

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「代謝調節機構解析に基づく細胞機能
制御基盤技術」
研究課題「個体における細胞ストレス応答代謝
産物の遺伝生化学的解明」

研究終了報告書

研究期間 平成19年10月～平成25年3月

研究代表者：三浦 正幸
(東京大学大学院薬学系研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

生体が健全な状態を維持しているその背景には、常に受ける様々なストレスに個体が巧みに応答していることがある。細胞内のストレス情報伝達機能の研究は目覚ましい進展を見せているが、個体という細胞社会の中で、細胞や組織間の相互作用に注目したストレス応答研究は未だ少なく解明されるべき課題が多い。本研究では個体におけるストレス応答を、代謝という観点から遺伝生化学的に全身性及び、細胞レベルの応答を明らかにすることを目標に実施した。

細胞がストレスを受けた場合、その強さ、あるいは細胞のおかれた状態によって異なる応答が想定される。野生型では細胞が強いストレスを受けた場合、カスパーゼの活性化→アポトーシス→組織修復あるいは再生、といった生体反応が考えられる。この際、アポトーシス細胞から放出され周りの細胞の代償性増殖を促進する因子の存在が明らかになってきた。一方でカスパーゼの活性化が抑制された状態では細胞死不全、あるいはネクローシスが生じることによって二次的な変化が引き起こされる。本研究では、カスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* の機能欠損変異体 (*dpf-1*) が、創傷刺激に対して脆弱であるとの知見から、その分子メカニズムの解明に向けた研究から開始した。

創傷後の生体応答としてカスパーゼ活性化が生存維持に必須である。そこでカスパーゼインディケーターを発現させ、創傷刺激後のカスパーゼ活性化部位を特定したところ、創傷後 30 分で創傷部位とは離れた腸においてカスパーゼ活性化が観察された。腸で特異的にカスパーゼ活性化を抑制すると *dpf-1* の機能欠損変異体と同様に創傷刺激に対して脆弱になった。

dpf-1 の機能欠損変異体の創傷後の脆弱性には体液中の液性因子が関わるということが予想されたため、野生型及び変異体ショウジョウバエ体液サンプルを採取して、プロテオミクス解析を行った。プロテオミクス解析の結果、創傷ストレス刺激後の *dpf-1* 変異体において発現上昇する蛋白質に関して、RNAi を用いたノックダウンによる機能解析を進めている。その結果、一つの遺伝子産物が創傷後の脆弱性に関わることが見いだされている。

メタボローム解析では、野生型と *dpf-1* 変異体で顕著に異なる代謝産物としてサルコシンが同定された。*dpf-1* 変異体は創傷のみならず飢我ストレス、酸化ストレスに対しても脆弱であり、その際にサルコシンの顕著な上昇が観察された。サルコシン合成酵素 (sarcosine dehydrogenase)、分解酵素 (glycine N-methyltransferase) がショウジョウバエにはゲノムにそれぞれ1つずつ遺伝がある。これら遺伝子の過剰発現系統、ノックダウン系統を得てサルコシンの代謝が制御出来るようになった。また、サルコシン代謝と密接な関わりのあるメチオニンサイクルの変調も *dpf-1* 変異体で観察されている。これら代謝経路のストレス応答への関わりの解析を進めている。

ショウジョウバエ、マウスでのストレスシグナル動態解析系を構築し、生体での細胞死の役割に関して多くの知見を得た。マウスでは神経発生において顕著な細胞死がおこる神経管閉鎖期においてカスパーゼ活性化の役割が明らかになった。神経管閉鎖の危険因子として葉酸の不足がいわれているが、この経路はメチオニン代謝とともに、1カーボン代謝経路を構成しており、ストレス応答の観点で詳しい解析を進めている。

嗅覚神経系ではカスパーゼ依存的な軸索伸長・成熟機構があることが明らかになり、神経回路網の形成機構のみならず脳の恒常性の維持やその破綻によって引き起こされる疾患メカニズムの理解へとつながることが期待される。

ショウジョウバエにおいては、外感覚器形成過程の全てを1細胞レベルの解像度で追跡する系を確立した。そして細胞死シグナルの動態を新たに開発したカスパーゼ制御因子 IAP を可視化するプローブ PRAP によって詳細に観察した。外感覚器形成過程では分化に失敗した細胞が

現し、その細胞を特異的に取り除くことによって発生で生じる分化エラーを除去していることが明らかになった。

細胞社会の中では細胞同士の競合的なふるまいが観察され、このふるまいは組織再編やがん原性細胞の監視に重要である。組織再編では再編部位での局所のカスパーゼ活性化と細胞増殖とが互いに相互作用し、細胞の入れ替わりを制御することが明らかになった。細胞競合は新生がん原性細胞の組織からの排除に関わるが、遺伝学的なスクリーニングによって、エネルギー代謝に関わる遺伝子が、このプロセスに関わることを明らかにした。

老化過程では様々なストレス関連遺伝子が上昇し、神経変性のリスクが高まる。24ヶ月齢マウスの脳では、caspase-9が活性化するが、この活性化はcaspase-3の活性化を伴わず、細胞死の誘導をしているのではないことが明らかになった。老化脳ではイニシエーターカスパーゼの活性化はあるものの、アポトーシスが抑制された状態にあり、このアポトーシス機能の低下が慢性的な生体ストレス応答の増大につながる可能性が考えられる。

ショウジョウバエを用いた遺伝子過剰発現スクリーニングによって 19S プロテアソームの構成因子 Rpn11 が神経変性を抑制することを見いだした。Rpn11 の発現が老化によるプロテアソーム活性低下を抑制し、神経変性の進行を遅らせる事を明らかにした。

(2) 顕著な成果

1. 創傷による全身性応答の解明

概要:組織傷害が全身性の反応を惹起し、その結果としてカスパーゼ活性化が創傷部位とは異なる組織でおこることが明らかになった。このカスパーゼ活性化は組織再生を介して致死性からの回避に関わることが明らかになった。

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Misaki, K., Yonemura, S., Kanuka, H., and Miura, M.: Homeostatic epithelial renewal in the gut is required to dampen a fatal systemic wound response in *Drosophila*. Cell Reports in press

2. カスパーゼ活性化不全によるメチオニン経路の変調

概要:メタボローム解析によって、カスパーゼ活性化不全個体ではメチオニン経路の変調をきたすこと、そしてこの経路が生体ストレスへの感受性に関わることが示された。

3. エネルギー代謝経路の細胞競合への関わり

概要:細胞社会の中では細胞同士の競合的なふるまいが観察され、このふるまいは組織再編やがん原性細胞の監視に重要である。遺伝学的なスクリーニングによって、エネルギー代謝に関わる遺伝子が、新生がん原性細胞の排除に関わることが明らかになった。

Kanda, H., Igaki, T., Okano, H., and Miura, M.: Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced non-apoptotic cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 18977-18982, 2011 (Faculty of 1000 Biologyに選抜)

4. カスパーゼ活性化を指標としたストレスシグナルの検出

概要:ストレス応答を生体レベルで明らかにするために、カスパーゼの活性化を指標とした生体イメージングの実験系を構築した。その結果、細胞死の生体での動態観察にもとづく、新たな機能が提示できた。また、カスパーゼが非アポトーシス機能として、シナプスの成熟に関わること

が明らかになった。

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., and Miura, M.: Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J. Cell Biol.* 195, 1047–1060, 2011
(JCB 誌, Nature 誌 の Research Highlights で紹介、Faculty of 1000 Biology に選抜)

Nakajima, Y-I, Kuranaga, E., Sugimura, K., Miyawaki, A., and Miura, M.: Non-autonomous apoptosis is triggered by local cell cycle progression during epithelial replacement in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol.*, 31, 2499–2512, 2011 (Cover article、 Faculty of 1000 Biology に選抜)

Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs. *Current Biol.* 21, 278–287, 2011
(Cell 誌 Leading Edge で紹介)

Ohsawa, S., Hamada, S., Kuida, K., Yoshida, H., Igaki, T., and Miura, M.: Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 13366–13371, 2010

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
(JCB 誌 Research Highlights で紹介)

5. 老化における神経変性シグナル

概要: 24 ヶ月齢マウスの脳では、caspase-9 が活性化するが、この活性化は caspase-3 の活性化を伴わず、細胞死誘導をしているのではないことが明らかになった。アポトーシス実行能の低下と慢性的な脳機能低下との関わりに興味を持たれる。

ショウジョウバエを用いた遺伝子過剰発現スクリーニングによって 19S プロテアソームの構成因子 Rpn11 が神経変性を抑制することを見いだした。Rpn11 の発現が老化による 26S プロテアソームの減少を抑制し、神経変性の進行を遅らせることを明らかにした。

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

Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M.: Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with aging process. *Mol. Cell Biol.* 29, 1095–1106, 2009 (Cover article)

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

細胞死の実行に重要なカスパーゼは様々なストレスに応じて活性化するが、その活性化の程度や様式によって生体に多様な反応を引き起こすことが明らかになってきた。本研究ではストレスを受けた生体の恒常性維持機構を考える上でカスパーゼの活性化に起因する生体反応の理解は、生体の恒常性維持機構や老化、様々な疾患の仕組みを明らかにする上で重要であると考え研究計画を立案した。ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 *dpf-1* の機能欠損変異体が、創傷刺激に対して脆弱であるとの実験結果を受け、その分子機構の解明を起点として、ショウジョウバエとマウスを用い、ストレス応答に関わるカスパーゼ活性化を中心にその生体機能を個体レベルで明らかにする研究であり、以下の2点について解析を行う。

- 1) 遺伝学、生化学を取り入れた研究によって、全身性あるいは細胞間に作用するストレス応答とその制御因子を明らかにする
- 2) 生体でのストレスシグナルイメージングから、ストレス応答の制御と生体機能を明らかにし、その分子機構を遺伝学的に明らかにする。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

中間評価では以下のご助言をいただいた。

1. ショウジョウバエで見出した知見を基盤として、今後はマウスの研究に展開することにより進化的に保存されたストレス応答の機構が解明されることが期待できる。カスパーゼの活性化不全を示すモデル動物は、慢性炎症時の生体応答を明らかにする上でも重要であり、慢性炎症が根底にある癌、糖尿病、神経変性などの医学分野への応用も期待できる。今回同定したメタボライトが慢性炎症のマーカーになるかどうか興味ある今後の課題である。

対応: ご指摘をいただいたように、カスパーゼ活性化不全により慢性的な炎症状態が引き起こされ、様々なストレス刺激に対して高感受性を示す事が予想されるが、まさにショウジョウバエの *dpf-1* 変異体においてはそのような状況が観察されている。*dpf-1* 変異体においてメチオニン経路が変化していることが明らかになり、この経路の代謝産物が慢性炎症マーカーになりうるかを調べられるよう分析系を確立している。マウスモデルや実際の疾患において今後、データを蓄積していきたいと考えている。

2. カスパーゼは単にアポトーシスを実行するのみでなくプロテアソーム、リソソーム、カルパインのように細胞内プロテアーゼとしての多面的な役割を担っており、最近その普遍的な意義の解明が急速に進んでいる。本研究では細胞ストレス応答におけるカスパーゼの役割の解明を目指している。ストレス応答に関わるカスパーゼ活性化の分子メカニズムの解明に向けて研究は順調に進展していると判断できる。ショウジョウバエの体液の移入実験から液性因子の関与が明らかになり、プロテオーム解析とメタボローム解析により自然免疫系のタンパク質の発現上昇や特定のメタボライトの増加などが判明した。メタボローム解析が進展したことにより、本 CREST の目標にも一層沿ったものになってきている。

対応: カスパーゼによるストレス応答はこれまで予想した以上に多面的であった。発生過程は細胞間の競合がおこる高いストレスにさらされていると考えられるが、カスパーゼは神経発生での神経成熟、シナプス形成、分化に失敗した細胞の選択的な除去、そして神経館閉鎖時の形態形成運

動の速度調節に関わることが本研究で見いだされた。さらに、傷害刺激に応じて腸上皮で活性化されるカスパーゼは腸幹細胞からの組織再生に必要で、その破綻は致死性になることも明らかになった。一方で、カスパーゼ非依存的な細胞死経路が重要な現象も明らかになってきており、神経変性の晩発性発症におけるプロテアソームの関わり、細胞競合による新生がん原性細胞の除去にエネルギー代謝経路が関わることを新たに見いだした。今後は、カスパーゼ依存的、非依存的な細胞間および全身性のストレス応答現象を、本研究で見いだされたメチオニン経路やエネルギー代謝経路に注目して解明していきたい。

§ 3 研究実施体制

(1)「三浦」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
三浦正幸	東京大学薬学系研究科	教授	H19.10～H25.3
倉永英里奈	同上	講師	H19.10～H22.12
千原崇裕	同上	講師	H19.10～H22.3
山口良文	同上	助教	H19.10～H25.3
殿城亜矢子	同上	研究員	H19.10～H21.9
富岡桂	同上	技術員	H22.6～H25.3
佐々木美智子	同上	技術員	H21.4～H23.12
月岡愛実	同上	技術員	H22.4～H22.12
大澤尚子	同上	技術員	H20.5～H21.10
原口朱夏	同上	技術員	H24.4～H22.3
藤岡頼子	同上	技術員	H20.5～H24.3
古藤日子	同上	研究員	H19.10～H22.3
中嶋裕一郎	同上	研究員	H19.10～H22.3
武石明佳	同上	研究員	H19.10～H25.9
野々村恵子	同上	研究員	H19.10～H25.3
小幡史明	同上	研究員	H21.4～H22.3
関根清薫	同上	研究員	H19.10～H22.3
吉田綾子	同上	D3	H22.4～H25.3
明銘	同上	D3	H22.4～H25.3
篠塚直美	同上	D2	H23.4～H25.3

