



Title	アポトーシス実行因子カスパーゼの分子機序と生体における生理的役割の解明ー可視化技術の確立と新規モデル動物の作製ー
Author(s)	小南, 勝也
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69672
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 （ 小 南 勝 也 ）	
論文題名	アポトーシス実行因子カスパーゼの分子機序と生体における生理的役割の解明 ー可視化技術の確立と新規モデル動物の作製ー
論文内容の要旨 細胞死（アポトーシス）は、発生過程の形態形成や器官形成において、あるいは成体の恒常性維持等に重要な役割を果たしている。哺乳類では2通りのアポトーシスのシグナル伝達経路が知られており、1つはFasなどのデスレセプターがそのリガンドと結合して起こる“外因性経路”であり、もう1つはDNA損傷などによりミトコンドリアよりシトクロムCが流出して起こる“内因性経路”である。どちらの経路においても“カスパーゼ（caspase）”と呼ばれるシステインプロテアーゼが実行因子として働いている。カスパーゼは非活性化型として細胞内に存在するが、一度アポトーシスのシグナルが入るとイニシエーターカスパーゼが自己活性化し、エフェクターカスパーゼを切断・活性化するというカスパーゼカスケードが存在する。そして最終的にエフェクターカスパーゼが400種を超えるタンパク質を基質として切断することにより、細胞が死に逝く。Fasを介する外因性アポトーシス誘導シグナルは、イニシエーターカスパーゼのcaspase-8の下流において、さらに経路が2つに分かれることが知られている。一つは、caspase-8が直接エフェクターカスパーゼのcaspase-3を活性化するtype 1経路であり、もう一つは、caspase-8がBcl-2ファミリー分子のBidを切断し内因性経路を活性化するType 2経路である。がん細胞に対する増殖抑制効果が薬剤と細胞腫によって異なるとの報告があるが、これはこのアポトーシス経路の違いを反映している可能性がある。つまり、抗がん剤効果がFasの細胞内シグナル伝達選択と関連すると推測される。このように、カスパーゼカスケードの詳細を検討することは、細胞死を人為的に制御する上で重要であり、特にcaspase-8のFasに依存した活性化をその後の活性化と識別することは有意義である。 本研究では、カスパーゼ活性の可視化を通じてその活性化機序について検討した。今回、FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer、蛍光共鳴エネルギー移動）を用いたタイムラプスイメージングの系を確立し、さらにdual-FRET systemおよびそのモニター分子CYR83を開発した。これらを活用することで、caspase-8の活性化とその下流のカスケードを1細胞で可視化することを可能にした。ヒト由来の培養細胞であるHeLa細胞では、Fas刺激のアポトーシス時におけるcaspase-8の活性が、caspase-3の活性化前後で起こり、それらの活性パターンに違いがあることを認めた。この二つの異なる活性を時系列的に識別可能となったことから、caspase-8の1段階目の活性はFas刺激によるレセプターからの直接的な活性化であること、2段階目の活性はエフェクターカスパーゼのcaspase-6を介したポジティブフィードバックループが関与することを明らかにすることができた。 実験的にcaspase-8の2段階の活性を捕捉し記録できたことから、次にcaspase-8の活性化とその下流のシグナル伝達経路をシミュレーションするために数理モデルを構築し、実測データと比較検討した。シグナルの強さを数値として表記するには、数理モデルから割り出すことが有効であるが、数理モデル自身も確からしさを検証する必要があるため、実験データと整合したものではない。そこで、カスパーゼカスケードを人為的に操作した実測データと数理モデルでシミュレーションした結果と照合しながら、数理モデルを補正してその信頼性を高めた。Type2細胞の場合、Bidを介して内因性経路を惹起することが知られていたため、RNA干渉法によりBidを欠失したHeLa細胞を作製した。この細胞では、モニター分子を使った解析から、Bid を無くしてもcaspase-8の活性はコントロールの細胞と差がないが、caspase-3の活性化には影響があることが判明し、両カスパーゼの活性化パターンは数理モデルでシミュレーションした結果と一致した。また、外から過剰に導入したcaspase-8を活性化の方向に導くと、caspase-8の酵素活性が瞬時に増大することを認めたが、この点についても数理モデルが予測した結果と一致した。さらに、caspase-6を欠失させたことによるポジティブフィードバックループの消失がcaspase-8の活性に及ぼす影響を調べた。モニター分子を使った実験では、明らかに2段階目の活性が低下していることが判明したが、この変動パターンも数理モデルにおいて予測可能であった。このように、本研究で構築した数理モデルは実際のデータと合致するもので、完成度が高いモデルであることが確認できた。このモデルを用いて、さらにFas誘導アポトーシスにおけるcaspase-8の初期活性化濃度を算出し、1細胞中の全caspase-8量の0.2%が活性化型に変換したことを突き止めた。本研究で用いた時空間的なカスパーゼ活性測定と数理モデルを用いることにより、より詳細なアポトーシスのカスパーゼカスケードの解析が可能となり、今後より	

