

## ストレスシグナルの揺らぎ可視化による細胞社会構築原理の解明 Visualization of oscillation for stress signal and molecular genetic study of establishment of cell community

三浦 正幸 (MIURA MASAYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授



### 研究の概要

本研究では高感度にカスパーゼ活性化を含む細胞死シグナルを生体で検出するシステムを開発し、様々な器官発生でのストレスシグナルの揺らぎを明らかにすることによって、これまでにない新たな細胞社会形成の概念を提示する。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：発生、細胞社会、カスパーゼ、分化、ショウジョウバエ、マウス

### 1. 研究開始当初の背景

個体や細胞でカスパーゼ活性を抑制した実験から、この酵素が細胞死のみならず多くの生命現象（増殖、分化、移動、炎症、感染）に関わることが我々を含む複数の研究グループによって示されてきた。これらのことからカスパーゼは細胞が曖昧な分化をとげないように活性化の程度によってそれぞれの基質を切断することで、細胞の分化状態を監視し安定なものにすると予想される。我々はカスパーゼが分化状態の揺らぎをストレスとして感知して制御する分子として注目している。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに存在した個体レベルでの可視化技術の問題点を解決することで、個体発生における分子シグナルの揺らぎを生体内で可視化し、細胞社会からなる組織・器官形成の新たな構築原理を明らかにすることを目的とする。さらに、遺伝学を用いて提出したモデルの検証を行い、モデルに基づいた表現型から、遺伝学的手法を用いて細胞社会でのシグナル動態を調節する遺伝子群の同定を行う。

### 3. 研究の方法

我々は生体そのものを用いたバイオイメージングの重要性を考え、生体での使用に適したイメージングプローブの開発と可視化システムの構築を行ってきた。開発のポイン

トは1) シグナルの特異性が高いこと、2) SNの高い高感度プローブであること、3) 生体内での細胞内環境に影響されないこと、である。申請者らが開発したカスパーゼ活性を検出するプローブ SCAT (Sensor for activated caspases based on FRET)はこの全てを満たすものであり、FRET (fluorescent resonance energy transfer)を用いたバイオイメージングプローブの中でも特にFRET効率の変化が大きく使いやすいものである。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。しかしながら、一旦細胞死刺激が入るとDIAP1自身の分解が促進され、DIAP1分解がカスパーゼの活性化の引き金となり、細胞死が誘導されると考えられている。そこで、我々はDIAP1タンパク質の分解に着目し、そのタンパク質動態を生体イメージング解析することが可能な新規プローブ PRAP (pre-apoptosis signal detecting probe based on DIAP1 degradation)を作成した。これらのプローブを発現するトランスジェニック動物を作成し、スピニングディスクを用いたマルチポイントスキャン型、あるいはタンデムスキャナーを採用することにより、生体内においてbleachingすることなく蛍光イメージングを行うシステムを構築した。

### 4. これまでの成果

【細胞死シグナルを器官発生で1細胞レベ

ル検出する実験系の構築: ショウジョウバエ外感覚器の発生】

我々はPRAPを用いて、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イメージング解析を行った。中胸背毛は1個の前駆細胞から非対称分裂により生ずる4種の細胞群から形成される。今回、中胸背毛を形成する細胞系譜の運命決定、非対称分裂、最終分化過程において、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。生体イメージングによって明らかとなったもう一つの驚きは、細胞死抑制に必須と考えられてきたDIAP1が感覚器形成過程において消失することであり、この結果は、カスパーゼ活性化制御が多段階的に行われることを示唆している。本研究によって、外感覚器という細胞社会形成過程での細胞死シグナル動態が明らかとなった。カスパーゼ活性は全か無かの調節を受けているのではなく、一連の時間軸に沿って巧妙に調節されることで、カスパーゼの細胞死と非細胞死両方の機を巧みに発揮させていることが明らかになった。

#### 【ほ乳類神経発生における細胞死シグナル】

上記ショウジョウバエを用いた生体イメージングの研究から、細胞死シグナルダイナミクスが発生の様々な局面に関わることが見えてきた。では、ほ乳類神経系の発生過程において、細胞死シグナルはどのような機能を持っているのだろうか。これを調べる目的で、2つのアプローチによってカスパーゼ活性を検出する実験系を構築した。1)抗体を用いる方法と2)SCATを用いる方法である。

1) 神経発生の様々な局面を抗活性化カスパーゼ3抗体を用いて調べたところ、発生中の嗅覚神経軸索で強いカスパーゼ活性が検出され、この活性は直接的にはアポトーシスを誘導しないユニークなものであることが明らかになった。さらに、この領域で活性化されるカスパーゼ9のユニークな基質としてSemaphorin 7Aを見いだした。カスパーゼ活性化がおきない変異体では嗅覚神経軸索走行に異常が観察され、その際に嗅覚神経細胞数に異常は無かったため、カスパーゼ活性が非細胞死機能として軸索走行制御に関わることが判ってきた。

2) ほ乳類神経発生における細胞死シグナルの動態を生体イメージングによって解析する目的でSCAT3を発現するトランスジェニックマウスの作成を行った。

#### 5. 今後の計画

【ショウジョウバエ外感覚器の発生におけるパターン形成に関わる細胞死】

感覚器前駆細胞の誕生を中胸楯板全体の

パターン形成の中で捉え、さらに、それぞれのポジションにおける感覚器前駆細胞の発生運命を追跡できるようになった。この観察系は発生のパターン形成、細胞分化、器官形成を単一細胞レベルで追跡できる優れたものである。細胞死シグナルの遺伝学的操作とイメージングを組み合わせた精度の高い研究によって、細胞死シグナルの細胞社会形成における役割を明らかにしていく。

#### 【ほ乳類神経発生における細胞死シグナル】

ほ乳類神経発生における細胞死シグナルダイナミクスを可視化する目的で、観察に適した発生系の選択を行なっていく。ショウジョウバエを用いた実験でも重要なことであったが、見るべき細胞が胚の表面近くになく、解像度の高いイメージングを達成することは難しい。そこで、細胞死が神経発生で大量におこる神経管閉鎖に注目する。カスパーゼ活性化が見られる特定の細胞に注目しその振る舞いや周りの細胞との相互作用を単一細胞レベルで解析し、シグナルの操作を薬理的にあるいはsiRNAを用いて行うことで、細胞死シグナル活性化メカニズムとその生理作用を生体イメージングと合わせて行っていく。

#### 6. これまでの発表論文等

Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Temporal regulation of Drosophila IAP determines the dual functions of caspases in sensory organ development. *J. Cell Biol.* 187, 219-321, 2009

Ohsawa, S., Hamada, S., Asou, H., Kuida, K., Uchiyama, Y., Yoshida, H., and Miura, M.: Caspase-9 activation revealed by Semaphorin 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. *J. Neurosci.* 29, 11385-11392, 2009

Ohsawa, S., Hamada, S., Yoshida, H., and Miura, M.: Caspase-mediated changes in Histone H1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons. *Cell Death Diff.* 15, 1429-1439, 2008

Takemoto, K., Kuranaga, E., Tonoki, A., Nagai, T., Miyawaki, A., and Miura, M.: Local initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13367-13372, 2007

ホームページ等

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