

審査の結果の要旨

氏名 古藤 日子

システインプロテアーゼであるカスパーゼは線虫からほ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、カスパーゼは細胞死の実行のみならず、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、さらに癌や神経変性、自己免疫といった多くの疾患に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てきた。しかしながら、生きた個体においてカスパーゼの活性化が時空間的にどのように調節され、これらの多機能を両立し、発揮することができるのか、については未だ明らかではない。その理由として、発生過程においては細胞死を含め、様々なイベントが時間的・空間的に厳密に制御されていると考えられているため、発生途中の個体を解剖して行う生化学的解析や、別々の個体を発生時間に沿ってそれぞれ固定し、擬似的な経時的観察を行う従来の観察方法では解明が困難とされてきたことが挙げられる。

本研究では、ショウジョウバエをモデル生物として、細胞死シグナルが「どこで」「どのタイミングで」進行し、またそのアウトプットとして「どのような生命現象に結びつくのか」を生きた個体の中において、一連の過程として生体イメージング観察することにより、カスパーゼの多機能がどのように制御されるのかを明らかにすることを試みた。ショウジョウバエにおけるカスパーゼ阻害因子であるDIAP1(*Drosophila* Inhibitor of Apoptosis Protein 1)は、ユビキチンリガーゼ(E3)としての活性を持ちカスパーゼに結合、分解することでカスパーゼ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カスパーゼ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。

そこで本研究では、第一に、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背毛は蛹期に感覚器前駆細胞（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。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。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。

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。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。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。

また、このようなダイナミックなDIAP1タンパク質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、中胸背毛細胞系譜におけるDIAP1のタンパク質レベルを遺伝学的に変化させることを試みた。細胞死誘導因子ReaperはDIAP1に結合し、その分解を促進する。Reaperの発現下においても、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。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。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。

一方、DIAP1 分解促進キナーゼである DmIKK ϵ 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。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

DmIKK ϵ 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。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、DmIKK ϵ 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 DmIKK ϵ 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。

本研究によって、カスパーゼの発揮する機能は発生段階依存的に変化し、カスパーゼの活性化は全か無かの制御ではなく、時空間的に精緻に調節されることでその細胞死・非細胞死機能を使い分け、制御されることが明らかとなった。特に、最終分化を終えた細胞において、カスパーゼシグナルは細胞の生死を決定する、という役割から解放され、様々な非細胞死機能を発揮する能力を獲得することが予測される。発生の時間軸に沿って、一つのシグナルカスケードが発揮する生理機能に変化し、多様化していく、というメカニズムは今回モデルとして用いた中胸背毛細胞系譜にとどまるものではなく、生物の発生過程において普遍的に利用されていると考えられる。本研究は、時空間的に、単一細胞レベルでシグナル動態を解析することは、その新たな生理機能を知る上でも重要な手がかりとなることを強く示唆する研究成果である。以上より、本研究は博士（薬学）の学位に値すると判定した。