

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21117006

研究課題名(和文)組織傷害時に誘導される内因性リガンドと病原体センサーシグナルの遺伝生化学的解明

研究課題名(英文)Genetic analysis of the systemic damage response via caspase pathway to maintain homeostasis

研究代表者

倉永 英里奈(Kuranaga, Erina)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：90376591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 52,900,000円、(間接経費) 15,870,000円

研究成果の概要(和文)： ショウジョウバエ遺伝学と生化学を用いて、自然炎症に関するシグナルメカニズムの解明を試みた。細胞死実行因子カスパーゼの活性変異体は、ストレスに脆弱である。その原因として、野生型ではストレス依存的に腸細胞でカスパーゼが活性化し、腸環境の恒常性が維持されて生存するが、変異体ではそれが起こらず、毒性成分が体液中に上昇して個体死した。変異体の体液中に上昇する因子をオミクス解析したところ、ストレスによって上昇するアミノ酸代謝産物が同定され、その代謝経路がストレス応答に関与することを明らかにした。このようなストレス依存性のアミノ酸代謝産物は、非感染性炎症疾患のバイオマーカーとして有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we focused on stress responses and metabolic alterations in the *Drosophila* *apaf-1* (*dpf-1*) mutant, in which caspase activation and subsequent apoptosis are severely impaired. The *dpf-1* mutant was found to be sensitive to injury- and starvation-stress. We show that *dpf-1* mutant has defects in homeostatic gut cell renewal and that inhibiting caspase activity in fly enterocytes results in the production of systemic lethal factors after wounding. We then conducted metabolomic analyses of the hemolymph in *dpf-1* mutants to investigate the physiological consequences of caspase inhibition. Several metabolites were found at higher levels in *dpf-1* mutants than in wild type, which for at least one of the metabolites, was likely due to alteration of expression levels of putative metabolic enzymes in the fat body. Together, these results suggest caspase activity is required in the gut to regulate the systemic defense response in order to overcome stress *in vivo*.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、免疫学

キーワード：カスパーゼ 非感染性炎症 ショウジョウバエ 内因性リガンド

### 1. 研究開始当初の背景

炎症において、センサーがリガンドを感知して応答する際にみられる細胞内タンパク質複合体として、インフラマソームが知られている。インフラマソームは、炎症反応においてみられるタンパク質複合体で、Ipaf や NALP3 といった Apaf-1 様分子、およびカスパーゼを含み、リガンド依存的にカスパーゼを活性化することで、炎症性サイトカインの分泌に寄与する。しかし生体を用いたインフラマソームおよびカスパーゼと内因性リガンドに関する系統的な研究は行われておらず、どのようなセンサーがどのような内因性リガンドを感知して、カスパーゼを活性化するのか、またその内因性リガンドの放出はどのようにして制御されているのか、未だその実体は殆どが不明のまま残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、内因性リガンドを感知して活性化するカスパーゼに注目し、非感染状態においてカスパーゼを活性化する内因性リガンドと、そのリガンドに応答するセンサーの網羅的な同定を目指した。ショウジョウバエではインフラマソーム形成に必要な Apaf-1 様分子はゲノム中に *dapaf-1* しか存在していない。これまでに我々は、*dapaf-1* 変異体は組織傷害(上皮損傷)に対して高感受性となり、数日の内に個体死するという結果を得た。加えて、損傷後の *dapaf-1* 変異体の体液中に個体致死活性をもつ内因性リガンドの存在を見出した。この結果から *Dapaf-1*/カスパーゼ経路は、細胞が内因性リガンドを感知した後に、全身性に内因性リガンドが過剰になることを抑える機能に関与すること考えられる。そこで本研究では、損傷後の *dapaf-1* 変異体の致死原因、体液中に含まれる過剰な内因性リガンド、およびそのリガンドを感知する病原体センサーを同定し、自然炎症制御機構の分子基盤を確立することを目標にした。

### 3. 研究の方法

まず、損傷後の *dapaf-1* 変異体の致死性について解明する。カスパーゼ活性化部位、責任組織について同定する。次に、損傷後の *dapaf-1* 変異体体液中に含まれる過剰な内因性リガンドの同定遂行にあたって、ショウジョウバエ成虫から体液を採取することはこれまで困難であったが、予備研究において、効率良く安定して体液を採取する方法をすでに確立した。損傷前および損傷後の *dapaf-1* 変異体と野生型の体液をオミクス解析により比較する。加えて、損傷後に致死性を誘導する病原体センサーを同定するために、ショウジョウバエの RNAi 系統のライブラリを用いて、網羅的なスクリーニングを行う。効果のある系統、またはオミクス解析とオーバーラップした分子に関して随時、解析

