

論文の内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエの正常発生に及ぼすカスパーゼの非細胞死性の機能に関する研究

氏名 篠田夏樹

細胞死実行因子として有名なカスパーゼは、細胞死を超えて多くの生理機能を発揮することがここ15年の研究から明らかとなってきた。例えばショウジョウバエでは、樹状突起の刈り込みに代表される細胞形態の大規模リモデリングや細胞の分化運命の制御が、カスパーゼが非細胞死性に寄与する現象として報告されている。ショウジョウバエで開発された遺伝学的カスパーゼ活性化検出レポーターと細胞系譜追跡実験を組み合わせた研究から、発生過程においてほとんどの細胞が一度は非細胞死性のカスパーゼの活性化を経験することが記述されており、カスパーゼが非細胞死性に及ぼす生理機能は広範にわたることが期待される。一連のカスパーゼの非細胞死性の機能は、Caspase-Dependent Non-Lethal Cellular Processes と近年定義され、新しい研究領域として確立されつつある。

本論文では、ショウジョウバエの正常発生に及ぼすカスパーゼの非細胞死性の機能に関する研究を2つ報告する。1つ目は、カスパーゼが非細胞死性に関与する神経前駆体細胞の細胞運命決定機構の解析である。これまでに、カスパーゼが切断によるGSK3 β の活性化を介して非細胞死性に神経前駆体細胞の細胞運命を決定することが知られていた。本研究では、RNAiスクリーニングから神経前駆体細胞の細胞運命に関与する遺伝子として *SETDB1* を同定した。また、遺伝学的な解析から、*SETDB1* がカスパーゼとは独立して神経前駆体細胞の細胞運命を決定する可能性を示した。2つ目は、カスパーゼが非細胞死性に成虫原基の成長を促進する機構の発見と分子機構の解明である。本研究では、成虫原基におけるカスパーゼ活性阻害実験から、カスパーゼ活性が非細胞死性に成虫原基の成長を促進することを発見した。また、カスパーゼファミリータンパク質に、生理機能に応じた使い分け機構が存在すること、健全な細胞にも基礎的な実行カスパーゼ活性が存在し、基質の切断によるタンパク質の代謝が成虫原基の成長に重要である可能性を示した。

カスパーゼが非細胞死性に関与する神経前駆体細胞の細胞運命決定機構の解析

発生過程において生物は、遺伝的及び環境的要因、確率的要因による変動の影響を受ける。驚くべきは、多くの場合で発生を終えた生物が一様な表現型を示すことである。すなわち、生物はその発生過程において多種多様な変動にさらされる一方で、それらに柔軟に対応し、表現型のゆらぎを小さくする緩衝システムを有するといえる。ショウジョウバエの感覚剛毛の本数は、定量的評価が容易であり、またその数が厳密に決定されていることから、緩衝システムの研究を行う上で適したモデルである。ショウジョウバエの感覚剛毛は、幼虫期において翅成虫原基に出現する感覚器前駆体 (SOP) 細胞が一連の非対称分裂を経て発生する。SOP 細胞は、プロニューラル遺伝子群の発現によって規定されるブ

ロニューラルクラスター (PNC) の中で、閾値よりも強くプロニューラル遺伝子群を発現する細胞から選抜されると考えられている。これまでに、microRNA の miR-9a がプロニューラル遺伝子群の発現制御を介して、遺伝的・環境的変動による感覚剛毛の数のゆらぎを抑制する緩衝システムとして働くことが報告されている。本研究ではまず、SOP 細胞の選抜過程に寄与する新奇遺伝子の同定を目指した。ヒストン修飾を介して遺伝子発現制御を担うことが知られている 11 遺伝子を候補遺伝子として、PNC 領域特異的な遺伝子のノックダウンによる RNAi スクリーニングを行った。その結果、H3K9 のメチル基転移酵素である *SETDB1* をノックダウンした群で感覚剛毛が最も増加がした。

SETDB1 のノックダウンでは感覚剛毛の形態に異常が観察されなかったことから、*SETDB1* が SOP 細胞から感覚剛毛への発生ではなく、PNC からの SOP 細胞の選抜過程に寄与する可能性が示唆された。そこで、*SETDB1* のノックダウンによって異所的な SOP 細胞が出現するかを検討した。その結果、対照群の翅成虫原基では小楯板予定領域の PNC に 2 つの SOP 細胞が観察される一方で、*SETDB1* をノックダウンした群では 3 つの SOP 細胞が観察された。以上の結果から、*SETDB1* が PNC において SOP 細胞の選抜過程で重要であることが示唆された。