② 研究項目

・個体における細胞ストレス応答の遺伝学的・生化学的研究

§ 4 研究実施内容及び成果

(1)研究実施内容及び成果

1. 傷害ストレスにおけるカスパーゼ活性化と細胞間相互作用の解析

カスパーゼ活性化因子 *dpf-1/dark/HAC-1* の変異体 (*dpf-1* 変異体) は、初期胚発生過程で誘導されるカスパーゼ活性が全身で低下していることを報告してきたが (Kanuka *et al.*, Mol. Cell, 1999)、成虫まで発生可能であり、成虫の体重や繁殖能などについては野生型と比較して差が認められない。組織傷害に対する生体防御機構にカスパーゼが関与している可能性を検証するため、マイクロインジェクション用針で *dpf-1* 変異体の表皮に損傷を与えた。その結果、損傷後 3 日間は損傷を与えた野生型と同様の生存率を示すが、その後生存率が低下し、損傷後 15 日目における生存率は約 40% まで低下したことから、*dpf-1* 変異体が損傷に対して脆弱であることが示された (図 1)。

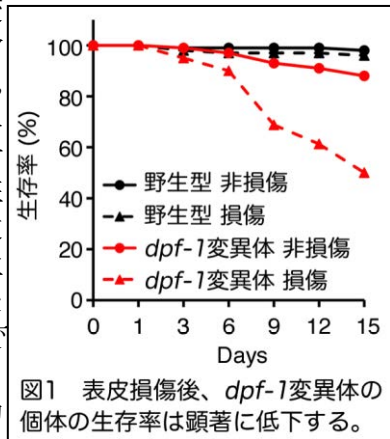


図1 表皮損傷後、*dpf-1*変異体の個体の生存率は顕著に低下する。

次に、組織特異的にカスパーゼ阻害因子 *p35* を発現するショウジョウバエを用いて損傷後の生存率を解析した。その結果、腸で *p35* を発現する個体において、*dpf-1* 変異体と同様に損傷後の生存率の低下が観察された (図 2A)。さらに、*dpf-1* 変異体の腸で *dpf-1* を強制発現させた個体において損傷後の生存率の低下が緩和されたことから、損傷後の個体の生存には腸におけるカスパーゼ活性化が必要であることが示唆された (図 2B)。

ショウジョウバエ中腸は主に腸細胞 (enterocyte: EC)、腸内分泌細胞 (enteroendocrine cell: EE)、腸芽細胞 (enteroblast: EB)、腸幹細胞 (intestinal stem cell: ISC) から構成されている。カスパーゼ活性化細胞の検出には、カスパーゼ活性化プローブ CD8::PARP::Venus、あるいは FRET による

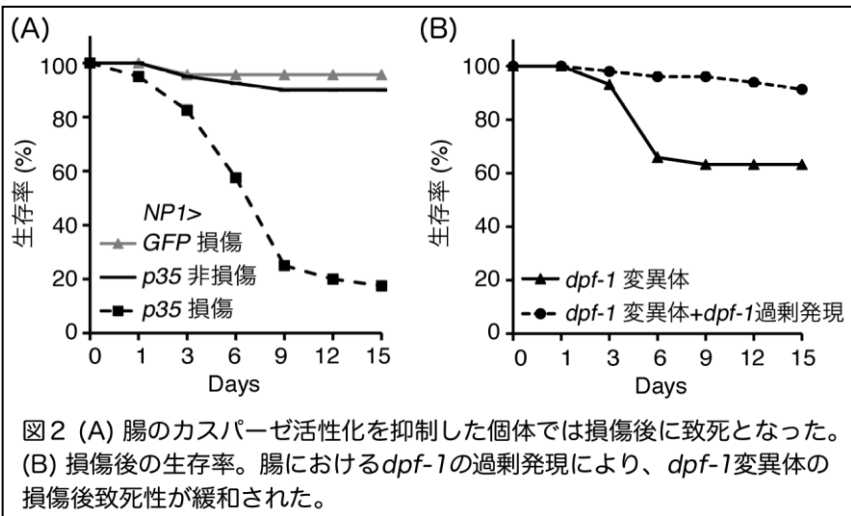


図 2 (A) 腸のカスパーゼ活性化を抑制した個体では損傷後に致死となった。(B) 損傷後の生存率。腸における *dpf-1* の過剰発現により、*dpf-1* 変異体の損傷後致死性が緩和された。

カスパーゼ活性化プローブ SCAT3 を用いた。ショウジョウバエ中腸において、各細胞のマーカールと切断型抗 PARP 抗体の免疫染色を行った結果、損傷後のカスパーゼ活性化は EE、ISC、EB ではみられず EC のみで観察された。EC における抗切断型 PARP 抗体陽性細胞は、損傷後 30 分以内に認められ、損傷後 6 時間、24 時間の中腸においても観察された (図 3A、B)。損傷後 6 時間と損傷後 24 時間に観察された抗切断型 PARP 抗体陽性 EC を比較したところ、損傷後 24 時間の中腸において腸細胞層から脱落して腸管内腔側に位置する EC の割合が増加し、核 Hoechst の染色がみられない EC の割合も増加していた (図 3C)。一方、*dpf-1* 変異体の中腸では、損傷後においても抗切断型 PARP 抗体陽性細胞はみられなかった (図 3A)。以上の結果は、局所的な表皮の損傷が全身性に中腸 EC に伝搬されてカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導することを示唆している。

損傷応答シグナルがROSを介してショウジョウバエの全身に伝達されることが報告された。そこで、局所的な表皮損傷部位から離れた組織(中腸)においてカスパーゼの活性化が認められた点について、ROSによるシグナル伝達の可能性を考慮し、抗酸化剤N-アセチル-L-システイン(NAC)をエサに混ぜて飼育したハエに損傷を与えたところ、カスパーゼ活性化細胞数の減少が認められた(図3D)。以上の結果は局所的な表皮の損傷からの生体防御シグナルがROSを介してシステム的に中腸ECに伝搬され、カスパーゼを活性化することを示唆している。

ショウジョウバエ中腸では、ほ乳類小腸と同じように恒常的に細胞が入れ替わっている。dpf-1変異体の中腸ではカスパーゼ活性化細胞が観察されないことから、腸細胞のアポトーシスが抑制され、恒常的な入れ替わりが抑制されている可能性が考えられた。そこでまず、細胞増殖について調べるためにBrdU取り込み実験を行った結果、損傷の有無にかかわらずdpf-1変異体において

は野生型と比較してISCの分裂頻度が顕著に低下していることが明らかとなった(図4A)。さらに、ECの入れ替わりを検証するため、ECにGFPを一過的に発現させ、GFP保有細胞の数の変化を観察した。GFPを一過的に発現させたコントロール個体では、6日後の中腸のEC全体における抗GFP抗体陽性ECの割合が60%まで低下したことから、ECの入れ替わりが生じていることが認めら

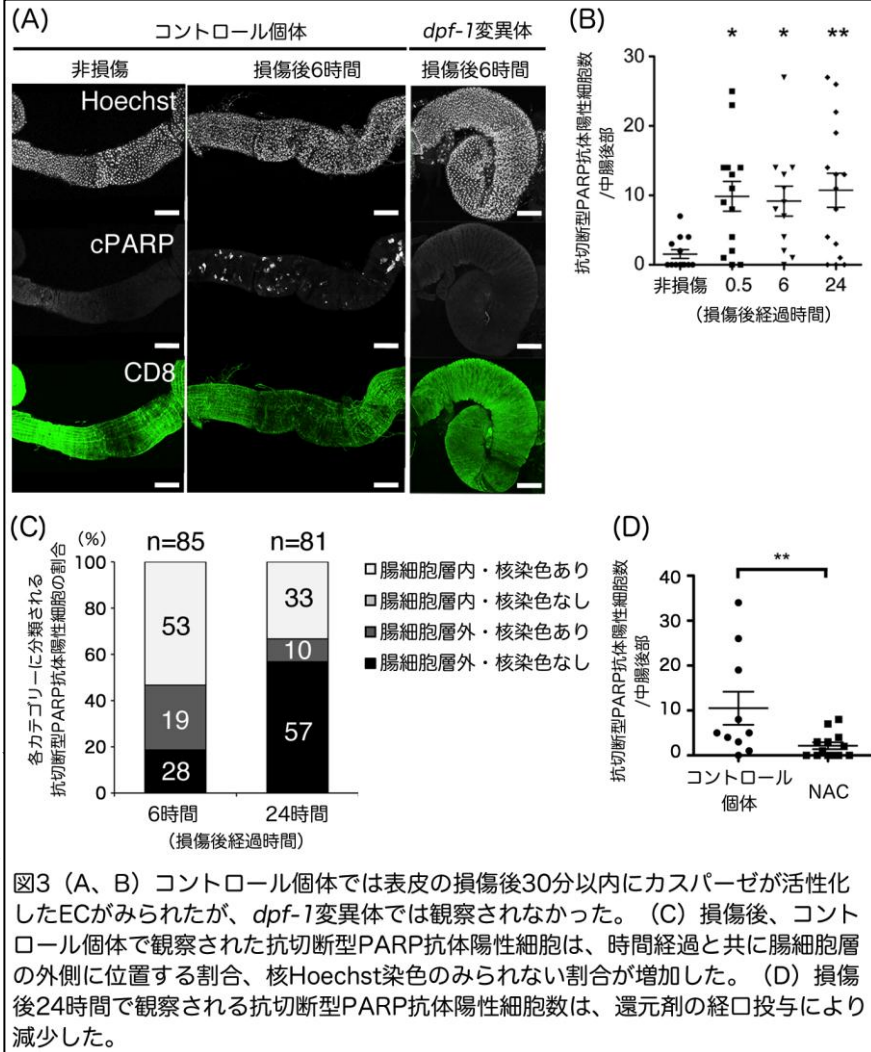


図3 (A, B) コントロール個体では表皮の損傷後30分以内にカスパーゼが活性化したECがみられたが、dpf-1変異体では観察されなかった。(C) 損傷後、コントロール個体で観察された抗切断型PARP抗体陽性細胞は、時間経過と共に腸細胞層の外側に位置する割合、核Hoechst染色のみられない割合が増加した。(D) 損傷後24時間で観察される抗切断型PARP抗体陽性細胞数は、還元剤の経口投与により減少した。

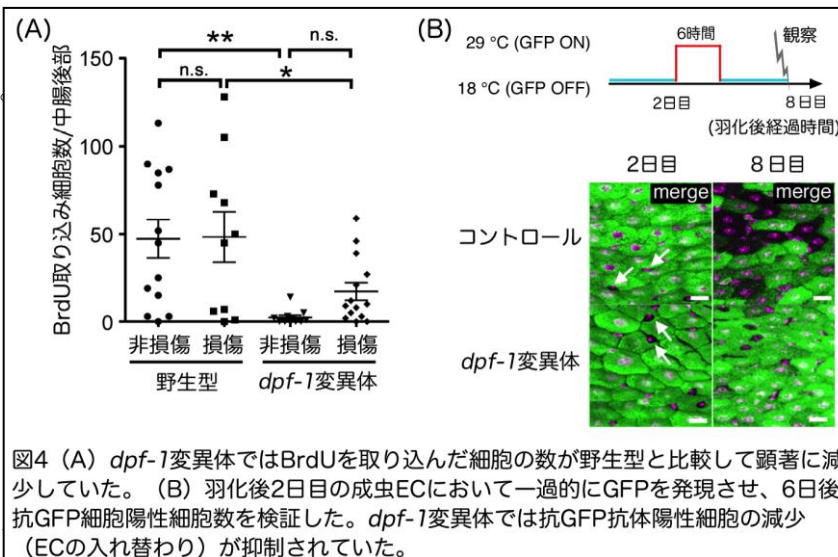


図4 (A) dpf-1変異体ではBrdUを取り込んだ細胞の数が野生型と比較して顕著に減少していた。(B) 羽化後2日目の成虫ECにおいて一過的にGFPを発現させ、6日後、抗GFP細胞陽性細胞数を検証した。dpf-1変異体では抗GFP抗体陽性細胞の減少(ECの入れ替わり)が抑制されていた。

れた(図 4B)。一方、*dpf-1* 変異体においては抗 GFP 抗体陽性 EC の割合は GFP を発現させてから 6 日後も 90% 以上を保持していたことから、中腸細胞の恒常的な入れ替わりが阻害されていることが示唆された(図 4B)。そこで、中腸細胞の恒常的な入れ替わりが損傷後の生存に影響するかどうかを検討するため、がん抑制因子 PTEN を ISC に発現するショウジョウバエを用いた(Nakajima *et al.*, MCB, 2011)。BrdU 取り込み実験の結果、PTEN の発現が中腸の ISC の増殖を抑制することを確認した。さらに、この系統に損傷刺激を加えて生存率を検証したところ、*dpf-1* 変異体や腸でカスパーゼを抑制した系統と同様に、損傷後に生存率の低下が確認された。以上の結果から、EC でカスパーゼが活性化することにより引き起こされる腸細胞の入れ替わりが、損傷後の個体の生存に必須であることが示唆された。

