

審査の結果の要旨

氏名 小幡史明

個体の恒常性を維持する上で代謝ホメオスタシスを保つ事は不可欠である。生命は複雑に織り交ぜられた代謝経路を常に健全な状態に保っており、その破綻は糖尿病やがんなどの重篤な疾患と密接に関わっている。一方でアポトーシスは、発生過程での形態形成はもちろん、各組織における細胞数の制御や傷害を受けた細胞の除去により積極的に個体の恒常性維持に関わっており、そのシグナル経路は厳密かつ多重に制御されている。近年、アポトーシスシグナルと細胞内代謝の間には、タンパク質の翻訳後修飾を介した重要なクロストークがあることが報告されている。例えば、caspase-2 は、細胞内 NADPH や ATP レベルの変化に应答してリン酸化され、活性化を阻害され、また Bcl-x1 はアセチル CoA レベルを低下させてカスパーゼや Bax のアセチル化を制御することが報告されている。細胞の生死を司るアポトーシス経路が、細胞の活動である代謝調節系と密接にリンクしていることは想像に難くないが、その複雑さと解析の困難さから、分子レベルのメカニズムに迫る研究が進んでいないのが現状である。

ショウジョウバエのアポトーシス経路はほ乳類との間で保存されており、ほ乳類 Apaf-1 のオーソログである *dapaf-1/dark/Hac-1* が apoptosome と呼ばれるタンパク質複合体を形成することでイニシエーターカスパーゼである *dronc* を活性化し、*dronc* が *drice*、*dcp-1* などの細胞死実行カスパーゼを活性化することでアポトーシスが誘導される。これまでの研究において *dapaf-1* は発生過程およびストレス誘導性のいずれのアポトーシスにも不可欠であることが明らかになっており、その変異体ではカスパーゼ活性化およびアポトーシスが減弱していることが報告されている。本研究はアポトーシス経路の不全によってどのような代謝異常が生じるかを個体レベルで解析することにより、アポトーシス経路と個体代謝応答を結ぶ分子メカニズムの解明を目的としておこなわれた。

ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 *dapaf-1/dark* はアポトーシスに必須の因子であり、*dapaf-1^{kl}* 変異体では生体内のカスパーゼ活性が低下し、アポトーシス細胞が著しく減少している。慶応大学曾我朋義教授との共同研究により、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-MS)を用いて体液中に含まれる代謝産物のメタボローム解析をおこなった。その結果、変異体におけるサルコシンレベルが野生型の 4 倍であることが明らかとなった。この結果は、超高速液体クロマトグラフィー-タンデム四重極質量分析計(UPLC-MS/MS)による、体内サルコシン量の定量によって確認された。また別の機能欠損変異体である *dapaf-1^{cd4}* やいくつかのトランスヘテロ変異体においても同様の表現型がみられたことから、サルコシンの過剰な上昇は *dapaf-1* 遺伝子の機能欠損により生じることが確認された。

哺乳類においてサルコシンは、グリシン N メチルトランスフェラーゼ(GNMT)によって、グリシンから合成され、サルコシンデヒドロゲナーゼ(SARDH)によってグリシンへと分解される。これらの代謝酵素は肝臓において強く発現しており、ショウジョウバエにおいては GNMT と SARDH のそれぞれのオーソログが、主に肝臓に相当する器官である脂肪体に発現している。*dapaf-1* 変異体におけるサルコシン代謝変動を明らかにするため、定量的 RT-PCR およびウエスタンブロッティングによって *gnmt*、*sardh* の発現量を確認したところ、*gnmt* の発現が亢進していることが明らかとなった。

GNMT はほ乳類において、S-アデノシルメチオニン(SAM)を消費してグリシンからサルコシンを合成する酵素である。SAM はほとんどのメチルトランスフェラーゼが触媒するメチル化反応におけるメチル基供与体となっている極めて重要な代謝産物である。*gnmt* が過剰に発現している *dapaf-1* 変異体では、SAM 量が有意に低下していた。SAM の前駆体であるメチオニン量、またメチオニンから SAM を合成する遺伝子 *sams* の発現が野生型と *dapaf-1* 変異体で等しいことから、*gnmt* が SAM 低下の直接の原因であることが確認された。

