

Title	Control of the Cell Death Pathway by Dapaf-1, a Drosophila Apaf-1 /CED-4 -Related Caspase Activator
Author(s)	嘉糠, 洋陸
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42662">https://hdl.handle.net/11094/42662</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	嘉 藤 洋 陸
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16024 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Control of the Cell Death Pathway by Dapaf-1, a <i>Drosophila</i> Apaf-1 / CED-4-Related Caspase Activator (ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 Dapaf-1 による細胞死制御機構)
論文審査委員	(主査) 教授 岡野 栄之  (副査) 教授 長田 重一 教授 辻本 賀英

### 論文内容の要旨

細胞死の分子機構をごく大まかに分類すると、カスパーゼ依存性と非依存性の細胞死の二つに分けることが出来る。カスパーゼ (Caspase) は細胞死が実行される際に活性化されるシステインプロテアーゼであり、下流の様々な基質をアスパラギン酸残基の直後で切断することにより、細胞死が完遂するものと考えられている。一般的に“アポトーシス”と呼ばれる細胞死形態では、このカスパーゼに依存する細胞死実行経路が関与しているとされ、実際にカスパーゼの特異的阻害剤で多様な細胞死が効率よく抑制される。このカスパーゼ活性化の初期段階に必要であるのが Apaf-1 / CED-4 ファミリーである。私はこの Apaf-1 / CED-4 ファミリーの分子レベルでの作用機序及び生理機能を解析し、ショウジョウバエをモデル生物として用いることにより、初めて Apaf-1 / CED-4 ファミリーによる細胞死実行機構が進化的に保存された形で中枢神経系の細胞死に必要であることを明らかにし、さらに Apaf-1 / CED-4 ファミリー遺伝子の選択的スプライシングによる新規の Caspase 活性化メカニズムの存在を示唆した (Kanuka et al., PNAS, 1999; Kanuka et al., Molecular Cell, 1999)。

CED-4 は線虫のプログラム細胞死が全く起こらなくなる変異体 (*ced-4* 変異体) から同定され、その遺伝子産物は線虫のカスパーゼである CED-3 を上流で制御するものと予測されていた。線虫の細胞死に必須である CED-4 分子の作用機序さらには進化的に保存された CED-4 の作用を明らかにするため、CED-4 の機能解析をショウジョウバエを用いて行った。その結果、CED-4 は直接結合型の Caspase 活性化因子であること、CED-4 が機能するためには CED-4 内の ATP 結合部位を用いた ATP 加水分解が必要であること、エクジソンによる Caspase の活性化をドミナントネガティブ型 CED-4 (ATP 結合部位での点突然変異導入体) が効果的に抑えることを示した (Kanuka et al., PNAS, 1999)。

Apaf-1 / CED-4 ファミリーの生理機能を遺伝学的に追求する目的で、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から Apaf-1 / CED-4 相同分子の同定を試みた (Kanuka et al., Molecular Cell, 1999)。既に私はドミナントネガティブ型 CED-4 がショウジョウバエでエクジソン依存性のカスパーゼ活性化を抑制することを見出し (Kanuka et al., PNAS, 1999)、ショウジョウバエの生理的細胞死において Apaf-1 / CED-4 様分子が関与していることが示唆されていた。私がクローニングに成功したショウジョウバエ Apaf-1 / CED-4 ホモログ Dapaf-1 は、選択的スプライシングによって二種類の遺伝子産物が翻訳される。一つは Apaf-1 型の Dapaf-1 L、もう一つは WD40 リピートを欠損した CED-4 型である Dapaf-1 S である。この CED-4 / Dapaf-1 S

様の短いフォームは哺乳類 Apaf-1 から同定され (Apaf-1 S)、マウス胎児脳で多く発現していることを確認した。

私が見出した二つの Dapaf-1 アイソフォームをそれぞれショウジョウバエ培養細胞に強制発現することにより、興味深い知見が得られた。Dapaf-1 S はショウジョウバエカスパーゼである DrICE と直接結合し活性化する恒常活性化タイプであり、これは線虫カスパーゼである CED-3 に対する CED-4 の作用様式と同一である。しかし Dapaf-1 L は一度 YVAD 型カスパーゼを活性化することによって、それが下流の DEVD 型カスパーゼを活性化する。Dapaf-1 L はその WD40 リピートによってショウジョウバエ cyt c と結合することから、Dapaf-1 L は哺乳類の Apaf-1 に構造的のみならず機能的にもよく似ていることが判明した。このことから、ショウジョウバエでは線虫・哺乳類の両方のカスパーゼ活性化機構が存在することが明らかになった。これはまた同時に、カスパーゼ活性化システムの CED-4 型→Apaf-1 型 (WD40 リピートの獲得) への、進化の過程を通じての変遷を示唆している。

