

論文の内容の要旨

論文題目

IAP タンパク質の時空間的な代謝は カスパーゼの非細胞死機能を制御する

氏名

古藤 日子

【序】

システインプロテアーゼである caspase は線虫からは乳類まで高く保存されており、細胞死の実行に寄与している。また、近年の研究から caspase は細胞死実行のみならず、細胞増殖や細胞移動、細胞骨格の制御などにも関与することが報告されており、その役割は多岐に渡り重要であると考えられる。しかしながら、caspase の細胞死における役割と、その他の非細胞死機能が生体内においてどのようにして調節され、両立するのかについては未だ明らかではない。本研究では、caspase 阻害因子である DIAP1 (*Drosophila* Inhibitor of Apoptosis Protein 1) に着目し、生体内における caspase 活性の制御機構、またそのアウトプットとしてどのような生理機能を発揮するのかを明らかにすることを試みた。DIAP1 はユビキチンリガーゼ (E3) としての活性を持ち caspase に結合、分解することで caspase の活性化を阻害する。DIAP1 の機能欠失変異体において過剰な細胞死が誘導され、胚性致死の表現型を示すことから、DIAP1 はショウジョウバエ細胞において caspase の活性化制御機構の中心的な役割を果たしていると考えられる。そこで、DIAP1 のタンパク質動態を検出する蛍光プローブを作成し、ショウジョウバエ中胸背毛の発生における細胞死シグナルの動態を詳細に解析した。その結果、私は DIAP1 タンパク質レベルが発生段階依存的に厳密に制御されることが、caspase の細胞死、非細胞死機能のスイッチングに必須であることを明らかにした。

【方法と結果】

1. DIAP1 タンパク質動態可視化プローブ PRAP を用いた、ショウジョウバエ外感覚器の発生過程における DIAP1 タンパク質の動態解析

私は本学修士課程において、DIAP1 動態可視化プローブ PRAP (*Pre-Apoptosis signal detecting probe based on DIAP1 degradation*) の作成を試み、内在性シグナルを乱すこと

なく、DIAP1 タンパク質の動態を高感度に反映するプローブとして完成させた。次に、ショウジョウバエの生きた個体において、PRAP を用いた DIAP1 タンパク質の動態解析を試みた。ショウジョウバエ外感覚器中胸

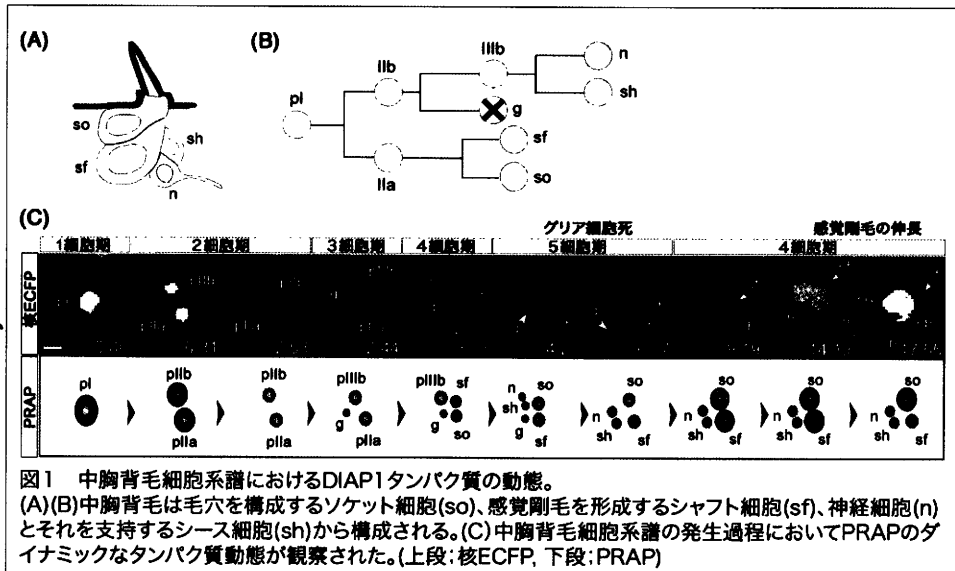


図1 中胸背毛細胞系譜におけるDIAP1タンパク質の動態。(A)(B)中胸背毛は毛穴を構成するソケット細胞(so)、感覚剛毛を形成するシャフト細胞(sf)、神経細胞(n)とそれを支持するシース細胞(sh)から構成される。(C)中胸背毛細胞系譜の発生過程においてPRAPのダイナミックなタンパク質動態が観察された。(上段:核ECFP, 下段:PRAP)

背毛 (図1A) は細胞前縁細胞 (pI 細胞) が非対称分裂することで発生することが知られている (図1B)。pI 細胞の非対称分裂過程における PRAP の動態をライブイメージングにより観察した結果、発生段階依存的に PRAP の発現パターンがダイナミックに変化していく様子が明らかとなった (図1C)。細胞分裂後、毛穴を構成するソケット細胞、及び剛毛を形成するシャフト細胞において PRAP は特異的に蓄積し、その他の細胞において PRAP の蓄積は観察されなかった。また、シャフト細胞においては後に感覚剛毛が伸長する際、急激に PRAP のシグナルが低下していく様子が観察された。さらに、抗 DIAP1 抗体を用いた免疫染色を行った結果、内在性 DIAP1 タンパク質は PRAP と同様に細胞分裂終了後、ソケット細胞、シャフト細胞で高く蓄積していることが観察されたことから、PRAP の動態は内在性 DIAP1 タンパク質の分解を反映していることが示唆された。