2. 傷害ストレスによる体液変化のプロテオーム解析

上記の結果よりシステミックな傷害ストレス応答の存在が示唆され、*dpf-1* 変異体において腹部の局所的な損傷が致死という重篤な影響を与える理由として、体液性因子による全身性の反応が原因である可能性が考えられた。体液性の因子によって *dpf-1* 変異体に致死性が誘導される機構としては、損傷後の野生型の体液中に致死を回避する保護因子が誘導されるが *dpf-1* 変異体体液中には存在しない可能性、または損傷を与えた *dpf-1* 変異体の体液中に致死を誘導する因子が誘導される可能性が考えられる。この可能性を示すために、損傷後の野生型あるいは *dpf-1* 変異体の体液を採取して、野生型や *dpf-1* 変異体の未損傷の成虫に注入することで、致死性が抑制または誘導されるかどうかの検討を行った。損傷後の *dpf-1* 変異体では生存率の低下が損傷後 3 日以降で生じることから、死に至るまでの間に *dpf-1* 変異体の体液成分が変化すると予測し、損傷後 48 時間のショウジョウバエから体液を収集して解析に用いた。

損傷後の野生型から採取した体液、または損傷後の *dpf-1* 変異体から収集した体液を野生型に注入したところ、損傷後の野生型から採取した体液の注入後に致死性はみられなかった。しかしながら、損傷後の *dpf-1* 変異体から収集した体液を注入した野生型において生存率が低下した(図 5)。これより、損傷後の *dpf-1* 変異体体液中には致死を誘導する因子が含まれる可能性が示唆された。一方、*dpf-1* 変異体においては、いずれの体液を注入した場合にも生存率が低下した。さらに、腸細胞で *p35* を発現するショウジョウバエに損傷を与え、体液を採取して野生型に注入したところ、野生型の生存率が低下した。これより、腸細胞のカスパーゼ活性化を抑制した個体では、損傷後の体液中に致死性誘導因子が存在することが示された(図 5)。

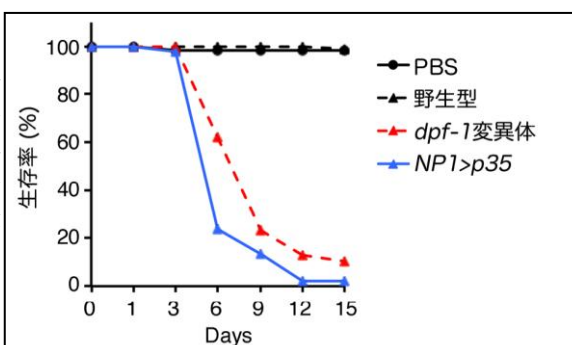


図5 損傷後の体液を採取し、野生型に注入して生存率を計測した。*dpf-1*変異体や、腸でカスパーゼ活性を抑制した個体の損傷後の体液を注入した野生型は致死となった。

損傷後の *dpf-1* 変異体の体液中に存在する致死性誘導因子を同定するため、損傷後の *dpf-1* 変異体体液を加熱して野生型に注入したところ、致死性を誘導しなかった。この結果から、致死性誘導因子は蛋白質であると予想した。そこで、首都大学東京磯辺俊明教授と共同研究を行い、*dpf-1* 変異体の損傷前と損傷後の体液に含まれる蛋白質を LC-MS/MS システムによるショットガン法により比較検討し、500 以上の蛋白質について体液中の情報を得た。2 回行ったプロテオーム解析のいずれかで、損傷前と比較して損傷後の *dpf-1* 変異体で 1.5 倍以上発現が上昇していた 22 タンパク質を致死性因子の候補とした。

候補因子の RNAi 発現による機能解析をすすめているが、現在、特に分泌性のシステインプロテアーゼに注目した解析を行っている。*dpf-1* 変異体の損傷後の致死性にシステインプロテアーゼが関与しているかを検証するため、*dpf-1* 変異体バックグラウンドのショウジョウバエでシステインプロテアーゼのノックダウンを行った。全身でシステインプロテアーゼをノックダウンしたショウジョウバエに損傷を与え、生存率を調べたところ、*dpf-1* 変異体の損傷後の致死性が緩和された。これより、損傷後の *dpf-1* 変異体の生存率の低下には、システインプロテアーゼが関与している可能性が示唆

された。

ショウジョウバエ遺伝子発現データベースにおいて、システインプロテアーゼは脂肪体において高発現することが報告されている。そこで、脂肪体におけるシステインプロテアーゼの発現が *dpf-1* 変異体の損傷後の致死性に関与するかを検証するため、*dpf-1* 変異体バックグラウンドで、脂肪体と腸でシステインプロテアーゼをノックダウンしたショウジョウバエにおいて損傷実験を行った。その結果、*dpf-1* 変異体の生存率の低下が緩和されたことから、損傷後の脂肪体または腸におけるシステインプロテアーゼの発現が *dpf-1* 変異体の生存率の低下に関与していることが示唆された(図6)。

以上をまとめると、表皮に損傷を受けたショウジョウバエ個体の生存には、カスパーゼの活性化を介した中腸細胞の入れ替わりが必要であることを明らかにした。中腸細胞におけるカスパーゼ活性化を抑制した個体では、表皮の損傷後に生体の恒常性を維持することができず体液中に致死性誘導因子が産生されることが示された。さらに、カスパーゼ活性化変異体の体液におけるプロテオーム解析により、システインプロテアーゼが致死性因子の産生に関与していることを示した(図7)(Takeishi et al., Cell Reports, 2013)。

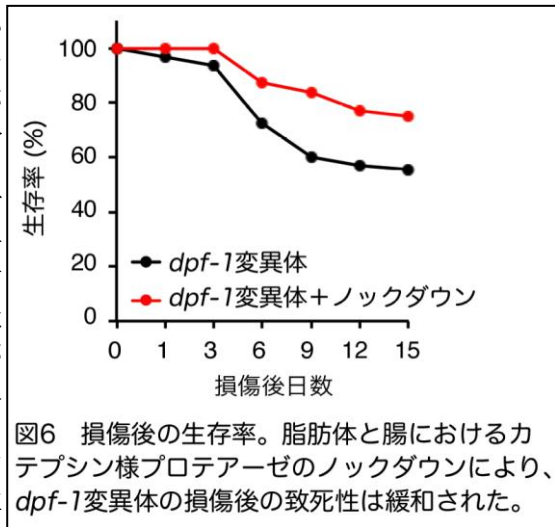


図6 損傷後の生存率。脂肪体と腸におけるカテプシン様プロテアーゼのノックダウンにより、*dpf-1*変異体の損傷後の致死性は緩和された。

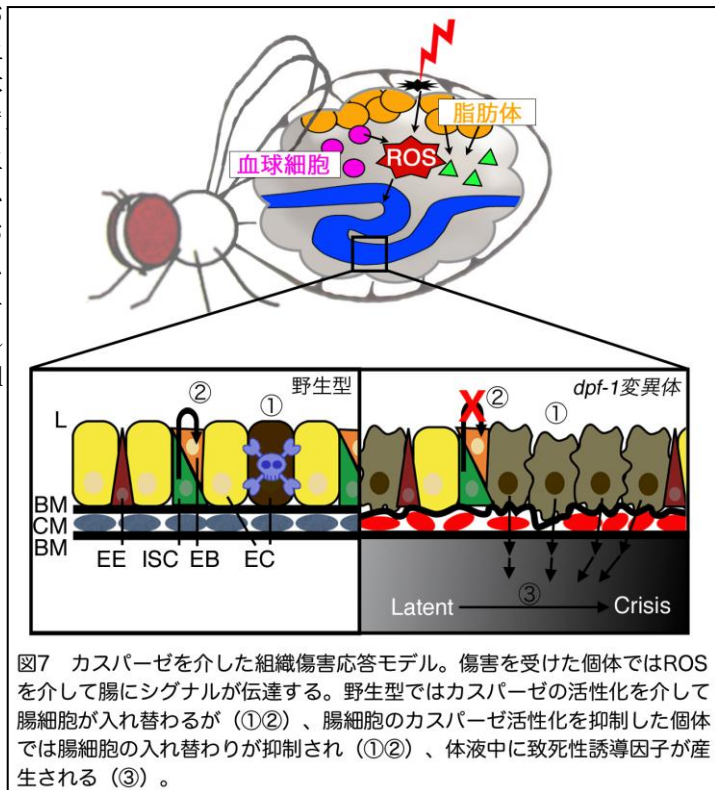


図7 カスパーゼを介した組織傷害応答モデル。傷害を受けた個体ではROSを介して腸にシグナルが伝達する。野生型ではカスパーゼの活性化を介して腸細胞が入れ替わるが(①②)、腸細胞のカスパーゼ活性化を抑制した個体では腸細胞の入れ替わりが抑制され(①②)、体液中に致死性誘導因子が産生される(③)。

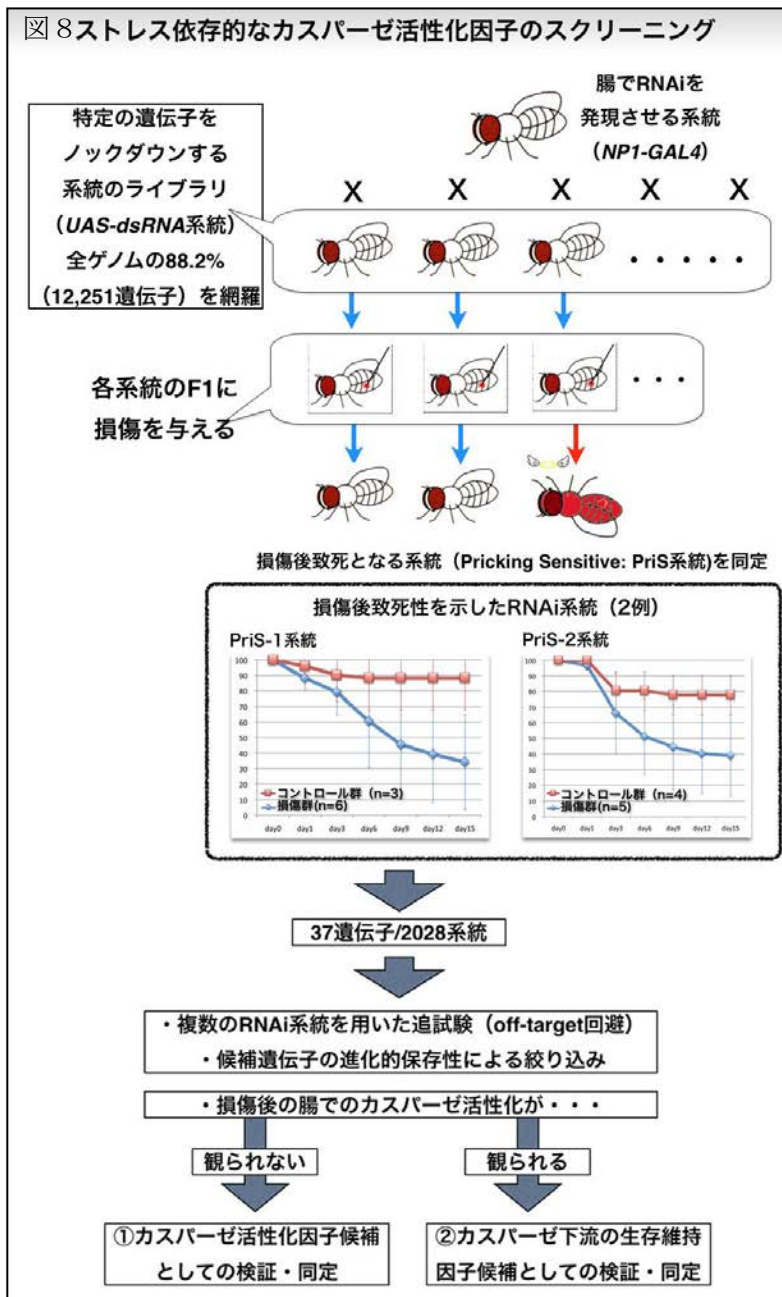
3. カスパーゼに依存したストレス応答に関わる遺伝子の探索

<ストレス応答におけるカスパーゼ関連因子の RNAi スクリーニング>

ショウジョウバエでは、時期、組織特異的に発現する転写因子 GAL4 により、UAS 配列 (GAL4 認識配列を持つ) の下流に組み込んだ遺伝子を発現誘導する遺伝学的手法 (GAL4/UAS システム) が確立されている。我々はこの手法により、カスパーゼ阻害因子 p35 を様々な組織で発現させて損傷後の致死性を調べ、主に腸細胞で p35 を発現する (*NPI-GAL4+UAS-p35*) 系統が *dpf-1* 変異体と同様に損傷後致死となることを確認し、損傷ストレス後に腸細胞でのカスパーゼ活性化が、ショウジョウバエ個体の生存維持に必要であることを見出した。そこで、ストレス応答における腸細胞でのカスパーゼ活性化制御とその下流因子を遺伝学的にスクリーニングするために、腸細胞特異的遺伝子ノックダウン法を採用した。