を行う。

### 4. 研究成果

ハエは個体レベルでの遺伝学的検索が可能であり、内因性リガンドと病原体センサーの検索に遺伝学を導入できる。我々は、ショウジョウバエ唯一の NOD 様蛋白質であるカスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* の機能欠失変異体に組織障害を与えると数日の内に個体死することを見出した。2013 年の成果としては、この *dapaf-1* における個体致死がどのような経緯で生じるか明らかにし、国際誌 *Cell Reports* において報告した。上皮に損傷を加えた場合、腸細胞においてカスパーゼの活性化が生じ、腸細胞のターンオーバーによって体内の恒常性が維持されて生存するが、*dapaf-1* の変異体においては、腸細胞のターンオーバーが起らず、個体死することが明らかになった。

加えて体液交換実験により、この個体死の原因が *dapaf-1* 変異体における致死活性因子の蓄積にあることを突き止めた。この致死活性因子を同定するために、ショウジョウバエ個体から採取した体液を、オミクス解析により分析した。メタボロミクス解析によって得られた結果から、損傷後の *dapaf-1* 変異体中では、グリシンの代謝産物であるサルコシンが上昇していることが明らかになった。サルコシンの代謝経路は、哺乳類とショウジョウバエで保存されている。サルコシン上昇の原因を突き止めるため、代謝経路に関与する酵素の発現量を確認したところ、サルコシン合成酵素である *Gnmt* (グリシン N メチルトランスフェラーゼ) が、損傷後の *dapaf-1* で上昇していることが明らかになった。一方で、サルコシン自体には毒性が確認されなかったことから、*Gnmt* の制御するメチオニン代謝経路に注目した。その結果、*dapaf-1* 変異体において、SAM (S アデノシルメチオニン) の低下と SAH (S アデノシルホモシステイン) の上昇が確認された。*Gnmt* はメチオニンから合成される SAM を SAH に代謝する酵素であることから、*dapaf-1* 変異体における SAM の低下は妥当であると考えられる。*Gnmt* の発現上昇の原因を調べた結果、ショウジョウバエ脂肪体における転写因子 *FoxO* の上昇が関与していることが明らかになった。我々は、*dapaf-1* 変異体における貯蔵エネルギー(トリアシルグリセリド)の現象についても確認している。つまり、カスパーゼ異常が全身性の炎症を誘導し、生体内脂肪体においてエネルギー不足として捉えられ、*FoxO* 発現を伴う貯蔵エネルギーの浪費が誘導される。一方で、この *FoxO* 発現に伴う *Gnmt* の上昇は、貯蔵エネルギーの低下を抑制したことから、*Gnmt* を介した SAM 代謝の亢進は、エネルギー浪費にブレーキをかけるしくみであることが予想される。以上の解析によって、細胞死異常個体内で生じる非感染性炎症応答によって、体内のエネルギー代謝経路が亢進し、不要細胞の除去を

促進するメカニズムが働くが、その抑止メカニズムを同時に活性化することでネガティブフィードバックをかけることが明らかになった。本研究で明らかになった、サルコシン、SAM, SAH といったアミノ酸代謝産物は、このような非感染性炎症疾患のバイオマーカーとして有用であると考えられる。この成果は最終年度、2014 年に Cell Reports に報告した。加えて、カスパーゼ変異体における非感染性炎症応答の過剰な活性化が非細胞自律的に Toll 経路を活性化するメカニズムについて解明し、最終年度の 2014 年に JBC に報告した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1. Obata F, Kuranaga E, Tomioka K, Ming M, Takeishi A, Chen CH, Soga T, Miura M. Necrosis-Driven Systemic Immune Response Alters SAM Metabolism through the FOXO-GNMT Axis. *Cell Rep.* 7: 821-833. 2014 査読有  
doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.046.
2. Ming M, Obata F, Kuranaga E, Miura M. Persephone/Spätzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient *Drosophila*. *J Biol Chem.* 289: 7558-7568. 2014 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M113.543884.
3. Takeishi A, Kuranaga E, Tonoki A, Misaki K, Yonemura S, Kanuka H, Miura M. Homeostatic epithelial renewal in the gut is required for dampening a fatal systemic wound response in *Drosophila*. *Cell Rep.* 3: 919-930. 2013 査読有  
doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.022.
4. Sekine Y, Hatanaka R, Watanabe T, Sono N, Iemura S, Natsume T, Kuranaga E, Miura M, Takeda K, Ichijo H. The Kelch repeat protein KLHDC10 regulates oxidative stress-induced ASK1 activation by suppressing PP5. *Mol Cell.* 48: 692-704. 2012 査読有  
doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.018.
5. Kuranaga E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions *in vivo*. *Genes Cells.* 17: 83-97. 2012 査読有  
doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01579.x.
6. Nakajima Y, Kuranaga E, Sugimura K, Miyawaki A, Miura M. Nonautonomous Apoptosis Is Triggered by Local Cell Cycle Progression during Epithelial Replacement in *Drosophila*. *Mol Cell Biol.* 31:2499-512. 2011 査読有  
doi: 10.1128/MCB.01046-10.
7. Tonoki A, Kuranaga E, Ito N, Nekooki-Machida Y, Tanaka M, Miura M. Aging causes distinct characteristics of polyglutamine amyloids *in vivo*. *Genes Cells.* 16:557-64. 2011 査読有  
doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01505.x.
8. Kuranaga E, Matsunuma T, Kanuka H, Takemoto K, Koto A, Kimura K, Miura M. Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. *Development* 138:1493-9. 2011 査読有  
doi: 10.1242/dev.058958.
9. Koto A, Kuranaga E, Miura M. Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs. *Curr Biol.* 21:278-87. 2011 査読有  
doi: 10.1016/j.cub.2011.01.015.
10. Kuranaga E. Caspase signaling in animal development. *Dev Growth Differ.* 53:137-48. 2011 査読有  
doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01237.x.
11. Koto A, Kuranaga E, Miura M. Temporal regulation of *Drosophila* IAP1 determines caspase functions in sensory organ development. *J Cell Biol.* 187:219-31. 2009 査読有

