARP 抗体で検出する)を発現させ、創傷刺激を与えて経時的にカスパーゼの活性化を観測した。その結果、創傷後 30 分で腸においてカスパーゼ活性化が観察され、その後3時間、6時間と増加するが24時間で沈静化した。

【創傷ストレスによる体液変化のプロテオーム解析】

致死性に関する因子の存在が体液移入実験によって示唆された。具体的には *dapaf-1* 変異体創傷後 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。そこでこの体液サンプルを用い、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。この分析では野生型の体液を用いて 1000 以上の蛋白質の同定が可能である。分析の結果、危険信号やその受容にかかわることが予想される分子が創傷刺激後の *dapaf-1* 変異体体液中に多数同定された。また、野生型と比較して *dapaf-1* 変異体では恒常的に上昇している自然免疫関連の分子もあり、*dapaf-1* 変異体での慢性的な炎症状態を反映するものとして注目している。また、内在性の危険信号因子を受容して、システミックなシグナルとして組織にストレス応答を惹起する可能性のある分子も *dapaf-1* 変異体体液中に上昇する因子として同定されており、併せて詳しい解析を進めている。

【創傷ストレスによる体液変化のメタボローム解析】

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が、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。その結果、カスパーゼ活性化変異体で特異的に上昇する3つの代謝産物が得られた。この中で、代謝酵素がヒトとショウジョウバエで保存されていて、その代謝の人為的制御が可能な代謝産物に注目して解析を進めている。

【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】

腸特異的な遺伝子ノックダウンを行った系統に創傷を与え、その後の致死性を指標にしたスクリーニングを進めている。1000 の RNAi 系統中、約 1% で創傷感受性が見られている。これらの系統に関しては創傷後のカスパーゼ活性化、カスパーゼやその活性化遺伝子とのエピスタシス、さらにメタボローム解析で明らかになった代謝との関連を検討していく。

【ストレス応答遺伝子、代謝産物の制御と生体機能】

プロテオーム解析から得られた自然免疫関連分子に関しては、その変異体を得て表現型解析を行っている。興味深いことにこの変異体は *dapaf-1* 変異体と同じように創傷感受性が見られており、システミックなストレス情報伝達に関わる可能性を考えている。

【他のストレス、病態モデル、老化における遺伝子、代謝産物の関与の検討】

加齢に伴う生体内のプロテアソーム活性の低下が、神経変性疾患発症のリスクファクターの一つである可能性を前年度に明らかにした。蛋白質分解系の低下による異常蛋白質の蓄積に加え、原因遺伝子産物の質的な変化が晩発性神経変性の原因になる可能性を考え実験を行った。伸長ポリグルタミンによるショウジョウバエ複眼変性モデルに、時間的な発現制御システムを導入し、詳細な検討を行った結果、若年で発現させたポリグルタミンアミロイドと老齢個体で発現させたポリグルタミンアミロイドとでは質的な変化があることを明らかにした 4)。

生体イメージングを用いた神経発生の解析から、創傷や病態、老化のみならず正常発生の中でもストレス応答がダイナミックに行われていることが前年度の解析で明らかになった。この解析をさらに進めた結果、カスパーゼを用いた細胞死が神経系のパターン形成に用いられていることが初めて明らかになった。本研究の知見は、正常発生の仕組みをストレス応答という新たな視点から捉えるきっかけになるのではないかと期待している 3)。

【カスパーゼ活性化不全マウスの表現型解析】

嗅覚神経系でのカスパーゼ活性化不全マウスの詳細な解析により、カスパーゼの神経成熟に関わる非アポトーシス機能が明らかになった 1)。嗅神経細胞は一生に渡って新生を続けるユニークな神経細胞である。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の初期段階において匂いの識別能力が低下していることから、発生期以降の嗅神経細胞の新生と病態との関連性が注目されている。カスパーゼ依存的な軸索伸長・成熟機構の発見は、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。コンディショナルにカスパーゼ阻害蛋白質 p35 を発現するマウスの作製が出来たことから、その表現型解析を始めている。

【マウスにおけるカスパーゼ活性化動態解析】

SCAT3 を発現するマウスの作出に成功し、神経管閉鎖時のアポトーシスとカスパーゼの活性化ダイナミクスが生体イメージングによって初めて観察された。このマウスを使い、ストレス刺激によるカスパーゼ活性化動態を詳細に解析していく。

【マウスにおけるストレス応答遺伝子、代謝産物の制御と生体機能】

ショウジョウバエから明らかになった遺伝子、代謝産物の解析をマウスでも展開する。マウス個体を用いた遺伝子解析を効率よく行うために、子宮内電気穿孔法に Tol2 トランスポゾンを組み合わせることによってゲノムに遺伝子を安定に導入し発現解析を可能にする実験系を確立した 2)。

§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., Kuida, K., Yoshida, H., Igaki, T., and Miura, M.: Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 13366-13371, 2010 (DOI: 10.1073/pnas.0910488107)
2. Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., and Miura, M.: Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon mediated gene transfer system. *Genes to Cells* 15, 501-512, 2010 (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01397.x)
3. Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs. *Cur. Biol.* 21, 278-287, 2011 (doi:10.1016/j.cub.2011.01.015)
4. Tonoki, A., E. Kuranaga, N. Ito, Y. Nekooki-Machida, Tanaka, M., and Miura, M.: Aging causes distinct characteristics of polyglutamine amyloids in vivo. *Genes to Cells* in press