ショウジョウバエでは、遺伝子の一部 (約 500bp) の配列を UAS 配列の下流にタンデムにつないで (inverted repeat) 発現させることで、細胞内で dsRNA を形成し、目的の遺伝子を効率よくノックダウンする技法 (RNAi) が確立している。日本のショウジョウバエバイオリソースプロジェクト (NBRP) の一環として、全ゲノムの 88.2% (12,251 遺伝子) をカバーする *UAS-dsRNA* システムのライブラリーが、国立遺伝学研究所のストックセンターで維持されている。

まず、腸細胞で発現する *NPI-GAL4* ドライバーを用いて、ライブラリーの *UAS-geneX dsRNA* を発現させることで、腸細胞における遺伝子ノックダウンを行った。*NPI-GAL4* システムと *UAS-geneX dsRNA* システムを交配させ、成虫へと発生した F1 システム 40 匹を 25°C で 2 日間飼育した。炭酸ガスで麻酔をかけ、20 匹の F1 システムには腹部腹側中央部付近にマイクロインジェクション用ガラス針で損傷を与えた。残り 20 匹は、麻酔のみで損傷を与えない対照群とした。その後、対照群と損傷群



をそれぞれ新しいエサの入ったバイアルに入れ、25°Cで飼育した。損傷を与えた日(day0)の生存匹数を100%とし、翌日(day1)及び3日ごとにday15までの生存率を計測した。飼育環境をクリーンに保つため、3日おきに新しいバイアルに置換した。F1系統のday15において、対照群の生存率が80%以上であるが損傷群の生存率が50%以下である系統をPricking Sensitive(PriS)系統とした。これまでに2028系統の検証が終了し、37系統のPriS系統を同定している(図8)。同定された遺伝子の中には、ロイシンリッチリピートを持つタンパク質(未報告)や、GPCRなどの細胞外センサー候補遺伝子が含まれていた。

RNAi系統を用いたスクリーニングでは、dsRNAのoff-targeting effectが危惧されるため、target配列の異なるdsRNAによる検証が必要である。そこで、VDRC(ウィーンのストックセンター)で樹立された、target配列の異なる*UAS-dsRNA*系統を用いて、損傷後致死性の追試験を行った。まだ追試験の途中ではあるが、ドメイン構造からヒトの有機アニオントランスポーターとの類似性が示された遺伝子が得られている。今後は、各系統における損傷後の腸でのカスパーゼ活性化を検討し、カスパーゼ活性化因子またはカスパーゼ下流の生存維持因子候補としての解析、同定を進行させていく。

<カスパーゼ抑制系統における致死性因子のRNAiスクリーニング>

腸におけるカスパーゼ抑制によって引き起こされる損傷後致死性に関与する遺伝子を同定するため、腸特異的カスパーゼ抑制系統を用いてRNAiスクリーニングを行った。スターター系統(*NPI-GAL4+UAS-p35*)を*UAS-dsRNA*系統と交配させ、*p35*と*dsRNA*を腸で同時に発現する(*NPI-GAL4+UAS-p35+UAS-geneX dsRNA*) F1系統において、損傷後の生存率を回復する*dsRNA*系統を探索することにより、カスパーゼ抑制下で損傷後に致死を誘導する候補因子を同定することを目的とした。これまでに約200系統のスクリーニングを終了したが、致死性を回復させる*dsRNA*系統は得られなかった。スターター系統の表現型が強すぎてRNAiの効果が十分でないために、回復効果が観られない可能性が考えられる。一方で、腸細胞でのカスパーゼ抑制による損傷後致死性がみられるまで1週間以上の時間経過を要することから、腸細胞でのカスパーゼ抑制の効果は、脂肪体などの他の組織から分泌される因子によって増幅され、それら因子が結果として毒性を示す可能性が示唆される。今後は、全身で*dsRNA*を発現させた上で(*da-GAL4+UAS-geneX dsRNA*)、腸特異的にカスパーゼを抑制(*lexA-GAD*など*GAL4/UAS*以外のシステム+*p35*)するためのシステムの構築を行う必要がある。

4. 傷害ストレスに応答する代謝産物の同定

<カスパーゼ活性化因子 *dpf-1* 変異体でのメタボローム解析>

野生型(*Canton S*)、*dpf-1^{k1}*、*dpf-1^{k1/N5}*の成虫雄の胸部背側にマイクロインジェクション用のガラスキャピラリーを数回突き刺し、毛細管現象を利用して体液を採集した。採集された100匹分の体液に含まれる各代謝産物を慶応大学曾我朋義教授との共同研究でキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-Mass)により分析した。計518の代謝産物について網羅的な定量をおこない、3系統全てのショウジョウバエ体液中の代謝産物について同定されたもののうち、4回測定データから得られた標準偏差が平均値の半分以下のものを信頼性のあるデータとして解析した(図9)。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。次に正確なサルコシン定量系の構築をおこなった。超高速液体クロマトグラフィー-タンデム四重極型質量分析系(UPLC-MS/MS)を導入し、ショウジョウバエ個体サンプルにおけるサルコシンの定量をおこなった。CE-MSによる体液メタボローム解析と同様に、*dpf-1*変異体においても3倍から5倍程度の高いサルコシン量が検出された。このシステムによるサルコシン分析系で、さらに別の機能欠損変異体である*dpf-1^{cd4}*においても同様の表現型がみられたことから、サルコシンの上昇は*dpf-1*遺伝子の機能欠損により生じることが確認された。サルコシンの量的な変動は創傷によっては認められなかったが、この経路がストレス感受性に関わる可能性を考え、さらに以下の研究を行った(Obata et al. in preparation)。

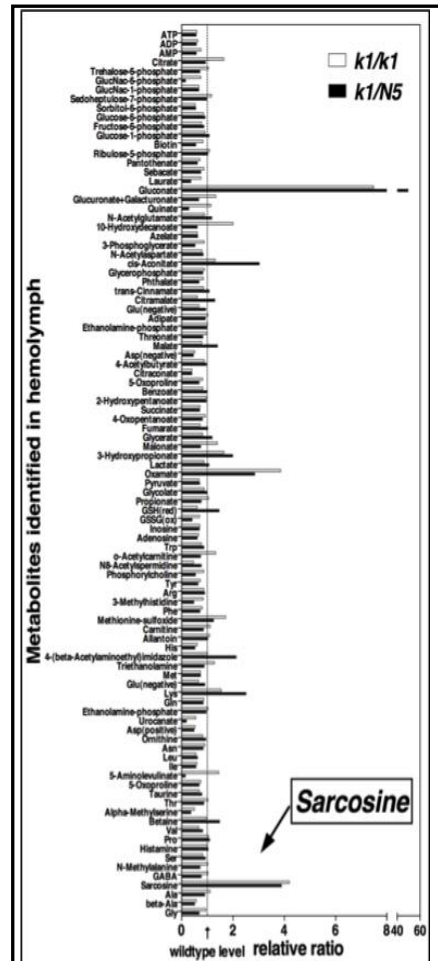


図9. *dpf-1* 変異体におけるメタボローム解析 *k1*、*N5*は*dpf-1*の機能欠損変異体である

<サルコシン代謝酵素の同定と遺伝学的操作>

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)、ジメチルグリシンデヒドロゲナーゼ(DMGDH)と呼ばれる2つの酵素によって、それぞれグリシンあるいはジメチルグリシンから合成される。また、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。脂肪体に発現するドライバー(*FB-GAL4*、

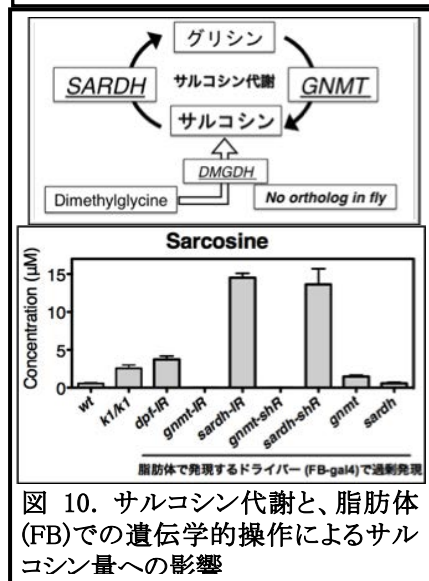


図10. サルコシン代謝と、脂肪体(FB)での遺伝学的操作によるサルコシン量への影響

r4-GAL4)を用いた *gnmt*, *sardh* の遺伝子操作(*UAS/GAL4* 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量を調節していることが明らかとなった(図 10)。遺伝子のノックダウンには Inverted Repeat と Short hairpin RNA の 2 種類の方法を用いた。また腸細胞で特異的に発現するドライバー(*NP1-GAL4*)による遺伝子操作では、*sardh* のノックダウンでサルコシン量が増加したが、*gnmt* のノックダウンではサルコシン量の低下はみられなかったことから、SARDH タンパク質は脂肪体のみならず腸細胞でも発現している可能性があるが、GNMT タンパク質は脂肪体で優位に発現していると考えられる。

<dpf-1 変異体におけるメチオニン代謝>

dpf-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トングによって GNMT、SARDH の発現量を確認したところ GNMT の発現が *dpf-1* 変異体で亢進していることが明らかとなった(図 11)。SAM は活性化メチオニンとよばれ、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重要な代謝産物である。そこで SAM 分析系を構築し、高メチオニン食摂食下のショウジョウバエ体内におけるメチオニン、SAM、サルコシン量を定量した。その結果、メチオニン量はコントロールであるアラニン摂食群

に比べておよそ 8.7 倍上昇しており、SAM 量はおよそ 2.1 倍に上昇していた。この時 SAM 量が 2 倍程度の上昇に

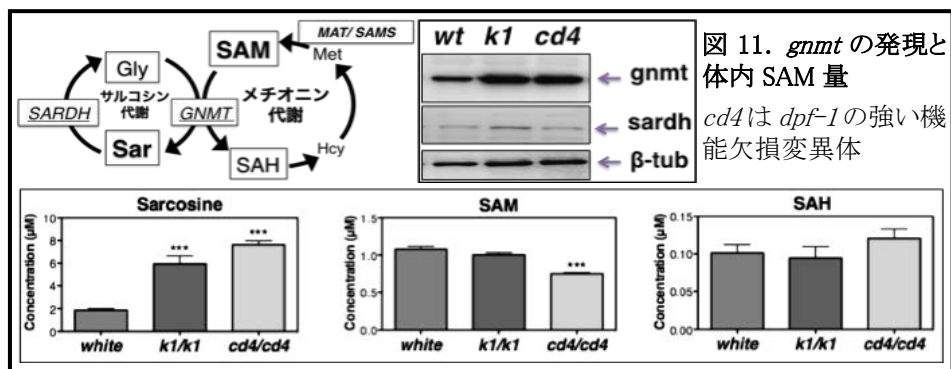


図 11. *gnmt* の発現と体内 SAM 量
cd4 は *dpf-1* の強い機能欠損変異体

とどまっていたのに対し、サルコシン量は 5.2 倍上昇していることから、摂食したメチオニンは SAM に変換されたのちにサルコシンへと変換され、それによって SAM の過剰な上昇を抑制していることが示唆された。そして全身、あるいは脂肪体特異的なドライバーをもちいた遺伝子操作によって、*gnmt* の過剰発現系統では SAM 量が低下し、RNAi によって SAM 量が顕著に増加することが明らかとなった。この結果から、ショウジョウバエ体内において GNMT は実際に SAM を消費してその量を調節する酵素であることが明らかとなった。*dpf-1* 変異体においては有意な SAM 量の低下が確認され、若干ではあるが SAH 量の増加が見られた(図 11)。SAM 量は SAMS による SAM 生合成と GNMT による SAM 消費のバランスで決定されていると考えられるが、メチオニンの量には変化がみられず、*sams* の発現量に有意な低下がみられないため、*dpf-1* 変異体にみられる SAM 量の低下は *gnmt* の発現亢進に由来するものであると考えられた。

SAM はほとんどのメチルトランスフェラーゼの基質になっており、1 カarbon サイクルの重要な中間代謝産物であることに加えて、DNA、RNA、タンパク質、リン脂質などの生体分子のメチル化に必須の代謝産物である。また、SAM デカルボキシラーゼ(SAMDC)によって decarboxy SAM(dcSAM または S-adenosylmethionineamine)に変換されたのちは、スペルミジン、スペルミンなどのポリアミン合成に利用される。ポリアミンは遺伝子発現やタンパク質の合成、細胞の増殖に関与している。