- doi: 10.1083/jcb.200905110.
12. Tonoki A, **Kuranaga E**, Tomioka T, Hamazaki J, Murata S, Tanaka K, \*Miura M. Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol Cell Biol*. 29:1095-106. 2009 査読有  
doi: 10.1128/MCB.01227-08.
  13. 小幡史明、**倉永英里奈**、三浦正幸：ショウジョウバエにおける組織傷害応答、炎症と免疫 18:222-227. 2010
  14. 小幡史明、**倉永英里奈**、三浦正幸：ショウジョウバエにおける炎症応答と組織再生、生体の科学 62:249-256. 2011

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1, **Kuranaga E**. Collective unidirectional motion of epithelial cells induced by planar cell dynamics during looping morphogenesis of *Drosophila* male terminalia. Asia Pacific *Drosophila* Research Conference. Korea, 2013.5.13-16
- 2, **Kuranaga E**. Collective unidirectional motion of epithelial cells induced by planar cell dynamics. European *Drosophila* Research Conference, Spain, 2013.10.16-19
- 3, **Kuranaga E**. Genetic analysis of the systemic damage response via caspase pathway to maintain homeostasis. IEHS2012 Joint with Homeostatic Inflammation Symposium, Tokyo, 2012.10.23-26
- 4, 小幡史明、**倉永英里奈**、他：ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 *dapaf-1* 変異体における飢餓/酸化ストレス応答異常とメタボローム解析 横浜、2011.9.21
5. **倉永英里奈**：小さな生き物から学ぶ—からの形づくりと病気のしくみ、BMB2010 市民公開講座「広がる生命科学の世界—からだ

の形づくりから病気の克服まで—」東京、2010.12.11

6. **Kuranaga, E.**, Miura, M. Deciphering the physiological roles of caspase *in vivo*. BMB2010, Kobe, 2010.12.7-10
7. **Kuranaga, E.**, Miura, M. In vivo analysis of cell death during organogenesis. APRU Research Symposium 2010, Kyoto, 2010.11.24-26
8. **Kuranaga, E.**, Miura, M. Genetic analysis of homeostatic maintenance against stressed condition. The Homeostatic Inflammation Symposium I "Deciphering a link between pathogen sensors and inflammatory diseases" Tokyo, 2010.7.28
9. **倉永英里奈**：ショウジョウバエ遺伝学を用いた医薬学研究. 第 8 回 Cardiovascular Metabolism and Aging Conference. 東京、2010.7.2
10. **倉永英里奈**：カスパーゼの関与する生体防御機構—ショウジョウバエを用いたアプローチ—. 第 18 回内毒素・LPS 研究会 東京、2009.6.20
11. **Kuranaga E**. In vivo analysis of apoptosis during reproductive organ development in *Drosophila*. International Joint Symposium on "Cell Fate Regulation Research: Molecular Basis and Therapeutic Potential" Kumamoto, 2009.4.9-10

〔図書〕(計 1 件)

- 1, **倉永英里奈** 他 series モデル動物利用マニュアル 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール 「ショウジョウバエを用いた生体イメージング」株式会社 エル・アイ・シー 2011 年、8 ページ/671 ページ

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉永 英里奈 (KURANAGA, Erina)  
理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー  
研究者番号：90376591

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：