The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila
Author(s)	倉永, 英里奈
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45288
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	倉　永　英里奈（くら　なが　えり　な）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　18429　号
学位授与年月日	平成16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	Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila* （Reaper によるショウジョウバエ IAP1 の分解は TRAF 依存的な JNK の活性化を促進する）
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

多細胞生物の発生過程では、多くの細胞が細胞死により取り除かれる。進化的に保存された細胞死メカニズムとして、カスパーゼと呼ばれるプロテアーゼの活性化が細胞死の実行に中心的な役割を果たすことが知られている。線虫やショウジョウバエでは細胞死が観察されない変異体が数多く同定され、細胞死の遺伝的制御機構の理解に大きく貢献してきた。Reaper（死神）と名付けられた、ショウジョウバエで最初に発見された強力な細胞死誘導因子は、死ぬ直前の細胞で特異的に発現しカスパーゼを活性化して細胞死を誘導する。Reaper の欠失変異体では幼虫期の脳における神経芽細胞数が野生型よりも増加すること、さらには胚の細胞死を伴う形態形成に必要な転写因子のターゲットであることが報告され、Reaper が発生過程での細胞死調節に重要な役割を果たしていることが示された。興味深いことに Reaper の発現誘導は発生過程に特有なものではなく、ショウジョウバエ胚への放射線照射によっても観察される。つまり Reaper 依存性のシグナル経路を知ることは、様々な刺激による細胞死の実行メカニズムを知る為の非常に有効な手段であると考えられる。そこで我々は Reaper の作用機序に含まれる細胞死制御因子を同定する目的で、遺伝学的なスクリーニングを行った。

【方法ならびに成績】

本研究では loss of function（機能欠失）スクリーニングと呼ばれる方法を採択した。ショウジョウバエでは染色体に欠失を持った系統が数多く系統化されており、約 200 系統で全ゲノムの 70%以上をカバーする染色体欠失系統のコレクションが既に存在する。一方、複眼特異的なプロモーター（GMR）で Reaper を発現させると、細胞死を伴う複眼の潰れた系統（GMR-Reaper）ができる。この GMR-Reaper のハエと染色体欠失系統のコレクションを交配して、生まれた次世代の複眼を観察する。もし染色体の欠失領域に Reaper による細胞死に必要な遺伝子が含まれていれば、潰れた眼は回復するはずである。次に、一次スクリーニングによって得られた領域と重なる欠失領域を持つ系統を掛け合わせて、原因遺伝子の含まれる領域を狭めていく（二次スクリーニング）。最後に、狭めた領域に存在する単一遺伝子の変異体系統と Reaper 発現系統を交配させ、複眼の回復を指標に原因遺伝子を特定する。

この方法で得られた遺伝子の一つが TRAF ファミリーに属する遺伝子 DTRAF1 であった。TRAF ファミリーは TNF 受容体の下流でシグナルを伝える分子として解析がなされており、ほ乳類の TRAF2 は細胞へのストレス刺激を

受けてストレスキナーゼであるJNKを活性化する。その際にはASK1というキナーゼがTRAF2からJNKへのシグナルの受け渡しに必要とされている。一方今回のスクリーニングによって、ショウジョウバエ ASK1（DASK1）もReaper による細胞死に関与する遺伝子として同定された。詳細な解析の結果、DASK1 はほ乳類の ASK1 同様にDTRAF1により活性化されてJNKを活性化する機能を持つこと、JNKシグナルを抑制することでReaperによる細胞死が抑えられることが明らかになり、TRAF-ASK1-JNK というカスケードが進化的に保存された形で細胞死に関与していることが示された。

それでは、Reaperはどうやってこのカスケードを活性化しているのだろうか？ Reaperは65個のアミノ酸で構成された小さな蛋白質であり、特徴的なドメインやモチーフも無く、DTRAF1、DASK1、JNKいずれとの結合も観察されなかった。そこでReaperによるJNK経路の活性化メカニズムを解明するために、唯一報告されているReaperに結合する蛋白質DIAP1に着目した。細胞死抑制蛋白質IAPファミリーはカスパーゼに結合してその活性を抑制する機能をもつ一方で、ユビキチンリガーゼ（E3）として基質蛋白質の分解を促進する機能も持っている。ショウジョウバエの複眼や培養細胞を用いた実験から、DTRAF1により誘導される細胞死とJNKの活性化がDIAP1によって抑制されること、さらにはその際に DTRAF1 の蛋白質が著しく減少するという結果が得られた。DIAP1 によるDTRAF1 蛋白質減少のメカニズムを明らかにするために、培養細胞を用いてユビキチン化検定を行ったところ、DTRAF1はDIAP1の基質としてユビキチン付加・分解されることが明らかになった。さらに、Reaperの発現によりDIAP1の分解が促進されることも示された。最終的に、DIAP1によるDTRAF1の分解はReaperによりDIAP1が分解されることでキャンセルされ、DTRAF1の発現維持を促してJNKを活性化するという結果を得た。このことから、通常細胞内ではDTRAF1がDIAP1に分解されることによって細胞死シグナルを抑制しているが、Reaperという細胞死刺激によってDIAP1が自己分解を引き起こしてDTRAF1が安定化され、細胞死シグナルを活性化していると考えられた。

【総括】

今回の研究は、蛋白質の分解による細胞内細胞死シグナル調節を示したもので、この機構が様々な細胞死誘導刺激によって活性化され、細胞の生死の選択を調節する可能性を示唆するものであると考えている。

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制御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、ショウジョウバエの細胞死実行因子であるReaperによる細胞死経路に関わる遺伝子のスクリーニングを施行した結果、JNK経路を活性化する機能を持つショウジョウバエのTRAFファミリーであるDTRAF1とMAPKKKであるDASK1を、Reaperの細胞死誘導活性に関与する因子として同定した。さらに、DTRAF1、DASK1を介したJNKの活性化がどのようにしてReaperに制御されているのか知るために遺伝学的、生化学的解析を行った結果、(1)DTRAF1による細胞死誘導とJNKの活性化はDIAP1により抑制され、その抑制はE3ユビキチンリガーゼ活性をもつDIAP1によるDTRAF1の分解に依存していること、(2)Reaperの発現でDIAP1は自己ユビキチン化が亢進して分解されるため、DTRAF1が安定化してJNKカスケードの活性化が見られることが明らかとなった。

本研究はタンパク質の分解による細胞内細胞死シグナル調節を示したもので、この機構が様々な細胞死誘導刺激によって活性化され、細胞の生死の選択を調節する可能性を示唆するものである。よって本研究が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上で重要な位置を示すことが示唆され、学位に値するものと考える。