The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway
Author(s)	井垣, 達吏
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43829
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏　　名	井垣達史（いがき たつし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17571　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. （ショウジョウバエ TNF ファミリー分子 Eiger は、JNK 経路の活性化を介して細胞死を誘導する）
論文審査委員	（主査） 教　授　内山　安男 （副査） 教　授　長田　重一　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

［目的］

多細胞生物は、生体にとって不必要な細胞や傷害を受けた細胞を積極的な細胞死プログラムによって取り除く。また、この細胞死機構の破綻は、癌や自己免疫疾患、神経変性疾患などの発症に密接に関連していることから、その分子機構の解明は、生物学のみならず社会的にも重要な課題となっている。近年、細胞死の分子機構に関する研究が急速に発展し、その実行に関わる分子が多数同定されたことにより、細胞死プロテアーゼ caspase の活性化を中心とした細胞死機構の大枠が明らかとなってきた。しかしながら、これまで明らかにされてきた多くの機構は培養細胞レベルで証明されたものであり、実際に生体内で引き起こされる細胞死の実行機構やその制御機構については不明な点が多い。また、これまで研究されてきた caspase の活性化を介した細胞死機構だけでは説明できない未知の細胞死機構の存在も数多く証明されはじめている。これらの背景をふまえ、本研究は、細胞死の制御機構を生体レベルで遺伝学的に明らかにすることを目的とした。本目的を達成するため、個体レベルでの解析が容易で、なおかつ強力な遺伝学を利用できるショウジョウバエをモデル生物として選定した。まず、ショウジョウバエを用いた大規模な *in vivo* 異所発現スクリーニングを行い、生体内で機能する細胞死誘導因子を網羅的に同定することを第一段階の目的とした。本論文は、このスクリーニングの課程で同定された新規 TNF ファミリー分子 Eiger についての遺伝学的、及び生化学的解析結果を報告するものである。

［方法ならびに成績］

ショウジョウバエゲノム上の任意の遺伝子を複眼特異的に強制発現させ、複眼サイズの縮小を指標に細胞死誘導因子を網羅的にスクリーニングした。まず、一連のショウジョウバエ異所発現系統である GS 系統（転写因子 GAL4 の標的配列である UAS エンハンサーを含む P element ベクター（GS ベクター）をゲノム中にランダムに挿入した系統）と、ショウジョウバエ複眼特異的に GAL4 を発現する GMR-GAL4 系統とを交配し、F1 の複眼の表現型を解析した。5000 系統の GS 系統をスクリーニングした結果、F1 の複眼が顕著に縮小する 6 系統を同定した（Regg1-6 系統と命名）。Inverse PCR 法により GS ベクター挿入部位を解析した結果、Regg1 及び Regg6 においては GS ベクターがほぼ同一部位に挿入されており、その近傍に Tumor Necrosis Factor (TNF) homology domain をもち、EDA

(Ectodermal dysplasia) に類似の新規蛋白質をコードする遺伝子を同定し、Eiger (EDA-1ike cell death trigger) と命名した。RT-PCR 解析、及び Eiger の inverted repeat コンストラクトを用いた in vivo RNAi により、Eiger が Regg1 の責任遺伝子であることを証明した。さらに、Eiger トランスジェニックフライを作製し、Regg1 及び Regg6 の表現型が再現できることを確認した。一方、アクリジンオレンジ染色により、Regg1 における複眼サイズの縮小は過剰な細胞死によって引き起こされていることが分かった。ショウジョウバエ S2 細胞を用いた解析により、Eiger は TNF homology domain が存在する C 末端領域を細胞外にもつII型膜蛋白質であることが分かった。

Eiger によって誘導される細胞死の分子機構を明らかにするため、Regg1 系統と各種細胞死関連遺伝子との遺伝学的相互作用を解析した。その結果、Eiger により誘導される細胞死は caspase の活性化を必要とせず、ショウジョウバエ Inhibitor-of-apoptosis protein 1 (DIAP1) によって強く抑制されることが分かった。さらに、Eiger による細胞死は JNK (Jun N-terminal kinase) 経路に完全に依存しており、Misshapen (MAPKKKK)、dTAK1 (JNKKK)、Hemipterous (JNKK)、Basket (JNK) によってそのシグナルが伝達されていることが分かった。ショウジョウバエ JNK 経路の標的遺伝子の一つである *puckered* のエンハンサートラップ系統 (*puc-LacZ* 系統) を用いた解析、及び抗リン酸化 JNK 抗体を用いた生化学的な解析により、Eiger は実際に生体内で JNK 経路を強く活性化することが分かった。

in situ hybridization 法により *eiger* mRNA の発現パターンを解析した結果、*eiger* は胚発生期において神経系に強く発現していることが分かった。また、三齢幼虫期においては、brain hemisphere 及び複眼原基の posterior region において強く発現していた。一方、Regg1 系統に挿入されていた GS ベクターをトランスポゼースにより再度除去し、その過程で近傍ゲノムの一部が欠失した個体をスクリーニングすることにより、*eiger* の機能欠失変異アリルを作製した。*puc-LacZ* アリルを用いて内在性の JNK 活性を解析した結果、*eiger* ホモ変異体の複眼原基 posterior region において、JNK 活性が顕著に低下していることが分かった。以上の結果から、Eiger はショウジョウバエ JNK 経路の生理的なリガンドとして機能していることが明らかとなった。

[総括]

本研究において、無脊椎動物で初めての TNF ファミリー分子 Eiger の同定に成功し、その生理機能を明らかにした。Eiger はショウジョウバエゲノム上に存在する唯一の TNF ファミリー分子であり、その発現パターンは神経系に限局している。従って、今後の *eiger* 変異体の詳細な解析により、TNF ファミリー分子の神経系における役割、さらには、進化的に保存された未知の生理機能が明らかにされることが期待される。また、Eiger トランスジェニックフライを利用した Eiger の下流因子の遺伝学的スクリーニングを行うことにより、近年注目されている JNK 経路依存的、なおかつ caspase 非依存的な細胞死の分子機構が解明されていくことが期待される。本研究成果は、生体レベルでの細胞死制御機構の解明のための基礎を築くと同時に、細胞死研究全体にも大きなインパクトをもたらすものであると考える。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ショウジョウバエ生体内で機能し得る細胞死誘導因子を網羅的に探索した研究である。この目的で、ショウジョウバエ遺伝学を利用して、in vivo 異所発現スクリーニングを施行した結果、ショウジョウバエの TNF ファミリー分子、Eiger を同定した。Eiger は無脊推動物で初めて同定された細胞死を誘導し得るリガンド分子である。遺伝学的、生化学的解析により、Eiger は caspase 活性に依存しない新規の細胞死経路を介して細胞死を誘導すること、また、この細胞死は、ストレスキナーゼカスケードとして知られる JNK 経路を介して引き起こされることが明らかになった。Eiger の生理的役割を解明するため、mRNA の発現パターンを解析した結果、神経系に特異的な発現を示すこと、また、Eiger の機能欠失型変異ショウジョウバエを作製した所、複眼原基で内在性 JNK 活性が顕著に低下し、同分子は JNK 経路の生理的なリガンドとして機能していることも明らかになった。

本研究は、生体レベルでの細胞死制御機構を明らかにしていくための基礎を築くと同時に、今後、Eiger の未知の生理機能も含め、神経系における役割や近年注目されている JNK 経路依存的、caspase 非依存的な細胞死の分子機構を解明する上で重要な位置を占めることが示唆され、学位に値するものと考える。