正確なアポトーシスシグナル伝達経路や、ひいては細胞の違いによる薬剤の効果の違いに対する理解に役立つものと期待される。

指の形成や両生類の変態時の尾の退行など、アポトーシスが関わる現象は発生時にも観察される。**caspase-8**のノックアウトマウスは、胚発生途中で卵黄嚢や心臓からの出血が起きて死亡することから、胚発生においても**caspase-8**が何らかの役割を担っている可能性が考えられた。しかし、このマウスを使ったアポトーシスに関する解析は、母胎の胚を解析せねばならず、継時的な観察が困難である。一方、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、実験発生学の分野で広く利用されている研究材料であり、胚発生時に外からの観察が容易であり、またDNAやmRNA等のマイクロインジェクションも容易であることから、導入した遺伝子産物の効果を調べることが可能であるという幾つかの利点がある。本研究では、アポトーシス実行因子の胚発生における生理的役割を理解するため、まず*Xenopus*からアポトーシス関連因子Bid、および**caspase-10**に相同な**caspase-10β**を新たに単離した。さらに、活性型**caspase-3**の検出用モニター分子 (SCAT3) を発現したトランスジェニックカエルも樹立した。今回単離したxBidおよびxCaspase-10βは、ヒト培養細胞に導入するとアポトーシスをそれぞれ誘導した。またxCaspase-10βは、*Xenopus*およびヒト由来のアダプター分子のFADDと相互作用することを認めた。一方、xBidについてはアポトーシス誘導時にミトコンドリアへ移行することを確認した。明らかに、xCaspase-10βとxBidはヒトの分子と同様な性質を有していた。また、xBidおよびxCaspase-10βのmRNAをカエル受精卵へ導入すると、発生が進んだ胚で細胞死が起きることを確認した。さらに樹立したSCAT3トランスジェニックカエルの受精卵を使って、活性型のxBidのmRNAを導入すると、SCAT3の切断が認められており、細胞死が起きた胚では**caspase-3**が活性化していることを示唆した。これらのことより、単離したxBidおよびxCaspase-10βは、機能分子であると結論付けた。さらに、SCAT3トランスジェニックカエルを使って変態時期に観察される細胞死について調べたところ、オタマジャクシの尾でSCAT3のFRETの変動を捉えることができ、細胞死が盛んに起きている尾の先端側でFRETの変動が大きいことが分かった。FRETの変動は**caspase-3**の活性と連動していることから、プログラムされた細胞死と云われている尾の退縮が**caspase-3**の活性化を伴うことが明確となった。以上のことより、SCAT3トランスジェニックカエルは、**caspase-3**の活性を検出するのに有効なモデル動物となり、今後この動物とアポトーシス関連遺伝子を用いることで、発生時に見られるアポトーシスの解析、並びに生体における**caspase-3**を含めたカスパーゼの生理的役割の解明が進むと考えている。

以上、本研究を進めることにより、**caspase-8**の活性化を伴う外因性経路において、アポトーシス誘導シグナルの伝達の仕方を克明にした。また、アフリカツメガエルを研究材料に用いることにより、哺乳類だけでなく両生類においてもアポトーシス実行因子のカスパーゼやBidが機能分子として進化的に保存されていること、胚発生におけるアポトーシスを観察する上でアフリカツメガエルがモデル動物として有用であることを示した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小南 勝也)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 水口 裕之
	副 査	教 授 橋本 均
	副 査	教 授 藤尾 慈

論文審査の結果の要旨

アポトーシスは、発生過程における形態形成や器官形成、あるいは成体の恒常性維持等に重要な役割を果たしている。アポトーシスの実行因子であるカスパーゼは、通常非活性型で細胞内に存在するが、一度アポトーシスのシグナルが入るとイニシエーターカスパーゼが自己活性化し、エフェクターカスパーゼを切断・活性化するというカスパーゼカスケードを通じて細胞死がおこる。カスパーゼカスケードのフィードバック効果については未だ不確定であり、またカスケードにより細胞増殖抑制に効果的な薬剤が違ふとの報告がある。カスパーゼカスケードの詳細を検討することは学問的にも、また抗がん剤開発等の応用面でも重要である。これまでは主に細胞集団を扱った生化学的な手法を用いての解析であり、アポトーシス実行時に起こる細胞内の変化を単一細胞で刻々と追跡することは困難であった。そこで申請者は、FRETを用いたタイムラプスイメージングの系を1細胞レベルで発展させること、さらに実測値と合致する数理モデルを構築することに取り組み、以下の結果を得た。

(1) FRETの原理を応用したモニター分子とリアルタイムイメージングの系を用いて **caspase-8** と **caspase-3** の2種類のカスパーゼの活性を1細胞単位で同時に観察する系を開発し、デスレセプター刺激を介して起きる **caspase-8** の初期活性化と、その後のポジティブフィードバックループによる **caspase-8** の活性化を識別かつ定量可能にした。

(2) 実験的データと合致する数理モデルを構築し、数理モデルから **HeLa** 細胞で活性化に必要な **caspase-8** と **caspase-3** の量を算出した。

さらに発生過程におけるアポトーシスの詳細な解析はマウスでは困難であるため、申請者はアフリカツメガエル *Xenopus laevis* に注目し、アポトーシス関連因子を単離し、さらにアポトーシスのモニター分子を発現するトランスジェニックカエルの樹立に取り組み、以下の結果を得た。

(3) 胚発生過程で観察されるアポトーシスを解析するため、*Xenopus* からアポトーシス関連遺伝子を単離し、その遺伝子産物のアポトーシス誘導能を特定した。また樹立した **SCAT3** トランスジェニックカエルは、アポトーシス検出用のモデル動物として適していることを認めた。

以上、本研究では可視化技術の確立を中心としたアポトーシス実行因子カスパーゼの分子機序ならびに新規モデル動物の作製を行った。今後、本研究はアポトーシスならびにカスパーゼの生理的役割の解明に貢献するものと期待されることから、極めて意義深く、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。