



Title	Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects
Author(s)	竹本, 研
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45349
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

氏 名	たけもと きわむ 竹 本 研
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 4 3 0 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	Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects (生きた細胞におけるカスパーゼの時空間的活性化機構の解析)
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〕

発生過程の個体では時空間的な系列に従い、様々なイベント（個々の細胞における増殖・分化・細胞死等）が誘導され成体へと成長する。プログラム細胞死は遺伝学的に制御された計画的な細胞死であり、多くの発生過程の多細胞生物で認められる現象である。カスパーゼ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限定分解することにより、細胞死を完遂する。カスパーゼファミリーであるカスパーゼ-3やカスパーゼ-9のノックアウトマウスでは細胞死を主たる原因と考えられる、大脳皮質における異常肥厚、視床・視床下部の形成異常や第三脳室の閉鎖など、中枢神経系に表現型が強く認められる。また、カスパーゼの活性化因子である Apaf-1 のノックアウトマウスでも類似した表現型が報告されており、これらのカスパーゼの活性化は発生過程における重要なイベントの一つであると考えられる。よって個体の発生過程におけるカスパーゼ活性化の時空間的制御機構やその発生学的な意義を解明することは、細胞死研究だけでなく発生学上非常に重要であると考えられる。生体内の分子機能を解析するための強力な手段として蛍光蛋白質を用いた FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を利用する方法が注目されている。FRET を利用することで優れた時間・空間的分解能をもって分子の解析ができる。本研究では、個体レベルでのカスパーゼの生理機能の解析を可能にする、FRET を利用した新規カスパーゼ indicator の開発を行う。さらに、生きた細胞においてカスパーゼ活性化の時空間的な制御機構を明らかにする事を目的とする。

〔方法並びに成績〕

リアルタイムに蛋白質の動態を解析する際、時間・空間分解能が重要となる。そこで私は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したシステムの開発に取り組んだ。これまで、FRET を用いた活性型カスパーゼ indicator が報告されている。それらは FRET の donor に ECFP を、acceptor に EYFP を使い、両分子間にカスパーゼの至適切断配列を含むリンカー配列を挿入している。しかしながら、これらは proton や chloride イオンに高い感受性を示す EYFP を FRET アクセプターに採用している。よってカスパーゼに起因しない偽シグナルを検出することが推測され、特に *in vivo* における応用は限界があると考えられる。私はこれらを克服するために、活性型カスパーゼに対する新規

indicator「SCAT」を開発した。SCATはFRETアクセプターにVenusを用いることで*in vitro*においてproton、chlorideイオンに対し高い安定性を示した。さらに、HeLa細胞においても、SCATはECFP-EYFPペアに対して偽シグナルに対し高い抵抗性を示した。また、ECFP-EYFPペアにおけるカスパーゼ非依存的なFRETの部分的な解消はEYFPの不活性化によるものであり、Venusを採用することで高い安定性が得られることが明らかになった。

私はさらに、カスパーゼの時空間的な活性化パターンを解析するために、TNF α 処理時のHeLa細胞においてSCATを用いたリアルタイムイメージング解析を行った。SCAT3では、細胞死時の形態変化に先立ち10分以内に活性化が終了した。また、SCAT3を核に特異的に発現させ核内の活性化を解析したところ、核の形態変化に先行して核内でカスパーゼ3が活性化することを見いだした。また、カスパーゼ-3の活性化は刺激の種類や濃度によらず、すべてall-or-noneのパターンで起こることが明らかになった。

さらに、カスパーゼが示すall-or-noneの活性化パターンが如何にして制御されているかを解析するために、IAPファミリー蛋白質に着目した。IAP蛋白質は活性化カスパーゼに結合することが知られているが、実際に生理的状況下においてカスパーゼの活性調節に機能しているかは不明である。そこで、内在性のIAP蛋白質の機能を阻害し、カスパーゼ-3の活性化パターンを解析したところ、早い活性化以前に遅い活性化パターンが認められた。このことから、内在性のIAP蛋白質はカスパーゼ活性化パターンを制御していると考えられた。

[総括]

本研究では、新規カスパーゼindicatorを開発し、生きた細胞レベルでのカスパーゼ活性化パターンの制御機構を明らかにした。今後このindicatorは個体レベルでのカスパーゼ活性化パターンを解析する際に、強力なツールになるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者は、細胞死実行因子カスパーゼ3を生きた細胞で時空間的に観察するためにFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を利用した新規indicatorの開発、並びに培養細胞におけるカスパーゼ3の活性化パターンの解析を行った。申請者は*in vivo*での使用を見据え、FRETアクセプターにプロトン・クロライドイオンに非感受性のVenusを採用することで、これら環境因子に耐性の新規indicator、SCAT3を開発した。これにより、生細胞内において従来型のECFP-EYFPペアが検出するカスパーゼに起因しない偽シグナルに耐性なindicatorを開発することに成功した。また申請者はSCAT3を用いて、生細胞内における細胞死誘導時のカスパーゼ3の活性化パターンを明らかにした。カスパーゼ3活性化は細胞質から核へと伝播すること、さらに核内における活性化は、細胞死の際に観察される核の形態変化に先立って起こることを明らかにした。またFRETの解消はall-or noneのパターンをとること、さらにこのパターンは内在性IAPファミリー蛋白質により制御されていることを明らかにした。本研究は、これまで明らかでなかった生細胞内におけるカスパーゼ3活性化パターンに関する重要な知見を与えるだけでなく、生体レベルでの解析を初めて可能にする技術の開発に寄与するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。