2. DIAP1 タンパク質レベルは細胞種、及び発生段階依存的に制御される

外感覚器を構成するそれぞれの細胞種において、PRAP は異なる安定化・分解パターンを示したことから、DIAP1 のタンパク質レベルが細胞種依存的に決定されている可能性について検討した。Numb はこの細胞系譜

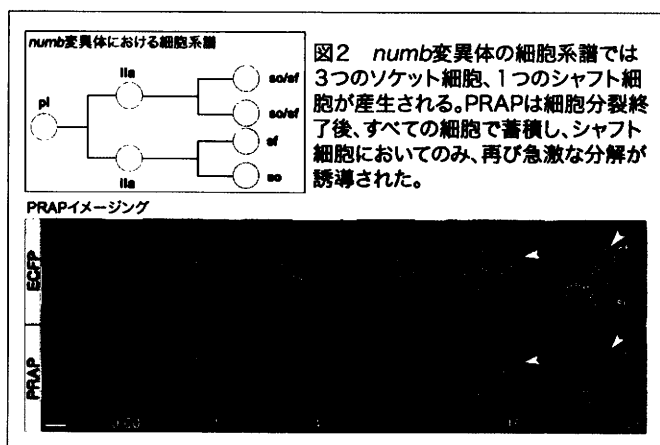


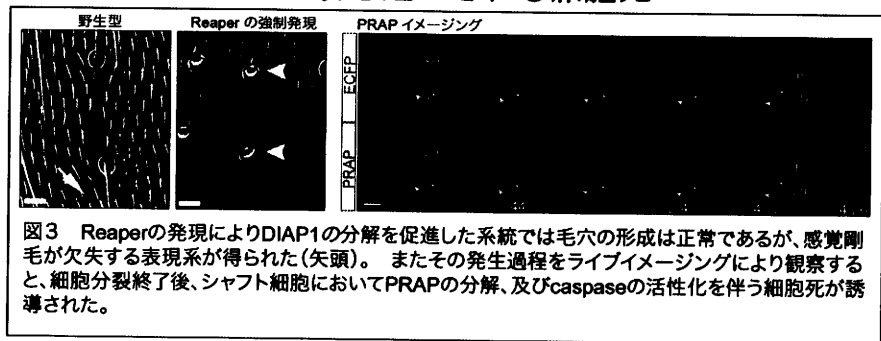
図2 numb変異体の細胞系譜では3つのソケット細胞、1つのシャフト細胞が産生される。PRAPは細胞分裂終了後、すべての細胞で蓄積し、シャフト細胞においてのみ、再び急激な分解が誘導された。

において非対称に局在し、Notch の活性化を阻害することで細胞の運命決定に寄与す

る。*numb* 変異体の細胞系譜は3つのソケット細胞、1つのシャフト細胞から構成される(図2)。PRAPは*numb* 変異体において細胞分裂終了後、すべての細胞で蓄積し、またシャフト細胞ではその後、急激なPRAPの分解が観察された(図2)。この結果はそれぞれの細胞種ごとに、DIAP1のタンパク質レベルを制御する機構が備わっていることを示唆している。

3. DIAP1 タンパク質の分解促進によって引き起こされる細胞死

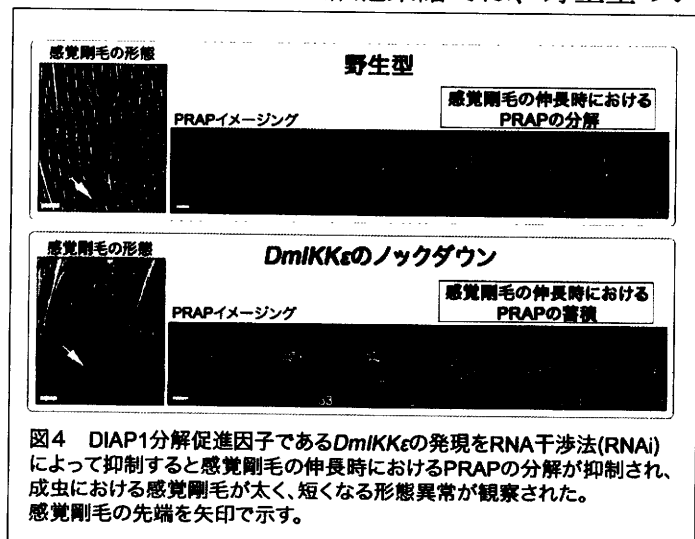
次に、PRAPの観察から得られたDIAP1タンパク質の動態はどのような生理的意味をもつのか、を明らかにするため、外感覚器細胞系譜にお