Dapaf-1 の生理機能を解析する目的で、私は *dapaf-1* ゲノムへの P 因子挿入変異ショウジョウバエを得た。このホモ変異個体では *dapaf-1* の mRNA の発現は確認されず、ホモで生存可能である。このホモ変異体の胚では死細胞の出現頻度が極端に減少するほか、胚抽出液中のカスパーゼ活性が約半分にまで減少していた。また野生型の胚抽出液では観察される dATP/cyt c 依存性のカスパーゼ活性の増加が、*dapaf-1* ホモ胚抽出液では全く起こらなかった。

モデル生物としてのショウジョウバエのメリットの一つは、上流または下流で機能する因子を遺伝学的に同定することが出来る点である。ショウジョウバエでは既に *reaper*、*hid*、*grim* の三つの遺伝子が細胞死の開始において重要であることが知られ、またこれら全ての遺伝子産物が機能するには下流でのカスパーゼの活性化が必要である。これらの遺伝子を複眼で強制発現させると野生型では複眼サイズの顕著な減少が観察されるが、*dapaf-1* ホモ変異体では *reaper* と *grim* の強制発現に関してはその表現型が抑制されることが分かった。これは Reaper と Grim 依存性のカスパーゼ活性化には Dapaf-1 が必要であることを示している。培養細胞における *reaper* の強制発現はミトコンドリアからの cyt c の放出を引き起こすこと、放出された cyt c は WD40 リピートを持つ *dapaf-1* L に結合することから、Reaper から Dapaf-1 へのシグナルの伝達は cyt c が行っている可能性が高い。

*dapaf-1* 欠失によるカスパーゼ活性化の不全はその他にも様々な異常な表現型を引き起こす。*dapaf-1* ホモ変異体の三齢幼虫期の脳では通常観察される死細胞が減少した結果、神経系細胞が増加し顕著な脳の肥大化が観察された。また複眼構成細胞のうち、光受容細胞と考えられる細胞の増加が確認された。また末梢神経器官の一つである背中の外感覚器 (剛毛として観察される) の増加も見られ、この表現型はカスパーゼ阻害タンパク質である P35 の強制発現によっても再現された。つまり、多くの神経系の細胞死において Dapaf-1 依存性のカスパーゼの活性化が必要であることが明らかとなった。

線虫の細胞死の約 80% は神経細胞で起こり、また Apaf-1 のノックアウトマウスではその表現型のほとんどは脳を中心とした神経組織に観察される。つまり Dapaf-1 を含む Apaf-1/CED-4 ファミリーの機能は、進化の過程を通じて神経細胞死の制御にあると推測される。神経発生から神経変性まで多様なステージで観察される神経細胞死のメカニズムを理解する上で、Apaf-1/CED-4 ファミリーの遺伝学的な機能解析の重要性は今後益々高まるものと思われる。現在、Dapaf-1 の上流・下流で機能する新規細胞死調節遺伝子をショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングで同定することを試みており、今後 Dapaf-1 依存性の神経細胞死の意義・及び Dapaf-1 へのシグナル伝達の制御機構を明らかにしたいと考えている。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、生物普遍的に存在するアポトーシス実行機構の解明を目指したものであり、細胞死実行プロテアーゼである Caspase の活性化メカニズムに着目することよりその一端を明らかにした。モデル生物としてショウジョウバエを用いて、Apaf-1/CED-4 ファミリーに属する分子 Dapaf-1 を同定することに成功し、一連の実験結果により Dapaf-1 が Caspase 活性化因子であることを明らかにした。さらに *dapaf-1* 遺伝子からはスプライシングに

より二つの遺伝子産物が翻訳され (Dapaf-1 L と Dapaf-1 S)、Dapaf-1 S は恒常活性化型、Dapaf-1 L はシトクローム c 依存性の latent 型であること、またそれぞれ活性化する Caspase も異なることも示した。またショウジョウバエ *dapaf-1* 変異体では初期胚・脳における細胞死が減少しており、主に神経系組織で細胞数の増加を伴う表現型を見出した。また Dapaf-1 はシトクローム c を中間シグナルとして Reaper や Grim の下流で機能していることも示した。本論文により明らかになったこれらの一連の事実は、アポトーシスのメインマシナリーの共通性・保存性を世界に先駆けて示すものであり、学位を授与するに十分に値すると判断された。