全身(*da-gal4*)あるいは脂肪体に発現するドライバー(*r⁴-gal4*)をもちいた *gnmt*、*sardh* の遺伝子操作 (GAL4/UAS システム)から、この2つの代謝酵素が実際に脂肪体で体内サルコシン代謝を調節していることが明らかとなった。このとき *gnmt* の過剰発現で SAM 量の低下、ノックダウンで SAM 量の上昇がおこることから、*gnmt* は生体内で実際に SAM を消費してその量を制御していることが確認された。

次に *dapaf-1* 変異体にみられる代謝異常が生体にとってどのような影響を及ぼすのかを調べる目的で、*dapaf-1* 変異体を酸化ストレス、飢餓ストレス条件下におき、その感受性を検討した。ホモ接合体およびトランスヘテロ接合体のいずれにおいても *dapaf-1* 変異体では生存率の低下が見られた。そこでサルコシン、SAM 代謝が飢餓ストレス、酸化ストレス応答にあたえる影響を検討するため、*gnmt*、*sardh* の過剰発現、ノックダウン系統のストレス感受性について検討した。その結果、*gnmt* の過剰発現系統、あるいは *sardh* の RNAi 系統では酸化ストレスに対する有意な感受性の増加が観察され、体内サルコシン量に依存して酸化ストレスに対する感受性が変化することが示唆された。一方、飢餓ストレスにたいしての感受性の変化は認められなかった。

dapaf-1 変異体の飢餓ストレス脆弱性の原因を明らかにするため、ショウジョウバエインシュリン/IGF シグナル伝達経路(IIS)に着目した。*dapaf-1* 変異体幼虫の脂肪体組織を抗 dFoxO 抗体で染色してその局在を見てみると、野生型にくらべて飢餓時の核移行が促進している様子が観察された。*dapaf-1* 変異体成虫においても飢餓ストレス 24 時間後の dAkt、dFoxO のリン酸化が減弱しており *Thor/4E-BP* の転写量が *dapaf-1* 変異体のみで顕著に上昇していることから、*dapaf-1* 変異体では dFoxO が過剰に活性化されていることが明らかとなった。また、dFoxO の活性化にともなって、トリアシルグリセロール(TAG)を急激に消費していた。このことから、*dapaf-1* 変異体では飢餓ストレス時のエネルギー消費が亢進しており、それによって貯蔵している TAG を短時間に使い切っていることが明らかとなった。

近年目覚ましい発達をとげるメタボローム解析は、特定の代謝産物に不偏な代謝異常の発見を可能とする強力な手法である。本研究では細胞死と密接に関連する代謝産物を同定するため、細胞死に必要なカスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* の変異体にみられる全身性代謝異常に着目し、メタボローム解析をおこなった。その結果、*dapaf-1* 変異体の体内にはサルコシンが過剰に産生されていることが明らかになった。高サルコシン表現型は *gnmt* の発現亢進に起因していた。*gnmt* は脂肪体に多く発現がみられ、SAM を消費してその量を制御しているため、*dapaf-1* 変異体では *gnmt* の発現上昇にともなって SAM 量が低下している。SAM はほぼ全ての細胞内メチル化に必須の代謝産物であるため、*dapaf-1* 変異体における SAM 量の低下は興味深い表現型である。*dapaf-1* 変異体にみられた酸化ストレス脆弱性は *gnmt* の過剰発現系統でもみられ、サルコシンの上昇、SAM の低下が生体防御に寄与することが示唆された。

dapaf-1 変異体は飢餓ストレスに対しても脆弱であり、*dapaf-1* 変異体においては飢餓ストレス時に dFoxO が過剰に活性化し、体内の TAG を短時間に消費していた。*gnmt* の過剰発現では飢餓ストレス

脆弱性はみられなかったが、飢餓時にはサルコシンの上昇、SAMの低下がみられたため、サルコシン/SAM代謝とエネルギー代謝との間に何らかの関連がある可能性が示唆された。サルコシン代謝、エネルギー代謝異常はある種のがんでも観察されており、多くのがんではアポトーシス不全がみられているため、*dapaf-1* 変異体で何故このような代謝異常が生じるかは興味深い。本研究はショウジョウバエの遺伝学とCE-MSによる包括的なメタボローム解析、ハイスループットなLC-MS/MS分析を組み合わせ、個体レベルでのアポトーシス不全による代謝異常を明らかにした、先進的な研究である。以上により、本研究は博士(薬学)の学位に値すると判定した。