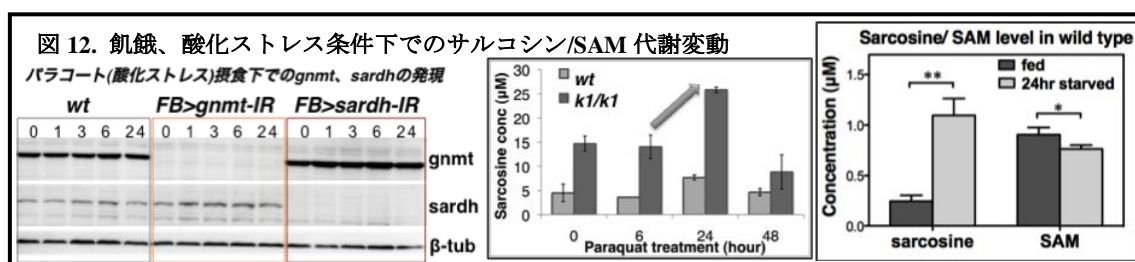
SAM 依存性のメチル化の標的タンパク質には、ヒストンのみならず p53、NF- κ B、FoxO などがあり、また、フォスファチジルエタノールアミンからフォスファチジルコリンの生合成にも SAM が利用される。したがって SAM の制御機構が破綻した場合には、その効果はエピジェネティクス、転写因子の活性化制御、適切なリン脂質組成の破綻につながる事が予想される。

哺乳類 Apaf-1 と相互作用するタンパク質として報告されている APIP は、メチオニンサルベージ経路の中間代謝酵素であり、SAM からポリアミンを生合成する際にできる副生成物、methyl-thioadenosine(MTA)を再びメチオニンへ戻す経路に必須のタンパク質である。APIP は Apaf-1 の CARD ドメインと直接相互作用して細胞死を抑制していることが知られているが、Apaf-1 が APIP の酵素活性に影響を与えるかどうかは明らかにされていない。Apaf-1 が APIP と相互作用して、積極的にメチオニン代謝と関わっていることが予想される。

5. ストレス応答代謝産物生理機能の解明

<代謝産物の遺伝学的操作とそのストレス応答への関わり>

サルコシン濃度は、酸化ストレスあるいは飢餓によって上昇する(図 12)。逆に SAM レベルは、一過的に減少することが観察される。野生型および変異体のサルコシンレベルの違いは、*gnmt* の発現量の違いと相関していたため、ストレス応答時に上昇するサルコシン量は *gnmt* の発現上昇に由来すると考えられた。また、*sardh* のノックダウン系統に飢餓ストレスをかけると、もともと高いサルコシン量はさらに上昇し、*gnmt* のノックダウン系統に飢餓ストレスをかけると、サルコシン上昇が抑制された。*gnmt* の発現量の高い *dpf-1* 変異体では、ストレス応答時にさらにサルコシン量が増加しており、ストレス前後でのサルコシンレベルの比は野生型と同様、ほぼ 2 倍であった。一方 *sardh* の発現は、ストレス応答時には低下するどころか、やや上昇する様子がみられ、体内で一過的に上昇したサルコシンを再びグリシンへと分解していると考えられる。



< *dpf-1* およびサルコシン代謝とストレス応答 >

次にサルコシン代謝が生体防御システムとして使われている可能性を調べる目的で、*gnmt*、*sardh* の遺伝学的操作をおこなった。*dpf-1* 変異体に比べてストレス感受性への影響は低いものの、有意な感受性変化が認められた(図 13)。また *dpf-1* 変異体において *sardh* を過剰発現させた場合、部分的ではあるがストレス感受性がレスキューされたことから、*dpf-1* 変異体においてサルコシン代謝異常がストレス感受性の一因となっていることが示唆された。

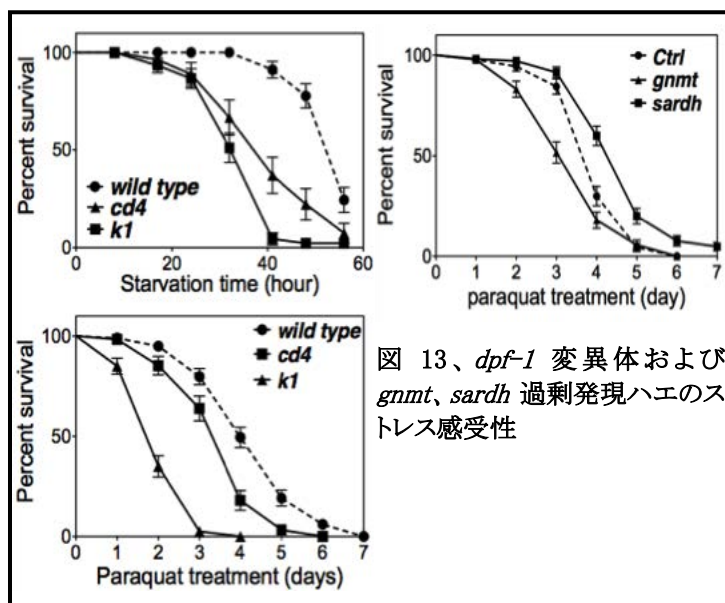


図 13、*dpf-1* 変異体および *gnmt*、*sardh* 過剰発現ハエのストレス感受性

ショウジョウバエ *gnmt* の過剰発現、または *sardh* の RNAi 系統では、コントロールに比べて 3 倍から 10 倍程度サルコシンが上昇することから、この系統は高サルコシン血症の病態モデルと捉えることが出来る。酸化ストレス、飢餓ストレス応答時にはサルコシンレベルの上昇にともなって *sardh* の発現が上昇する報告もあり、*sardh* 遺伝子はストレス応答時に上昇するサルコシンをグリシンへともどしていると考えられる。サルコシン代謝がもつ生理的な機能の解明はいまだ不十分であるが、この代謝経路がストレスに応じて変動し、メチオニン経路の主要な代謝産物である SAM を一定に保つ働きがあることが明らかになってきた。ショウジョウバエ *gnmt* や *sardh* の変異体、あるいは過剰発現、ノックダウン系統の表現型を解析することで、生体内での全身性ストレス応答に果たす役割が明らかになると期待される。

6. マウスにおけるストレス応答の解析

< 部位時期特異的カスパーゼ活性阻害系の作出 >

哺乳類においてもカスパーゼ活性化不全が周辺組織に与える影響を検討することを試みた。そのためには、カスパーゼ活性化を部位時期特異的に操作することが重要である。しかしこれまでのところ、カスパーゼの部位時期特異的遺伝学的操作が可能なマウスは Caspase-8 conditional knockout マウスしか報告が無いのが現状である。さらに、カスパーゼはマウスにおいては 10 種類以上存在し、機能重複があるため一つの遺伝子を壊してもカスパーゼ欠損の効果を見られない可能性がある。そこで、これらの点を打開するため、広範な種類のカスパーゼに結合しその活性を阻害するバキュロウイルス由来因子 p35 の発現を、部位時期特異的に誘導できるマウスを新規作成した。このマウスを用いて、特定組織のみでカスパーゼ活性化を阻害しその効果を見るという実験を行った。現在までに胎生期神経系のみでカスパーゼ活性化を阻害した場合に、生後水頭症を発症することが明らかとなった。さらにカスパーゼ活性の必要な時期を絞り込むべく、生後や出生前にカスパーゼ活性阻害を行い、組織への影響を検討中である(Yoshida et al., in preparation)。同

時に、これらの影響が細胞自律的なものかそれとも周辺組織への影響を介するのか検討するため、一部の神経細胞およびグリア細胞（主にアストロサイト）のみに外来遺伝子を発現させることのできる遺伝子導入系の開発を行った。胎生期に電気穿孔法によって脳内へ外来遺伝子を導入する手法自体はすでに実用化されていたが、Tol2 トランスポゾンシステムを応用することにより、脳内の一部の細胞のみで特定遺伝子の発現を誘導することが可能となった (Yoshida and Yamaguchi et al., Genes to Cells, 2010)。

<脳初期形成過程におけるカスパーゼ活性の生理的意義の解明>

これまでの知見で、ミトコンドリアを介してカスパーゼを活性化する因子 (Apaf-1, Caspase-3, Caspase-9) が神経系形成に重要な事が知られる。これらのマウスは胎生期に脳室の狭小や外脳症などの重篤な神経系障害を生じて致死となる。しかし、今回得られた神経系特異的カスパーゼ活性化阻害の結果はこれらのいずれとも異なる表現型を示しており、今後のさらなる解析により、これまで全く未知である、カスパーゼを介したストレス応答シグナルの脳発達過程への関与が解明できると期待される。

一方、上述のミトコンドリア経路カスパーゼ活性化不全個体 (*apaf-1* KO, *caspase-3* KO, *caspase-9* KO) における脳神経系形成障害は、アポトーシスできなかった神経前駆細胞が蓄積するものと考えられてきた。しかし、実際にカスパーゼ活性化不全細胞が脳神経系形成過程の組織動態にどう影響を与えるのかは殆ど不明であった。そこでこの点についても検討した。まず脳神経形成過程の定量的組織解析を行ったところ、上述のカスパーゼ活性化不全個体の胎生期では意外なことにこれまでの想定と異なり、脳神経前駆細胞数の増加が認められなかった。その理由を詳細に調べたところ、これらの変異体で見られる脳室の狭小は、より初期の神経管閉鎖不全異常に起因する脳室拡大不全によるものが明らかとなった (Nonomura et al., submitted)。

そこで、次にカスパーゼ活性化不全がなぜ神経管閉鎖不全を生じるのかを検討した。神経管閉鎖は非常に短時間 (マウスの場合わずか半日) の間に神経組織の形態に劇的な変化が生じる。そのためライブイメージング解析が有用であると考えられたため、新規にライブイメージング系を樹立し解析をおこなった。その結果、カスパーゼ活性化不全個体では、神経板から神経管に形態変化が生じる際の組織運動が円滑に進行しないため、神経管閉鎖の進行に大幅な遅延が生じることが明らかとなった (Yamaguchi and Shinotsuka et al., JCB, 2011)。神経管閉鎖後には脳室拡大という発生イベントが控えている。こうした遅延により、神経管閉鎖運動とは拮抗的に働く脳室拡大までに閉鎖が完了できないために、閉鎖不全が生じるのではないかと考えられた。ではなぜカスパーゼ活性化が神経管閉鎖運動の促進に働くのか。その解明は今後の課題であるが、これには次項で述べるストレス動態可視化マウスを活用できると期待される。

<カスパーゼ活性化を指標にしたストレス動態の解析>

カスパーゼ活性化により細胞は断片化し貪食細胞により速やかに除去される。そのため、組織内でカスパーゼ活性化細胞を検出する手法である抗体染色や TUNEL 法だけでは、実際に死細胞が生じる部位を正確に捉えることは不可能である。カスパーゼ活性化とそれによる細胞死が周辺組織に与える影響を解明するためには、これらのイベントが生じる瞬間を捉えその前後の組織動態を明らかにする必要がある。我々は、独自に開発したカスパーゼ活性化可視化プローブ SCAT3 (Takemoto et al., JCB, 2003)を全身で発現する SCAT3 トランスジェニックマウスを新規に作成した (Yamaguchi and Shinotsuka et al., JCB, 2011)。このマウスを用いることで、哺乳類生体組織内におけるカスパーゼ活性化動態とそれに伴うアポトーシスを可視化することに世界で初めて成功した。この解析により、先述の神経管閉鎖過程では、挙動の異なる二種類のアポトーシス細胞がいることが明らかになった。一種類目は、いわゆる典型的なアポトーシスで、カスパーゼ活性化のち速やかに断片化し周辺細胞に貪食される。一方、もう一種類は、カスパーゼ活性化のち断片化を経ずに丸い形態のまま長時間(最長6時間)残存した。このときカスパーゼ活性の強度にも違いが認められ、前者の方がより強い活性化を示していた (Yamaguchi and Shinotsuka et al., JCB, 2011)。こうしたカスパーゼ活性化強度の違いおよび死んだ後の細胞塊の振る舞いの違いが発生期だけでなく成体組織で見られるかどうかは今後の検討課題であるが、こうした違いが周辺組織・細胞の増殖・移動や炎症誘起能等において異なる影響を与えることも十分に考えられ興味深い。

カスパーゼファミリーには、先述したとおりミトコンドリア経路を介したアポトーシスの誘導に関与するカスパーゼ (Caspase-3, Caspase-9 など) 以外に、炎症性サイトカインの産生等に主に関与するカスパーゼ (Caspase-1, Caspase-11 等) も知られる。そこでこれら炎症応答に関与するカスパーゼの活性化動態を可視化すべく、SCAT3 を改変し SCAT1 を作成した。現在までに、SCAT1 を用いることで哺乳類培養細胞系での炎症応答時のカスパーゼ-1 活性化を、リアルタイムで観察することに成功している (Liu and Yamaguchi et al., unpublished)。

以上二種類のカスパーゼ動態活性化ツールにより、今後、哺乳類生体組織内におけるストレス応答シグナル動態が明らかにできるものと強く期待される。

<ストレス応答代謝産物のマウスでの機能解析>

ショウジョウバエのカスパーゼシグナル活性化不全胚で変化していた代謝産物にサルコシンがあった。サルコシン代謝は1カーボン代謝と深い関連がある。興味深いことに、1カーボン代謝に深く関わる葉酸の欠乏は、カスパーゼシグナル活性化不全胚でも見られた神経管閉鎖異常を生じることが、ヒトでもマウスでも知られている。しかしなぜ葉酸欠乏が神経管閉鎖期にクリティカルな影響を及ぼすのか、その機序は未だ殆ど不明である。さらに1カーボン代謝及び葉酸動態は、ヒト成体においては大うつ病をはじめ種々の神経系疾患と相関があることが示唆されている。こうした背景から、1カーボン代謝と、脳神経系形成の最初期である神経管閉鎖過程と、ストレス応答シグナルであるカスパーゼシグナルとの関係を解明することを試みている。

