

審査の結果の要旨

氏名 藤澤 侑也

学位申請者は、組織閉鎖に対するアポトーシス経路の制御機能とその分子機序に迫るため、遺伝学的研究に優れたキョウジョウバエを用いた。ショウジョウバエの発生では、蛹期に胸部閉鎖(**thorax closure**)という現象が起こる。**thorax closure**を伴う胸部上皮の形成過程は、共焦点顕微鏡を用いて、正常発生を乱すことなく、細胞レベルで生体イメージングすることができる。また、申請者は体内に色素や阻害剤を注入することにより、染色や薬理実験ができる点でも解析に有用な系であると考えた。本論文では、**thorax closure**期とその後の発生期において、アポトーシス経路が関わる上皮細胞運動の制御機能と分子機序を研究した。

まず、Gal4/UAS システムにより微弱な活性が検出可能な CaspaseTRACKER(以下、CasT)を用いて **thorax closure** 期の **caspase3** 活性を調べた結果、**thorax** が融合する先端細胞で活性化を観察した。驚いたことに、CasT⁺細胞は 6 時間以上経過しても上皮から消失せず、核の断片化などのアポトーシス時に見られる特徴を示さないことが分かった。このような非アポトーシス性の **caspase3** 活性の普遍性を調べるため、組織閉鎖と多くの共通点を持つ **wound closure** を上皮の焼灼により誘導した結果、**wound closure** の先端(創縁)部分でも細胞死に至らない **caspase3** 活性化細胞が出現することを確認した。次に、**closure** に伴う非アポトーシス性のカスパーゼ活性化の機能に迫るため、組織の閉鎖速度に対する影響を調べた。アポトーシス経路を遺伝学的に阻害した結果、**thorax closure** では、**caspase3** の阻害因子 **p35** または **caspase9(Dronc)** のドミナントネガティブの強制発現により速度の上昇が観察された。その一方で、**wound closure** では **p35** により速度の上昇は見られず、**Diap1** の強制発現や **Dronc-RNAi** により速度の上昇が観察された。以上の結果から、**thorax closure** は **caspase3** あるいは **Dronc** により、**wound closure** は **Dronc** により、それぞれ速度が抑制的に制御されていることが示唆された。実験を進める上での簡便性から、**wound closure** におけるカスパーゼの活性化による作用を解析した。先行研究から、非アポトーシス性カスパーゼ活性の骨格系に対する作用を仮定し、

創縁部分でのミオシン II の動態を解析した結果、**Dronc** の阻害によりミオシン II の量が増加することを明らかにした。以上から、アポトーシス経路による **wound closure** の遅延は、ミオシン II 量の低下を介して制御されることが示唆された。

thorax closure により地続きになった上皮では、正中線に向かい機械的なストレスが生じた結果、正中線付近の領域(以下、**M 領域**)において高頻度に細胞が脱落する。アポトーシス経路の阻害個体では、細胞の脱落が抑制され、成虫期の **M 領域** が拡大する表現型(以下、**broaded phenotype**)を示したことから、アポトーシス経路は細胞の脱落を介して **M 領域** の最終的なサイズを制御していることを確認した。アポトーシス経路の活性化に関わる制御因子を探すため、細胞死、メカノセンシング、細胞骨格、酸化ストレスに関わる遺伝子の過剰発現または **RNAi** 系統を用いて遺伝学的なスクリーニングを行った。具体的には、**broaded phenotype** を指標に候補を選別し、次に蛹期のイメージングにより遺伝子を絞り込んだ。その結果、**NADPH** オキシダーゼの **RNAi** により細胞の脱落が抑制されることが分かった。**NADPH** オキシダーゼは細胞膜や **ER** 膜上に存在し、**NADPH** からの電子を O_2 に受け渡すことで活性酸素種(**ROS**)の一種 **superoxide**($O_2^{\cdot-}$)の産生に関わる。 $O_2^{\cdot-}$ を消去するスーパーオキシドジスムターゼ(**Sod**)の過剰発現によっても細胞の脱落は抑制されたため、**NADPH** オキシダーゼ由来の $O_2^{\cdot-}$ が細胞の脱落を制御することが示唆された。また、**NADPH** オキシダーゼの **RNAi** により **caspase3** の活性化は部分的に阻害されたため、**NADPH** オキシダーゼは **caspase3** 活性化の上流で働きうることを示された。次に、**NADPH** オキシダーゼファミリー遺伝子である **Nox** の発現パターンをレポーター(**Nox-Gal4**)により調べた結果、細胞の脱落が起こる時期に先行して発現が確認され、このような **Nox** 発現細胞は、**M 領域**において高頻度に脱落することが分かった。以上から、**Nox** は **caspase3** 活性化を介して細胞自律的に脱落を制御することが明らかになった。興味深いことに、 H_2O_2 を消去するカタラーゼ(**Catalase**)を過剰発現した個体では、細胞の脱落が劇的に増加したことから、**NADPH** オキシダーゼにより産生される $O_2^{\cdot-}$ を介して作られる H_2O_2 は脱落をむしろ抑制するのではないかと考えた。**CasT** を用いて、**caspase3** 活性化細胞において **Catalase** を発現させると細胞の脱落や脱落する細胞の核の断片化は有意に増加したことから、 H_2O_2 は **caspase3** の初期活性の後に起こるイベントを抑制していることが示された。このように、**NADPH** オキシダーゼにより産生される $O_2^{\cdot-}$ を介して作ら

れる H_2O_2 は、**caspase3** の初期活性が起こった後にその活性化が致死レベルに到達するのを抑制することで、脱落する細胞がアポトーシス細胞死を起こさないように働きうる。以上を踏まえると、ROS は $\text{O}_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 により、**caspase3** 活性化の前後で脱落に対して逆方向性に働くことで、アポトーシスを伴わない細胞の脱落を可能にすることが考えられた。

組織閉鎖に対するアポトーシス経路の制御機能とその分子機序はこれまで理解が十分ではなかった。本論文において、申請者は生体内で起こる現象を観察し、操作し、解析することに優れたショウジョウバエ蛹期 **thorax closure** を実験モデルに用いて研究し、非アポトーシス性のカスパーゼ活性が上皮細胞の運動を制御することにより **closure** を遅延させること、続けて **NADPH** オキシダーゼによって活性化したアポトーシス経路が細胞の脱落を誘導することにより蛹期胸部の上皮形成を制御することを上記の通り明示している。

以上より本論文は博士（薬科学）の学位請求論文に値すると判定した。