

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. 研究実施体制

(1)「三浦」グループ(研究機関別)

① 研究代表者:三浦 正幸 (東京大学薬学系研究科、教授)

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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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

創傷・非創傷刺激後 4 8 時間で *dapaf-1* 変異体体液に存在する蛋白質比較分析の結果、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。前年度に進めた PGRP ファミリー分子に加え、分泌性のプロテアーゼに注目した。このプロテアーゼはほ乳類との保存性が高く、創傷刺激後 6 時間で速やかに mRNA の上昇が認められた。予備的な実験によって、このプロテアーゼを *dapaf-1* 変異体においてノックダウンすると創傷による致死性が減弱した。よってこのプロテアーゼは創傷 *dapaf-1* 変異体体液に含まれる致死性因子の候補となりうると考えられる。

2. 傷害ストレスによる体液変化のメタボローム解析

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が、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アミノ酸代謝産物に注目して解析を進めた。これまでに UPLC/MS/MS を用いた代謝産物の高感度検出系を確立し、様々なストレス状態での代謝産物動態を解析することが可能

になった。代謝経路を遺伝学的に操作してストレス応答への感受性を検討した結果、酸化ストレスに対する応答性の変化が見られた。

3. ストレスシグナルの生体での動態解析

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、創傷刺激を与えて継時的にカスパーゼの活性化を生体レベルで観測する系の構築を行った。その結果、表皮創傷後30分で中腸特異的にカスパーゼ活性化が認められた。創傷部位とカスパーゼ活性化部位が異なるため、何が腸でのカスパーゼ活性化を伝えているのか、また、腸で見られるカスパーゼ活性化の生理機能に関して遺伝学的に解析を行っている。

細胞競合は異なった代謝状態にある2つの細胞集団が接したときに見られる現象で、発生時や組織リモデリング、がん病態で重要な役割を果たすと考えられる。ショウジョウバエを用いた上皮リモデリングのカスパーゼ活性化イメージングによって、組織の入れ替えがおこる境界で、細胞周期とカスパーゼ活性化との協調がおこっていることを明らかにした3)。

4. 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行った。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表現型の確認、及び新たなノックダウン系統、過剰発現系統を作製して重要な遺伝子の特定を行っている。そして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経路との関連を検討している。

TNFは組織傷害や感染時の炎症に重要なサイトカインである。ショウジョウバエゲノムには1つのTNF(*eiger*)とその受容体(*wengen*)があることを我々は明らかにしてきたが、ショウジョウバエのTNFシグナル経路の全貌は明らかにされていない。そこで、*eiger*過剰発現による複眼縮小表現型を指標にした染色体欠失系統のゲノムワイドな優性モディファイアースクリーニングを行った。その結果、多くのエネルギー代謝経路の遺伝子がTNFシグナルに関わることが明らかになった2)。

5. マウスでのカスパーゼ活性化検出系構築とストレス応答経路の解析

SCAT3を発現するマウスの作出に成功し、神経発生の初期過程である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を明らかにした1)。その結果、カスパーゼ活性化細胞には2つのタイプが存在すること、カスパーゼ活性化は神経管閉鎖の進行に重要な役割を持つことが明らかになった。神経管閉鎖は特にカスパーゼの活性化が大量に見られる発生現象であり、発生時の内因性ストレスが多くかかっている場

所と考えられる。カスパーゼ活性はショウジョウバエ正常発生時にも一部の組織で大量に観察される。SCAT3 を用いた生体イメージングと遺伝学を用いた解析によって、雄性生殖器形成時の組織回転運動の加速に上皮のカスパーゼ活性化が必要なことを明らかにした 4)。マウス、ショウジョウバエ発生時の生体イメージング研究によって、組織形成のダイナミックな運動に、種を超えてカスパーゼ活性化が必要とされることが明らかになった。

6. カスパーゼ活性化不全マウスの表現型解析

細胞死実行カスパーゼは3種類存在する。よって細胞死実行カスパーゼの機能を包括的に解析するために、コンディショナルに広汎なカスパーゼ阻害蛋白質 p35 を発現するマウスの作製を行った (CAG-loxP-p35 venus)。中枢神経の神経幹細胞で Cre を発現するマウス (nestin-Cre) との交配によって脳全体に p35 が発現することを確認した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., and Miura, M.: Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J. Cell Biol.* 195, 1047-1060, 2011, doi: 10.1083/jcb.201104057 (JCB, Natureで紹介、Faculty of 1000 Biologyに選抜)

2. Kanda, H., Igaki, T., Okano, H., and Miura, M.: Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced non-apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18977-18982, 2011 doi: 10.1073/pnas.1103242108 (Faculty of 1000 Biologyに選抜)

3. Nakajima, Y-I, Kuranaga, E., Sugimura, K., Miyawaki, A., and Miura, M.: Non-autonomous apoptosis is triggered by local cell cycle progression during epithelial replacement in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol.*, 31 2499-2512, 2011 doi: 10.1128/MCB.01046-10 (Cover article)

4. Kuranaga, E., Matsunuma, T., Kanuka, H., Takemoto, K., Koto, A., Kimura, K and Miura, M.: Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. *Development* 138, 1493-1499, 2011 doi: 10.1242/dev.058958 (Development のResearch Highlightで紹介)

(3-4) 知財出願

① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)