まず、哺乳類神経管閉鎖過程においてどのような代謝経路変化が生じるかを調べた。具体的には、神経管閉鎖の各ステージの遺伝子発現パターンを DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、神経管閉鎖の前後で複数の代謝経路に劇的な変化が生じることが明らかとなった。さらに、同様のステージ胚から代謝産物を抽出し、網羅的 CE-Mass 解析をおこない、遺伝子発現変化に対応した代謝物変化を伴うかを検討している (Miyazawa et al., unpublished)。今後、これらの代謝経路

変化の生理的意義を実験的に検討していく予定である。

<嗅覚系におけるカスパーゼによる非細胞死機能>

嗅神経細胞は一生に渡って新生を続けるユニークな神経細胞である。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の初期段階において匂いの識別能力が低下していることから、発生期以降の嗅神経細胞の新生と病態との関連性が注目されている。嗅覚神経系でのカスパーゼ活性化不全マウスの詳細な解析により、カスパーゼの神経成熟に関わる非アポトーシス機能が明らかになった(Ohsawa et al., PNAS, 2010)。カスパーゼ依存的な軸索伸長・成熟機構の発見は、神経回路網の形成機構のみならず脳の恒常性の維持やその破綻によって引き起こされる疾患メカニズムの理解へとつながることが期待される。

7. ストレス応答シグナルの新たな生体制御機構と生理機能

<細胞間の競合的な関係によるストレス応答>

完全変態をするショウジョウバエでは、幼虫で作られた組織の殆どが成虫細胞に置き換わる。この組織の入れ替わり(組織再構築)は組織芽細胞の増殖と幼虫細胞の除去とが協調しておこるが、両者の関係は細胞競合に似たところがある。SCATを用いた生体イメージングをするとカスパーゼ3様活性 (DEVDase)はランダムに幼虫表皮で見られるのではなく、組織芽細胞と接する境界領域の幼虫表皮で高頻度に観察された。境界でのカスパーゼ活性化は組織芽細胞増殖を遺伝学的に抑制する、あるいは近 UVA レーザー (405nm)を用いて境界領域だけで増殖を遅らせると見られなくなるため、境界領域で増殖する組織芽細胞がカスパーゼ活性化の引き金を担っていると考えられる。増殖とアポトーシスの連関がおこる再編境界が順次進行していくことは、組織全体のサイズは変更せず組織の入れ替わりを成し遂げる有効な仕組みであると考えられる(Nakajima et al., MCB., 2011)。

TNFは組織傷害や感染時の炎症に重要なサイトカインである。ショウジョウバエゲノムには1つのTNF(*eiger*)とその受容体(*wengen*)があることを我々は明らかにしてきたが(Igaki et al., EMBO J., 2002; Kanda et al., JBC., 2002)、ショウジョウバエのTNFシグナル経路の全貌は明らかにされていない。そこで、*eiger* 過剰発現による複眼縮小表現型を指標にした染色体欠失系統のゲノムワイドな優性モディファイアースクリーニングを行った。その結果、多くのエネルギー代謝経路の遺伝子がTNFシグナルに関わることが明らかになった。この研究で明らかになった代謝経路は新生がん原性細胞の細胞競合による除去に深く関わっていることがわかり、細胞社会におけるがん細胞制御における新たなターゲットとして興味を持たれる(Kanda et al., PNAS, 2011)。

<新たなストレスシグナル動態解析プローブの開発>

動物細胞では進化的に保存された内在性カスパーゼ阻害遺伝子として IAP (Inhibitor of Apoptotic Protein) が知られている。IAP は E3 ユビキチンリガーゼであり代謝回転のはやい短寿命蛋白質である。IAP 蛋白質の量的な調節によってカスパーゼ活性の調節が行われているため、IAP 分解を生体内でリアルタイムに可視化することでカスパーゼ活性化シグナルの時空間的な解析が可能になると考えられる。ショウジョウバエ DIAP1-Venus (GFP variant) を作成し、細胞死刺激によって細胞死が誘導され Venus による蛍光の消失がみられるトランスジェニックショウジョウバエを作成した。このプローブは、DIAP1 に変異を導入することでカスパーゼとの結合は出来ないがプロテアソームによって内在性の DIAP1 と同様に分解されるようにデザインされている (Pre-apoptosis signal detecting probe based on DIAP1 degradation: PRAP と命名)。生体イメージングにおいては十分なプローブの発現が必要であるが、PRAP は高レベル発現させてもカスパーゼ阻害による細胞死には影響がなかった。PRAP を用いての単一細胞レベルでの生体イメージングが可能になり、細胞死シグナルは細胞の分化段階によって細胞死のみならず細胞の形態形成にかかわることが明らかになった (Koto et al., JCB, 2009)。

<分化に失敗した細胞を取り除くことによる発生ノイズ除去>

細胞増殖や分化の際にエラーが生じ、そのような細胞が発生過程で取り除かれることは想像に難くないがその実体に迫った知見は殆どなかった。生体において細胞分化のプロセスを細かに観察することが分化エラー細胞を調べる一番直接的な方法である。このような研究には、一細胞の解像度での生体イメージングが可能で、かつ、多様な分化マーカーが利用できる細胞系譜が有効である。ショウジョウバエ蛹期に形成される中胸背毛は機械受容器として働く末梢感覚器である。感覚器前駆体細胞 (SOP) がプロニューラルクラスターに生じ、その後、非対称分裂によって感覚器が形成される。SOP の出現を *neuralized (neu)* 遺伝子の発現を指標に生体イメージングにて (*neu-GAL4/UAS-GFP*) 観察すると、将来 SOP となる細胞の近傍に *neu* 陽性の細胞が出現することが明らかになった。このような細胞 (SOP 様細胞と呼ぶ) の殆どは一度分裂したのち、アポトーシスによって生体から除かれていった。このような SOP 様細胞は本来の SOP に対して 20% の割合で生じ、その殆どはアポトーシスで失われる。*Notch* ヘテロ変異体では、20% 余分に SOP が生じ、その分だけ余分な中胸背毛が生じることから、SOP 様細胞の出現とアポトーシス制御には *Notch* が関わっていることが考えられる。このように生体イメージングによって分化に失敗した細胞の存在が明らかになり、外感覚器配置パターンを作るには、側方抑制だけではなく、アポトーシスが発生で生じるエラーを取り除くことで完成されることが明らかになった (Koto et al., Cur. Biol., 2011)。

<老化における細胞死シグナル制御>

1) マウス老化脳でのカスパーゼ活性化

神経系や免疫系で重要な働きをするセマフォリン7Aがカスパーゼ9によって特異的に切断されることを見だし、この切断されたセマフォリン7Aを組織化学によって検出する抗体を用いて、脳の老化におけるカスパーゼ9の活性化を解析した。その結果、24ヶ月齢マウスの脳では、カスパーゼ9が活性化するが、この活性化はカスパーゼ3の活性化を伴わず、細胞死の誘導をしていないことが明らかになった。このように、老化脳ではイニシエーターカスパーゼの活性化はあるものの、アポトーシスが抑制された状態にある (Ohsawa et al., J. Neurosci., 2009)。老化脳での

アポトーシス機能の低下が、ショウジョウバエ腸生体のように、生体ストレス応答の増大につながる可能性が考えられる。

2) ショウジョウバエ老化による神経変性制御

カスパーゼを幼虫で活性化させると致死になるが、これは過剰なカスパーゼの活性化はそれ自体が生体ストレスになっているためと解釈される。カスパーゼと関連したストレス応答に関わる遺伝子の探索を、遺伝子過剰発現をベースにしたショウジョウバエの遺伝学的なスクリーニングによって行った。得られた遺伝子産物は19Sプロテアソームの構成因子であるRpn11であり、その過剰発現が神経変性の晩発性進行を抑制したことから、正常老化におけるプロテアソームの活性変化に注目した。東京都医学総合研究所田中啓二先生との共同研究で詳細な解析を行った結果、加齢に伴う生体内のプロテアソーム活性の低下が、神経変性疾患発症のリスクファクターの一つである可能性が明らかになった (Tonoki et al., MCB, 2009)。

蛋白質分解系の低下による異常蛋白質の蓄積に加え、原因遺伝子産物の質的な変化が晩発性神経変性の原因になる可能性を考え実験を行った。伸長ポリグルタミンによるショウジョウバエ複眼変性モデルに、時間的に遺伝子の ON/OFF が可能な発現制御システムを導入し、理研脳センター田中元雅先生との共同で詳細な検討を行った。その結果、若年で発現させたポリグルタミンアミロイドと老齢個体で発現させたポリグルタミンアミロイドとは質的な変化があることを明らかにした (Tonoki et al., Genes to Cells, 2011)。

(2) 研究成果の今後期待される展開

本研究では、生体でのストレスシグナルの担い手として細胞死シグナルに注目し研究を行った。その結果、細胞死シグナルの新たな機能が浮かび上がってきた。カスパーゼは細胞死実行因子としてアポトーシスに関わるが、本研究によってその活性化調節、生体機能はこれまで以上に多岐にわたることが明らかになった。特に、細胞死シグナルが、細胞社会での細胞間相互作用に重要な役割を果たし、組織再編成や細胞競合による新生がん原性細胞の除去に関わるとの知見は、生体における疾患発症の理解を新たな視点から促進するものである。

組織傷害があった場合、生体は傷害部位とは離れた部位のカスパーゼを活性化して、近傍の幹細胞系を賦活化すると本研究の知見は、生体としての幹細胞系制御の理解に発展するものである。また、メタボロームと代謝経路の研究からストレスに応じてメチオニン経路の制御があることを明らかにしており、慢性炎症を含む疾患の診断、新たな治療法開発に向けた基礎的な研究の展開が期待される。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 14 件)

Ohsawa, S., Watanabe, T., Katada, T., Nishina, H., and Miura, M.: Novel antibody to human BAP1 labels apoptotic cells post-caspase activation.

BBRC 371, 639-643, 2008

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

Igaki, T., Pastor-Pareja, J. C., Aonuma, H., Miura, M., and Xu, T.: Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*.

Dev. Cell 16, 458-465, 2009

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

Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M.: Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with aging process.

Mol. Cell Biol. 29, 1095-1106, 2009

Ohsawa, S., Hamada, S., Kuida, K., Yoshida, H., Igaki, T., and Miura, M.: Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 13366-13371, 2010

Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., and Miura, M.: Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon mediated gene transfer system. Genes to Cells 15, 501-512, 2010

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., and Miura, M.: Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure.

J. Cell Biol. 195, 1047-1060, 2011

Kanda, H., Igaki, T., Okano, H., and Miura, M.: Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced non-apoptotic cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108,

18977-18982, 2011

Nakajima, Y-I, Kuranaga, E., Sugimura, K., Miyawaki, A., and Miura, M.: Non-autonomous apoptosis is triggered by local cell cycle progression during epithelial replacement in *Drosophila*.

Mol. Cell Biol., 31 2499-2512, 2011

Kuranaga, E., Matsunuma, T., Kanuka, H., Takemoto, K., Koto, A., Kimura, K and Miura, M.: Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. *Development* 138, 1493-1499, 2011

Tonoki, A., E. Kuranaga, N. Ito, Y. Nekooki-Machida, Tanaka, M., and Miura, M.: Aging causes distinct characteristics of polyglutamine amyloids in vivo. *Genes to Cells* 16, 557-564, 2011

Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs. *Cur. Biol.* 21, 278-287, 2011

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Misaki, K., Yonemura, S., Kanuka, H., and Miura, M.: Homeostatic epithelial renewal in the gut is required to dampen a fatal systemic wound response in *Drosophila*. *Cell Reports* in press

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

Takeishi, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Sensing and Reacting to Dangers by Caspases: Caspase activation via inflammasomes. *Drug Discoveries & Therapeutics* 2, 14-23, 2008

大澤志津江、三浦正幸、神経系における細胞死の役割とその調節機構～選択的細胞死を中心に、*Brain and Nerve* 60, 343-350, 2008

倉永英里奈、三浦正幸、カスパーゼの新しい機能、*生化学* 80, 24-28, 2008

古藤日子、倉永英里奈、三浦正幸、カスパーゼ研究の新展開～神経細胞の運命決定から晩発性疾患の発症まで、*実験医学* 26, 322-327, 2008

倉永英里奈、三浦正幸:ショウジョウバエ個体発生におけるライブイメージング～細胞に何が起こったか、その瞬間を捉える～、*実験医学* 26, 2792-2798, 2008

野々村恵子、山口良文、三浦正幸:細胞社会におけるアポトーシス制御とがん、*がんの分子標的治療(鶴尾隆編)*, 150-155, 2008

三浦正幸:組織の恒常性維持にかかわるストレス応答分子としてのカスパーゼ、*蛋白質・核酸・酵素* 53, 1239-1245, 2008

殿城亜矢子、三浦正幸:ショウジョウバエを用いた神経変性疾患の遺伝学的研究、*細胞工学* 28, 461-465, 2009

小幡史明、倉永英里奈、三浦正幸:ショウジョウバエにおける組織傷害応答、*炎症と免疫* 18, 222-227, 2010

三浦正幸:様々な生命現象に関わる細胞死研究の魅力とその生理機能解明、*実験医学* 28, 994-1002, 2010

篠塚直美、山口良文、三浦正幸:カスパーゼの異常と疾患、*メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 36, 711-714, 2010