これまでに、PNC においてカスパーゼ活性が非細胞死性に感覚剛毛の増加を抑制することが報告されている。*SETDB1* のノックダウンによって観察された表現型は、カスパーゼ活性の阻害によって観察された表現型と類似する。そこで、*SETDB1* とカスパーゼ活性の関係性を検証した。カスパーゼ活性を負に制御する *diap1/thread(th)* 遺伝子の null 変異体である *th¹* ヘテロ接合変異体バックグラウンドで PNC において *SETDB1* をノックダウンしたところ、感覚剛毛の増加が抑制された。次に、*SETDB1* のノックダウンによりカスパーゼ活性が抑制されるかを検証した。翅成虫原基におけるカスパーゼ活性を、カスパーゼ活性検出プローブである mCD8::PARP::VENUS を用いて定量した。対照群と比較してカスパーゼ阻害タンパク質 *p35* を過剰発現した群は活性が減弱し、*th¹* ヘテロ接合変異体は活性が増強した。一方で、*SETDB1* をノックダウンした群では対照群と比較してカスパーゼ活性の変化が観察されなかった。最後に、PNC において *SETDB1* のノックダウンとカスパーゼ活性の阻害を同時に行った。その結果、感覚剛毛のさらなる増加が観察された。以上の一連の結果から、カスパーゼと *SETDB1* が互いに独立かつ協調的に余剰な感覚剛毛の出現を抑制することが示唆された。また、*SETDB1* のノックダウンという遺伝学的変動による表現型のゆらぎがカスパーゼ活性の増強により抑制されたことから、カスパーゼ活性が緩衝システム的一端を担うことが示唆された。

カスパーゼが非細胞死性に成虫原基の成長を促進する機構の発見と分子機構の解明

ショウジョウバエ成虫の翅および胸部の前駆体である翅成虫原基は、器官成長の研究に適した上皮細胞器官である。本研究ではまず、成虫原基全体でカスパーゼ活性阻害タンパク質 *p35* を過剰発現することで、器官成長に対するカスパーゼ活性の効果を検討した。その結果、カスパーゼ活性の阻害により、対照群と比較して成虫の翅サイズが有意に減少した。次に、カスパーゼ活性が増強した変異体であ

る *th¹*ヘテロ接合変異体の翅サイズを評価した。その結果、*th¹*ヘテロ接合変異体の翅サイズは、対照群と比較して有意に増大した。以上の結果から、カスパーゼ活性はアポトーシスを誘導して器官の成長を妨げるというよりは、むしろ予想に反して、器官の成長を促進することが示唆された。

ショウジョウバエでは現在までに 7 種類のカスパーゼファミリータンパク質が報告されている。そこで、器官成長の促進に必要なカスパーゼを探索した。翅の表現型を指標とした RNAi スクリーニングから、Dcp-1 と Decay が翅の成長を促進すること、アポトーシスの実行に重要である Dronc と Drice は翅の成長の促進に関与しないことを示唆する結果を得た。翅サイズを直接定量することで、RNAi スクリーニングの結果の妥当性を確認した。また、翅成虫原基の TUNEL 染色から、*dcp-1* と *decay* のノックダウンがアポトーシスを抑制しないことを確認した。以上の結果から、Dcp-1 と Decay が非細胞死性に器官成長を促進することが示唆された。これまでの研究から、実行カスパーゼ (Drice, Dcp-1, Decay) の活性化には開始カスパーゼ (Dronc) が必要であると考えられてきた。一方で、これまでの結果は実行カスパーゼ Dcp-1 と Decay が Dronc 非依存的に活性化する可能性を示唆する。そこで、カスパーゼ活性検出プローブである SCAT3 を用い、ウエスタンブロットによりカスパーゼの活性を検出した。その結果、*dronc* 変異体において実行カスパーゼ活性が存在すること示された。

器官成長を促進する Dcp-1 とアポトーシスを実行する Drice は、同じアミノ酸配列を認識し、切断することが知られている。両者がどのようにして異なる生理機能を発揮するのかを考察する目的で、近接依存性標識法 TurboID を導入した。具体的には、CRISPR/Cas9 法を利用し、TurboID をそれぞれのカスパーゼの C 末端にノックインしたショウジョウバエの系統を作出した。翅成虫原基において、それぞれのカスパーゼの発現量とパターンには大きな差が認められなかった一方で、それぞれのカスパーゼの近傍に存在するタンパク質が異なることを示唆する結果を得た。以上の結果から、実行カスパーゼの機能的な差異が、近傍に存在するタンパク質の違いに起因する可能性が示唆された。

Dcp-1 に特異的なカスパーゼの基質として Acinus が報告されていた。Acinus のカスパーゼ切断耐性変異体系統の翅サイズを検討した結果、*th¹*ヘテロ接合変異体バックグラウンドにした際に、野生型と比較して翅サイズが減少した。以上の結果から、カスパーゼによる Acinus の切断が器官成長に部分的に重要であることが示唆された。以上の一連の結果から、生きている細胞には基礎的な実行カスパーゼ活性が存在し、Acn を含む基質タンパク質の切断を介してタンパク質恒常性を維持することが、器官成長の促進に必要な可能性が示唆された。