けるDIAP1のタンパク質レベルを遺伝学的手法により操作した細胞系譜の発生過程を詳細に解析した。細胞死誘導因子Reaperを強制発現させると、pI細胞の細胞分裂は正常に進行した。しかしながら、分裂終了後、ソケット細胞、シャフト細胞においてPRAPの蓄積は起こらず、まもなくシャフト細胞のみがcaspaseの活性化、核の断片化を伴って細胞死によって脱落することが明らかとなった(図3)。また、成虫の外感覚器において感覚剛毛のみを欠失する表現型が得られた(図3)。これらの観察は細胞分裂終了後のシャフト細胞において、DIAP1はcaspaseの活性化を抑制しており、細胞の生存維持に必須であることを示唆している。

4. DIAP1の分解抑制によって引き起こされる外感覚器の形態形成異常

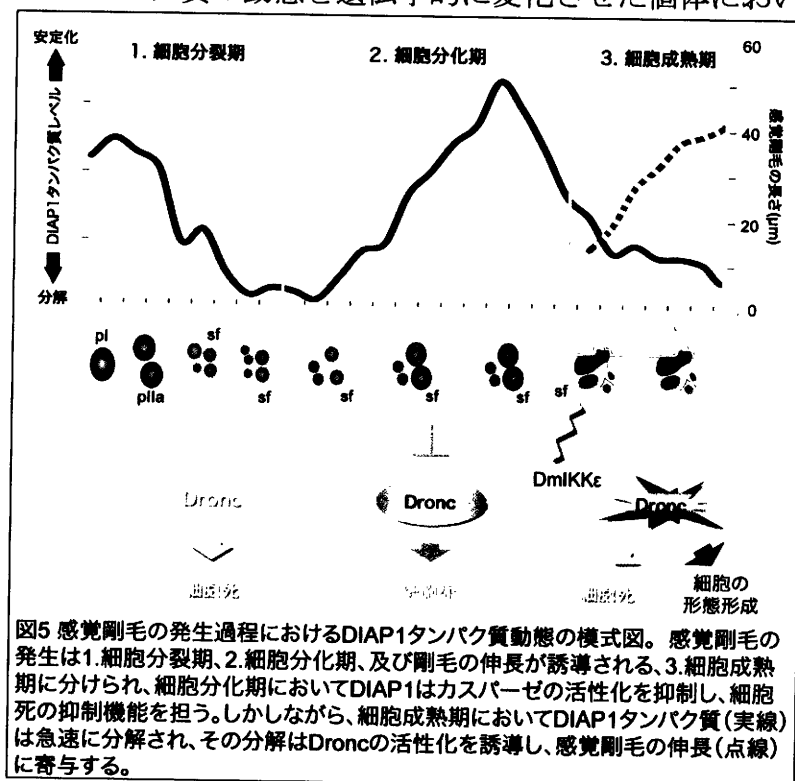
DIAP1分解促進因子である*DmIKKε*のノックダウンをした細胞系譜では、野生型のシャフト細胞で観察されていた感覚剛毛の伸長に伴うPRAPの分解が抑制され、感覚剛毛の伸長中にもPRAPのシグナルが高く維持されていた(図4)。また、成虫の外感覚器の形態を観察すると、野生型に比べて*DmIKKε*のノックダウン細胞系譜では感覚剛毛が著しく短く、太くなり、細胞の形態異常が観察された(図4)。この表現型はショウジョウバエにおけるcaspase-9ホモログであるDronc



のドミナントネガティブ型を共発現することによりさらに顕著に現れ、さらに抗活性化型Dronc抗体によりシャフト細胞の細胞質領域に強いDroncの活性化が検出された。一方、caspase-3ホモログであるdrICE/DCP-1の活性を抑制するp35を発現させた場合、*DmIKKε*のノックダウンによる感覚剛毛の表現型において遺伝学的相関が認められなかった。以上の結果は、シャフト細胞において感覚剛毛が伸長する際、DIAP1は*DmIKKε*によって急激な分解誘導を受け、その結果、Droncが活性化し、細胞の形態形成過程において非細胞死機能を発揮することを示唆している(図5)。

【まとめと考察】

本研究では、caspase阻害因子であるDIAP1のタンパク質動態に着目し、caspaseの活性化調節機構、及び生理機能を、生きた個体において時空間的に解明することを試みた。その結果、中胸背毛の発生過程においてDIAP1のタンパク質レベルは細胞種、及びその分化段階依存的に安定化、または分解促進されることが明らかとなった。さらに野生型で観察されたDIAP1タンパク質の動態を遺伝学的に変化させた個体において、異所的な細胞死の誘導、さらには中胸背毛の形態に異常が観察された。以上の結果は、中胸背毛の発生段階において、DIAP1はcaspaseの活性制御を介して細胞死の制御のみならず、細胞の形態形成に関与することを示している。本研究は、細胞の生存を維持する一方で、caspaseが非細胞死機能を発揮するために、DIAP1タンパク質レベルが細胞種、及び発生段階依存的に厳密に制御されることが必須であることを示唆している。



【文献】

Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M. (2009). Temporal regulation of *Drosophila* IAP1 determines caspase functions in sensory organ development. *J Cell Biol* 187, 219-231.