Koto, A., and Miura, M.: Who lives and who dies: Role of apoptosis in quashing developmental errors. *Addendum for Communicative and Integrative Biology*, 4, 495-497, 2011

Miura, M.: Apoptotic and non-apoptotic caspase functions in neural development. *Neurochemical Res.* 36, 1253-1260, 2011

Miura, M.: Active participation of cell death in development and organismal homeostasis. *Dev. Growth. Diff.* 53, 125-136, 2011

大澤志津江、三浦正幸: 嗅神経細胞とカスパーゼ-カスパーゼを介した嗅神経細胞の運命制御、*脳*21, 14, 55-60, 2011

中嶋悠一郎、三浦正幸: カスパーゼが織り成す組織のスクラップ・アンド・ビルト～組織リモデリングにおけるアポトーシスと細胞増殖の協調、*実験医学* 29, 1891-1897, 2011

小幡史明、倉永英里奈、三浦正幸: ショウジョウバエにおける炎症応答と組織再生、*生体の科学* 62, 249-256, 2011

山口良文、三浦正幸: 個体発生における細胞死の役割、*実験医学* 30, 218-223, 2012

三浦正幸: プログラム細胞死: その分子機序と発生における生理的な役割、*ライフサイエンス領域融合レビュー* 1, e002, 2012

Miura, M.: Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4; doi: 10.1101/cshperspect. a008664, 2012

Yamaguchi, Y., and Miura, M.: How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cell Mol Life Sci.*[Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00018-012-1227-7, 2012

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 15 件、国際会議 12 件)

Miura, M.: In vivo dynamics of cell death signaling in the *Drosophila* sensory organ development. *International Cell Death Society Symposium*. 2008, 6.6-9, Shanghai, China

Miura, M.: Involvement of the 26S proteasome in *Drosophila* model of age-related neurodegenerative disease. *The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*. 2008.7.9-11. Tokyo, Japan.

Miura, M.: In vivo imaging and physiological roles of cell death signaling during development. *The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience*. 2008, 12.2-3, Tokyo, Japan

Kuranaga, E., and Miura, M.: Dynamics of Asymmetric Organ Morphogenesis using in vivo Imaging Analysis. *BMB 2008 Symposium*. 2008. 12. 9-12. Kobe, Japan

Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., Miura, M.: Involvement of the 26S proteasome in the age-related neurodegenerative diseases. BMB 2008 Symposium. 2008. 12.9-12. Kobe, Japan

Miura, M.: In vivo dynamics of cell death signaling during animal development. BMB 2008 Symposium. 2008. 12. 9-12. Kobe, Japan

Miura, M.: TNF signaling and its physiological roles in *Drosophila*. 12th International TNF conference. 2009.4.26-29 Madrid, Spain

倉永英里奈、殿城亜矢子、三浦正幸: ショウジョウバエを用いたポリグルタミン病へのアプローチ、第50回日本神経学会シンポジウム「ポリグルタミン病への分子生物学的アプローチ」、2009.5.22、仙台

Miura, M.: 26S proteasome determines the onset and severity of age-related neurodegenerative disease. International Symposium on Autophagy and Cell Death. 2009. 7. 4. Tokyo, Japan

三浦正幸: 生体におけるカスパーゼ活性化ダイナミクス 日本アポトーシス研究会学術集会ワークショップ 2009.8.1-2 長崎

倉永英里奈、三浦 正幸: 器官形成に関与する細胞死の生理機能 Imaging Analysis of Cell Death During Organogenesis 高遠シンポジウム、2009.8.27-28、長野

倉永英里奈、三浦正幸: ショウジョウバエを用いた新たなホメオスタシス維持機構の遺伝学的解明 第82回日本生化学会大会シンポジウム、2009.10.21-24、神戸

三浦正幸: 傷害ストレスに関わるショウジョウバエ成体体液のプロテオミクス解析 第82回日本生化学会大会シンポジウム、2009.10.21-24、神戸

三浦正幸: メタボロームによるショウジョウバエストレス応答機構解析 第4回メタボロームシンポジウム、2009.11.18-19、川崎

Miura, M.: Birth and death of the sensory organ precursor cells: a role of programmed cell death in *Drosophila* sensory organ development. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. 2009. 11.29-12.3. Okinawa, Japan

三浦正幸: ショウジョウバエにおけるストレス応答機構のメタボロミクス解析 第32回日本分子生物学会ワークショップ、2009. 12. 9-12. 横浜

倉永英里奈、三浦正幸: ショウジョウバエにおける組織傷害応答と内因性リガンド. 「自然炎症」第1回公開シンポジウム、2010.1.13, 東京

Miura, M.: Roles of programmed cell death signaling in *Drosophila* sensory organ development. International Symposium on “Cell Cycle and Development”. 2010.3.15-17, Kyoto

Kuranaga E., Miura, M.: Genetic analysis of homeostatic maintenance against stressed condition. The Homeostatic Inflammation Symposium I “Deciphering a link between pathogen sensors and inflammatory diseases”, 2010.7.28, Tokyo

Kuranaga E., Miura, M.: Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting, 2010.8.5-9, Albuquerque, New Mexico

Miura, M.: Caspase regulates axon pathfinding and maturation of mouse olfactory neurons. International Symposium on Morphological Sciences. 2010.9.18-22, Taormina, Italy

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takamoto, K., Miura, M.: Physiological significance of apoptosis in early brain development. 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (cosponsor: the Asia-Pacific Developmental Biology Network). Okinawa, Japan, 2011. 5.21

山口良文: マウス脳初期発生過程におけるアポトーシス動態とその生理的意義. 第84回日本生化学会大会シンポジウム、京都、2011. 9.21

Miura, M.: Physiological function of caspases in organogenesis and tissue remodeling. 25th Annual French *Drosophila* Conference. Lyon, France, 2011. 10.17-20

Miura, M.: Active roles of apoptosis during development and tissue homeostasis. UK/Japan Collaborative Symposium, Cancer Research UK, Cambridge, UK, 2012. 2. 9

Miura, M.: Physiological function of cell death in development and tissue remodeling. EMBO Workshop, Ein-Gedi, Israel, 2012. 2. 22

Miura, M.: Physiological roles of cell death signaling in mouse neural development. 第117回日本解剖学会総会シンポジウム、甲府、2012. 3. 26

② 口頭発表 (国内会議 10 件、国際会議 4 件)

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Spatiotemporal patterns of caspase activation during *Drosophila* abdominal epithelial morphogenesis revealed by in vivo imaging analysis. 第41回日本発生物学会 2008.5.28-30 徳島

Takeishi, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Analysis of caspase activation in *Drosophila* during host defense. in The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008.9.7-11 Hyogo, Japan.

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Programmed Cell Death Functions in *Drosophila* Bristle Pattern Formation 第42回日本発生物学会大会 2009. 5. 28-31 新潟

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Is apoptosis required for the regulation of cell number in the early developing brain? -Quantitative analysis of morphological abnormalities in the brain of mice deficient for apoptosis signaling 第42回日本発生物学会大会 2009. 5. 28-31 新潟

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: A Role of Programmed Cell Death in *Drosophila* Bristle Pattern Formation: Appearance and Elimination of the Ectopic Sensory Organ Precursor Cells, The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference. 2009.7.6-8. 掛川

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Cell communication between proliferating cells and dying

cells in abdominal cell replacement during *Drosophila* metamorphosis. The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference. 2009. 7. 6-8. 掛川

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation in developing mouse brain. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. 2009. 10.6-10. New York, USA

武石明佳、倉永英里奈、殿城亜矢子、嘉糠洋陸、三浦正幸: 組織傷害応答機構におけるカスパーゼ経路の関与、Involvement of caspase pathway in the response against tissue injury. 第82回日本生化学会大会 2009. 10. 21-24. 神戸

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Kanuka, H., Miura, M.: The regulation of systemic response *via* caspase pathway to overcome tissue damage. The Tissue Repair & Regeneration Gordon research Conference, New London, NH, USA, 2011. 6. 4-5

Miura, M. The replacement boundary coordinates epidermal remodeling in *Drosophila*. 第63回日本細胞生物学会シンポジウム、札幌、日本、2011.6.27-29

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Hamachi, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Yoshida, H., Kuida, K., Miura, M.: How does apoptosis contribute to brain morphogenesis? 第20回日本 Cell Death 学会学術集会、東京、日本、2011. 7. 29-30

Obata, F., Kuranaga, E., Takeishi, A., Ming, M., Soga, T., Miura, M.: ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* 変異体における飢餓/酸化ストレス応答異常とメタボローム解析. 第84回日本生化学会大会、京都、日本、2011.9.21-24

Ming, M., Kuranaga, E., Obata, F., Miura, M.: Apoptotic deficiency renders abnormal immune activation in the absence of infection. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、日本、2011.12.13-16

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Kanuka, H., Miura, M.: Caspase activity in gut mediates systemic response against tissue damage. 53th Annual *Drosophila* Research Conference, Chicago, USA, 2012. 3. 7-11,

③ ポスター発表 (国内会議 24 件、国際会議 29 件)

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Dynamics of cell death signaling in the sensory organ precursor cell lineage. 49th Annual *Drosophila* Research Conference 2008.4.3-7 San Diego, USA.

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Imaging analysis of the spatiotemporal pattern of caspase activation during epithelial cell sheet replacement. 49th Annual *Drosophila* Research Conference 2008.4.3-7 San Diego, USA.

Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., Miura, M.: Genetic evidence for the involvement of the 26S proteasome in age-related neurodegenerative diseases. 49th Annual *Drosophila* Research Conference 2008.4.3-7 San Diego, USA.

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Study of *Drosophila* bristle pattern formation: Appearance and elimination of the ectopic sensory organ precursor cells. 第41回日本発生生物学会 2008.5.28-30 徳島

Ohsawa, S., Kuida, K., Yoshida H., Miura, M.: A role of the mitochondria-dependent activation of caspases in the development of olfactory sensory neurons. in 第41回日本発生生物学会、2008.5.28-30 徳島

Takeishi, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Live Imaging of caspase activity during wound healing. at The 7th International Cell Death Society Symposium, 2008.6.6-9. Shanghai, China.

Yamaguchi, Y., and Miura, M.: Attempt to monitor caspase activation in the brain by a sensor for activated caspase based on FRET. at The 7th International Cell Death Society Symposium, 2008.6.6-9. Shanghai, China.

Yamaguchi, Y., and Miura, M.: Caspases in the brain. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2008.7.9-11. Tokyo, Japan.

Nonomura, K., Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Takahashi, Y., Kawakami, K., Miura, M.: Persistent expression of electroporated transgenes in mouse cortical mitotic cells and late-born cells. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2008.7.9-11. Tokyo, Japan.

Yoshida, A., Yoshifumi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., Miura, M.: Exploiting the Tol2 transposon system for investigation of glial development in mouse central nervous system. BMB 2008 Symposium. 2008. 12. 9-12. Kobe, Japan

Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., Miura, M.: An effective and convenient method to express transgene by the combination of *in utero* electroporation and the Tol2 transposon system; inducible or cell-type specific expression in glia 日本発生生物学会第42回大会2009. 5. 28-31. 新潟

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Proliferating and dying cell communication during abdominal morphogenesis of *Drosophila*. 日本発生生物学会 第42回大会 2009.5.28-31, 新潟

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Kanuka, H., Miura, M.: Genetic Analysis of Defense Mechanisms against Tissue Injury. The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference. 2009.7.6-8. 掛川

Morimoto, M., Chihara, T., Miura, M.: Caspase activation in developing neurons: evaluation of PARP-Venus, a genetically encoded probe for caspase activation. The 9th *Drosophila* Research Conference, 2009. 7. 6-8. 掛川

Ming, M., Takeishi, A., Kuranaga, E., Miura, M.: *Dapaf-1* mutation elicits innate immune signaling in adults shortly after eclosion. The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference. 2009.7.6-8. 掛川

Kitabayashi, A., Chihara, T., Miura, M.: Identifying neurons with caspase activity in *Drosophila* adult brain. The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference. 2009.7.6-8. 掛川

Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., Miura, M.: Targeted expression of transgene in glial cells by the combination of the Tol2 transposon system and *in utero*

electroporation. 第32回日本神経科学学会大会 2009. 9. 16-18. 名古屋

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Caspase-mediated apoptosis is dispensable for the control of cell number in the early developing brain. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. 2009. 10.6-10. New York, USA

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Coordination of tissue remodeling via caspase activation at the boundary of replacing cells in the abdominal epidermis during *Drosophila* metamorphosis. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. 2009. 10.6-10. New York, USA

Takeishi, A., Erina, K., Tonoki, A., Kanuka, H., Miura, M.: Genetic dissection of tissue injury-induced cell death-related signaling in *Drosophila*. 21st European *Drosophila* Research Conference 2009.11.18-21 Nice, France.

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Temporal regulation of *Drosophila* IAP1 determines the dual functions of caspases in the sensory organ development. 21st European *Drosophila* Research Conference 2009.11.18-21 Nice, France.

