

発生と変性における細胞死による神経選択機構の 分子遺伝学的基盤

Molecular genetic basis of neural selection by cell death during
development and pathological conditions

三浦 正幸 (Masayuki Miura)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授



研究の概要

神経細胞選択では適切な細胞の選別と除去機構が働いており、細胞死制御が鍵を担っている。本研究は、ショウジョウバエを用いた遺伝学的な手法で神経細胞除去に関与する遺伝子群を同定し、その知見を生かし今までアプローチの難しかった発生と病態で観察される哺乳類神経系の細胞選択機構を遺伝学的に明らかにしようとするものである。

研究分野 / 科研費の分科・細目 / キーワード

総合領域 / 基盤研究 (S) / 神経細胞死、発生、変性、遺伝学、カスパーゼ、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景・動機

神経発生初期のほぼ均一な細胞集団における細胞選択機構については、特定の細胞死因子によって死細胞が選択されるメカニズムに加え、細胞間でのわずかなストレスシグナルの差が細胞に不可逆的な変化を与え、その結果選択の方向（細胞死・生存）が決定づけられる可能性が想定される。このような細胞選択機構は神経発生のみならず、神経変性においても重要な役割を果たすと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、生体における神経細胞選択の分子遺伝学的な調節機構を、神経細胞死の遺伝学的な研究から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ショウジョウバエを用いた遺伝子過剰発現系による機能獲得型のスクリーニングと、染色体欠失系統による機構欠損型スクリーニングとを行うことによって、神経細胞死・変性に関わる遺伝子を網羅的に同定した。さらに、細胞死シグナルの中心的役割を果たすカスパーゼ活性化を生体でイメージングするシステムの導入を行い、遺伝学的な解析とともに研究を進めた。

主要な備品として、FRET イメージングシステム、ビデオレート共焦点ユニット、クライオスタートを購入した。

4. 研究の主な成果

【神経変性シグナルの遺伝学的スクリーニングと新たな変性機構の解析】

ショウジョウバエ遺伝子の過剰発現スクリーニング (GS スクリーニング) を取り入れることで、神経細胞死シグナルの機能的ゲノムスクリーニングを行った。ポリグルタミンによる神経細変性に関与する遺伝子として小胞体に存在する不良品蛋白質の輸送チャネル (Sec61 α) を同定した。Sec61 α は、分泌経路で合成される蛋白質の小胞体への移行と、小胞体関連タンパク質分解 Endoplasmic Reticulum Associated Degradation: ERAD において小胞体から細胞質への不良品タンパク質の輸送を担う重要なチャネルである。Sec61 α をショウジョウバエ複眼や培養細胞で過剰発現すると不良品タンパク質が細胞質に逆輸送されて蓄積し細胞死が誘導されること、逆に Sec61 α の活性を遺伝学的に弱めることによりポリグルタミン病モデルにおいて細胞質に蓄積していた不良品タンパク質が減少し、晩発性の神経変性が回復することが明らかになった。さらに、GS スクリーニングによって、神経細胞死シグナルを発する候補遺伝子として DmIKK ϵ が得られた。

【遺伝子の機能欠損スクリーニングによる神経細胞死関連遺伝子の同定】

カスパーゼは細胞死のメディエーターと

して機能するシステインプロテアーゼであり、神経細胞死に深く関わっている。本研究では、ショウジョウバエ神経系（複眼）を用いた遺伝学的な手法によりカスパーゼ依存的な細胞死シグナルに関わる遺伝子の探索を行った。具体的にはショウジョウバエ細胞死誘導遺伝子 *reaper* を複眼で特異的発現させることによって複眼縮小を示す系統と、染色体欠損あるいは点突然変異を持つ系統とを交配させ、その F1 で複眼サイズが回復する系統を得る。このスクリーニングによって新たに得られたキナーゼ (DmIKKε) が細胞死を誘導しないレベルのカスパーゼ活性を調節することを見いだした。IKKεはほ乳類での解析から IκBαあるいは IRF-3, -7 をリン酸化することによって NF-κB 活性化、あるいは IFN 発現を制御するキナーゼとして近年注目されている分子である。細胞死シグナルに関与する遺伝子のスクリーニングから DmIKKεが得られたことをふまえてその基質を探索した結果、種を超えて保存されたカスパーゼ抑制因子 DIAP1 が同定された。DmIKKεは DIAP1 をリン酸化することによってその分解を促進する。DmIKKεを生体でノックダウンすると内在性の DIAP1 レベルが組織で上昇した。しかし、この状態でも発生過程での細胞死は正常におこり、ここでの DmIKKεによる DIAP1 レベルの調節は細胞死以外の生理機能に関与することが示唆された。

【生体におけるストレスシグナル検出プロンプの開発と新たなストレスシグナルの生理機能】

アポトーシスシグナルに関しては FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer 法を応用したカスパーゼ活性化プロンプ SCAT (Sensor for activated caspase based on FRET: SCAT) の作製によって神経発生でのカスパーゼ活性化状態の詳細な観察が可能になった。

【カスパーゼを介した神経選択機構】

SCAT を用いて初めて神経先駆細胞が選択されるプロニューラルクラスターで低レベルのカスパーゼ活性が観察された。IAP 分解制御を行う前述の DmIKKεノックダウンによってこの低レベルカスパーゼの活性化はほぼ完全に抑制されたことから、DmIKKεは細胞死刺激によらないカスパーゼ活性化調節に関わる分子であることが明らかになった。

遺伝学的な研究から外感覚器を生み出す感覚器前駆細胞の数の調節が、カスパーゼに依存した GSK3βホモログアイソフォーム Sgg46 の活性化を介した細胞死実行に関わらない機構によってなされていることを明らかにした。DmIKKεノックダウンを用いた実験で、感覚器前駆細胞数は DmIKKεが調節するカスパーゼ活性によって決定されることを明らかにした。先述の遺伝学的な研究と合わせて、今回の研究によって、1) 低レベルのカスパーゼ活性化がプロニューラルクラスターでおこっていること。2) 細胞死以外の生理機能に関わるカスパーゼ活性化調節は、IAP をリン酸化して分解促進をするキナーゼ IKKεによってなされること。3) この仕組みによって感覚器前駆細胞数が決定されること。が明らかになった。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本研究が明らかにした段階的なカスパーゼ活性化による神経選択の新たな仕組みは、発生と神経変性での細胞運命決定機構に新たな視点をもたらしたもので、世界的に注目を集めている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Kuranaga, E., Kanuka, H., Tonoki, A., Takemoto, K., Tomioka, T., Kobayashi, M., Hayashi, S., and **Miura, M.**: *Drosophila* IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell* 126, 583-596, 2006
2. Kanuka, H., Kuranaga, E., Takemoto, K., Hiratou, T., Okano, H., and **Miura, M.**: *Drosophila* caspase transduces Shaggy/GSK-3β kinase activity in neural precursor development. *EMBO J.* 24, 3793-3806, 2005
3. Kanuka, H., Hiratou, T., Igaki, T., Kanda, H., Kuranaga, E., Sawamoto, K., Aigaki, T., Okano, H., and **Miura, M.**: Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61α translocon in *Drosophila* postmitotic neurotoxicity. *BBA* 1726, 225-237, 2005
4. Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., and **Miura, M.**: Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* 160, 235-243, 2003

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~genetics/index.html>