Kuranaga, E., Miura, M.: In vivo analysis of cell death signal during reproductive organ development. 21st European *Drosophila* Research Conference 2009.11.18-21 Nice, France.

Yamaguchi, Y., Shinotsuka N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation in morphogenesis. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. 2009. 11.29-12.3. Okinawa, Japan

Shinotsuka, N., Yamaguchi, Y., Takemoto, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis *in vivo* by using transgenic mice expressing a genetically encoded reporter for caspase activation. 第32回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12. 横浜

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Programmed cell death contributes to the spacing pattern formation in *Drosophila*. International Bioresource Symposium “*Drosophila*”, 2010.3.17-18, 2010, Kyoto.

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation during neural tube closure. CDB Symposium, Frontiers in Organogenesis. 2010.3.23-25. Kobe, Japan.

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Spatiotemporal caspase activation coordinates tissue remodeling in the abdominal epithelial replacement of *Drosophila*. The 51st Annual *Drosophila* Research Conference. 2010. 4. 7-11. Washington, DC. , USA

Shinotsuka, N., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Takemoto, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation during neural tube closure by using SCAT3 transgenic mice. 第43回日本発生生物学会大会 2010. 6. 20-23 京都

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Spatio-temporal analysis of spacing pattern formation: Role of programmed cell death in *Drosophila* bristle development 第43回日本発生生物学会大会 2010. 6. 20-23 京都

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Boundary interactions triggering caspase activation coordinate epithelial tissue remodeling in the abdomen of *Drosophila*. 第43回日本発生生物学会大会 2010. 6. 20-23. 京都

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Apoptosis contributes to normal brain development not by restricting cell number but by regulating multiple morphogenetic events. 第43回日本発生生物学会大会 2010. 6. 20-23, 京都

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation reveals that apoptosis is a facilitator of the neural tube closure. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting, 2010.8.5-9. Albuquerque, USA

Yoshida A., Yamaguchi Y., Nonomura K., Kawakami K., Takahashi Y., Miura M.: The combination of in utero electroporation technique and the Tol2 transposon system: an effective and convenient method to introduce transgenes in mammalian CNS. Gordon Research Conferences, Neural Development, 2010. 8. 15-20, Salve Regina Univ., USA

Nakajima, Y., Kuranaga, E., Miura, M.: Competitive interactions trigger caspase activation during epithelial tissue replacement in *Drosophila*. EMBO Workshop, Systems Biology of Development. 2010. 8. 16-20. Ascona, Switzerland

Obata, F., Takeishi, A., Ming, M., Kuranaga, E., Miura, M.: Caspase-mediated tissue damage responses under stressed condition in *Drosophila melanogaster*. International Conference of Immunology. 2010. 8.22-27. Kobe, Japan

Ming, M., Takeishi, A., Kuranaga, E., Miura, M.: "Danger" signaling mediated by soluble factors released from potential tissue damage in *Drosophila* apaf-1 mutants. 14th International Congress of Immunology. 2010. 8. 22-27. Kobe, Japan

Koto, A., Kuranaga, E., Miura, M.: Programmed cell death controls spacing pattern of *Drosophila* sensory bristles. 16th International conference of the International Society of Differentiation. 2010. 11.15018, Nara, Japan

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation reveals that apoptosis is a facilitator of the neural tube closure. 16th International conference of the International Society of Differentiation. 2010. 11.15018, Nara, Japan

Obata, F., Kuranaga, E., Takeishi, A., Ming, M., Soga, T., Miura, M.: Metabolomic analysis of caspase-activation defective mutant in *Drosophila melanogaster*. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010. 12. 7-10 神戸

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Kanuka, H., Miura, M.: Genetic analysis of the cell death signal in the response against tissue injury. 13th International TNF Conference, Hyogo, Japan, 2011. 5. 15-18

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takamoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and neural tube closure by transgenic mice expressing a genetically encoded FRET reporter for caspase activation. 13th International TNF Conference. Hyogo, Japan, 2011. 5. 15-18

Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Shinotsuka N., Yoshida M., Miura M.: Conditional inhibition of caspases for investigating the roles of caspases during late embryonic and postnatal neural development. 13th International TNF Conference. Hyogo, Japan, 2011. 5. 15-18

Ming, M., Kuranaga, E., Miura, M.: Characterization of immune response in *Drosophila* apoptosis-deficient mutants. 13th International TNF Conference. Hyogo, Japan, 2011. 5. 15-18,

Obata, F., Kuranaga, E., Takeishi, A., Ming, M., Soga, T., Miura, M.: Stress response and metabolites of caspase-deficient mutant in *Drosophila*. 13th international TNF Conference. Hyogo, Japan, 2011. 5.15-18.

Shinotsuka, N., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Takemoto, K., Yoshida, A., Miura, M.: Analyzing the role of apoptosis and caspase-activation during neural tube closure by using time-lapse imaging in SCAT3 transgenic mice. 第44回日本発生生物学会沖縄、日本, 2011.5.18-21

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Kuida, K., Miura, M.: Roles of apoptosis during early brain morphogenesis; not restricting cell number, but ensuring the completion of neural tube closure, 第44回発生生物学会大会, 沖縄, 日本, 2011. 5. 18-21

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takamoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and neural tube closure by transgenic mice expressing a genetically encoded FRET reporter for caspase activation. Gordon Research Conference "Tissue repair & regeneration". New London, NH, USA, 2011. 6. 8

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Kuida, K., Miura, M.: Contribution of apoptosis to early brain morphogenesis; not restricting overall cell number, but ensuring the completion of neural tube closure. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 日本, 2011. 9. 14-17

吉田綾子、山口良文、篠塚直美、三浦正幸:神経発生後期におけるカスパーゼの機能解析第 34 回日本神経科学大会、横浜、日本, 2011.9.14-17

Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Shinotsuka, N., Takemoto, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kuida, K., Yoshida, H., Miura, M.: Physiological significance of apoptosis in early brain development. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. New York, USA, 2011. 10.11-15

Obata, F., Kuranaga, E., Takeishi, A., Ming, M., Soga, T., Miura, M.: Stress response and metabolomic analysis in *Drosophila apaf-1* mutant. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. New York, USA, 2011. 10.11-15

Miyazawa H., Yamaguchi Y., Miura M.: Investigating the metabolic change and its relationship to cell death during mouse development. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. New York, USA, 2011. 10.11-15.

Shikada, K., Yamaguchi, Y., Liu, T., Takemoto, K., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuranaga, E., Miura,

M.: Evaluation of SCAT1: a genetically-encoded probe for detecting activation of caspase-1 in living cells. 第34回日本分子生物学会年会横浜、日本、2011. 12. 13-16

(4)受賞・報道等

①受賞

平成21年6月 北里賞(慶應義塾大学)プログラム細胞死シグナルの遺伝学的解明

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

細胞死と非細胞死、カスパーゼが巧妙に制御、三浦・東大教授ら解明

科学新聞 2009.10.23

細胞死・増殖引き起こす酵素、たんぱく増減し制御、東大が解明

日経産業新聞 2009.10.16

酵素が細胞に作用する仕組み、蛍光たんぱくで細かく観察、東大が成功

日刊工業新聞 2009.10.14

カスパーゼが細胞死実行のみならず、細胞骨格制御等の非細胞死機能を発揮するための調節機構として、その抑制因子であるIAPタンパク質の代謝が重要であることを、新たに作製した蛍光プローブを用いた生体イメージングにより明らかにした。細胞死シグナル動態と機能を、生体において単一細胞レベルで解明した初めての報告である。この結果は、2009年10月19日発行の Journal of Cell Biology に掲載され、ハイライトとして紹介された。

細胞死導く遺伝子、神経の形成促す、東大、新たな働きを解明

日経産業新聞 2010.7.16

ほ乳類の嗅神経カスパーゼによって成熟、東大の三浦教授グループ発見、アルツ病関連で注目

科学新聞 2010.7.30

これまで細胞死を引き起こすタンパク質として知られていたカスパーゼが、マウス嗅神経細胞の軸索投射やその成熟過程を制御することを明らかにした。この研究は、ほ乳類神経系において細胞死実行遺伝子カスパーゼの新たな生理機能を明らかにするとともに、カスパーゼによるタンパク質の切断を介した軸索伸長・成熟メカニズムという新たなメカニズムを提唱するものである。

感覚器の触毛、異常な細胞を除去し形成、東大、ショウジョウバエで観察

日経産業新聞 2011.1.28

ショウジョウバエの体毛、一定の間隔で生える、東大が解明、神経前駆細胞に注目

日刊工業新聞 2011.1.28

本研究では、生き物の形づくりの仕組みははじめから厳密に決定されているものではなく、発生の途中段階において様々なエラーが生じていることを生体で捉えることに初めて成功した。この研究によって、一見無駄なく精緻に進行するように見える動物発生が、実はそのプロセスの中には様々なエラーが生じ、しかしそのエラーを除去する仕組みを巧みに発動させて結果的に美しいパターンを持った姿を作っていくという、生き物の柔軟性に富んだ発生の仕組みの一端が解明された。

§ 6 研究期間中の活動(主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2009.9.1	研究の先端にふれる	東大・薬学部	約 30 名	横浜 雙葉高校の生徒に先端の研究の紹介を行った。
2012.9.27-28	New Frontier of Metabolism research in Biomedical Sciences	東大・弥生講堂	約 200 名	代謝研究の最前線を議論する国際シンポジウムを JST の支援を受けて行った。

§ 7 結び

代謝制御研究はこれまでも生化学の分野で盛んに行われてきたが、この研究が発生遺伝学の分野で積極的に行われてきたとはいえない。それは、発生遺伝学の研究に使われるモデル生物は生化学的な研究には向かないことも要因としてあげられる。しかし、近年の代謝産物や蛋白質の分析技術の進歩は驚異的で、これまで難しかった微量サンプルからの分析を可能にした。そして、生体イメージング技術進歩もあいまって、代謝という細胞の基本的な物質基盤制御を基にした研究から、発生や恒常性維持、老化といった細胞社会で生命現象理解へと切り込むことが出来るようになってきた。本研究では、ショウジョウバエとマウスを用いて、発生、恒常性維持、老化現象にかかわるストレス応答を、細胞死シグナルと代謝という観点から研究した。その結果、ストレス応答の新たな生体制御機構と生理機能が明らかになってきた。この成果をふまえ、細胞社会の基本的な維持機構とその破綻による疾患の解明を、細胞死シグナル制御の観点からさらに進めていきたい。

平成 24 年度は本 CREST の最終年度にあたり、私たちの研究グループが中心となり国際シンポジウム“代謝機構制御による生命科学の新たな潮流 (International Symposium: New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences)”を東京大学弥生講堂一条ホールにて 9 月に開催した。代謝制御という視点から見る研究が新たな生命科学の潮流を作り出している現在、その現状と将来の研究展開を見据えた内容のシンポジウムを企画し、国内・外の第一線で活躍する研究者が一同に介しての発表・討論がなされた。コロラド大学から R.C.Murphy 博士による最新の脂質メタボローム解析による脂質酸化の新規メカニズムと動脈硬化に関する詳細な発表があった。ユタ大学からの C.S.Thummel 博士によって、ショウジョウバエ遺伝学とメタボロームを組み合わせた糖尿病モデルの発表があった。HNF4 はヒト若年発症成人型糖尿病 MODY の原因遺伝子の一つとされているが、ショウジョウバエオソログの解析によって、脂質代謝と糖尿病様の表現型発症とを遺伝学的に結びつけて解析することが可能になった。コーネル大学の F. C. Schroeder は線虫を用いたメタボロームと遺伝学を用い、線虫の行動や発生のタイミングを調節する個体間の情報交換に使われる化学信号物質として、一連の ascaroside を同定し、その生合成に関わる遺伝子を同定した。複雑な個体の行動制御を、代謝産物の同定から遺伝子経路の解明へと展開するアプローチはこれからの生物研究の新たな方向性を示すもので大きなインパクトがあった。ハーバード大学からの J. W. Locasale は、近年彼らが解明してきた、エネルギー代謝経路の調節が癌細胞の増殖・生存に果たす役割についてのエレガントな研究を紹介し、さらに胚性幹細胞の生存において 1-carbon 代謝経路が果たす役割について最新の知見を報告した。

日本からは、CREST 代謝研究領域の研究代表者、さきがけ「代謝と機能制御」(研究総括 西島正弘 昭和薬科大学学長)研究代表者に加え、慶應大学の曾我朋義教授の CE-MS による肝疾患解析、同大学の末松誠教授によるイメージングマスマスプロトメトリーによる大腸がん研究、そして同大学の須田年生教授による HIF による代謝スイッチの詳細な解析が発表され、代謝研究の最前線を実感した。本シンポジウムではポスターから選ばれた口頭発表のセッションも企画され、代謝研究の広がりを実感させるものであった。また、会場には多くの大学院生、若手研究者が参加していて、講演に対して活発な議論をする姿が印象的であった。海外からの招待講演者からも日本の代謝研究の広がりやレベルの高さが印象深かったとの感想を聞いており、非常に有意義なシンポジウムであったと思われる。本シンポジウムをサポートくださった JST に感謝しております。

