

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19109003

研究課題名（和文） ストレスシグナルの揺らぎ可視化による細胞社会構築原理の解明

研究課題名（英文） Visualization of oscillation for stress signal and molecular genetic study of establishment of cell community

研究代表者

三浦 正幸（MIURA MASAYUKI）

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：50202338

研究成果の概要（和文）：

発生は試行錯誤の繰り返しで進んで行くと考えられ、試行錯誤の過程では、不適切なシグナル受容によって絶えずストレスにさらされていると考えられる。本研究では、個体レベルでのストレスシグナル可視化技術の問題点を解決することで、個体発生における細胞死シグナルの揺らぎを生体内で可視化した。その結果、細胞社会からなる組織・器官形成における細胞死シグナルのダイナミクスおよびその生理的意義が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

During animal development, differentiating cells face to trial and error process and acquire both intrinsic and extrinsic stress. Caspases are activated as one of stress responses. In this study, we established in vivo imaging system to monitor caspase activation. Live imaging of cell death and caspase activation allowed us to document the role of apoptosis signaling to establish the cellular communities during development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2008年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2009年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2010年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2011年度	0	0	0
総計	67,800,000	20,340,000	88,140,000

研究分野：発生遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：発生、細胞社会、カスパーゼ、分化、ショウジョウバエ、マウス

1. 研究開始当初の背景

発生は一見、決められたプログラムにそって

整然と進行しているように見える。しかし発生が試行錯誤の繰り返しであることは、例え

ば神経回路形成を考えると理解しやすい。適切な標的を見つけるべく神経軸索は物理的、化学的ランドマークを探し、試行錯誤を繰り返して標的を探し当てる。そしてたとえ標的にたどり着いたとしても最終的には栄養因子競合のために除去される神経が出てくる。試行錯誤のプロセスは他の器官発生においても行われていると予想されるが、試行錯誤の過程で細胞は、不適切なシグナル受容によってストレスにさらされていると考えられる。多くの発生シグナルに関与する遺伝子の変異体では局所での細胞死の亢進が見られるが、これは発生シグナルの乱れが強く表れた場合に、アポトーシスという形で乱れを修正する過程を表現していると考えられる。

個体や細胞でカスパーゼ活性を抑制した実験から、この酵素が細胞死のみならず多くの生命現象（増殖、分化、移動、炎症、感染）に関わることが我々を含む複数の研究グループによって示されてきた。これらのことからカスパーゼは細胞が曖昧な分化をとげないように活性化の程度によってそれぞれの基質を切断することで、細胞の分化状態を監視し安定なものにすると予想される。我々はカスパーゼが分化状態の揺らぎをストレスとして感知して制御する分子として注目している。

2. 研究の目的

カスパーゼは様々なストレス刺激で活性化されるアポトーシスに必須のプロテアーゼであり、発生シグナルの乱れを感知して活性化されると考えられる。発生過程で増殖性の違う細胞集団が接したときには、栄養因子受容に劣る増殖性の悪い細胞集団で選択的にカスパーゼの活性化がおこり除去される（細胞競合）。また、何らかの原因で過剰なアポトーシスが生じた場合は失われた細胞を埋めあわせるべく増殖シグナルがカスパーゼの活性化されたアポトーシス細胞から分泌される（代償性増殖）。本研究では、個体レベルでの可視化技術の問題点を解決することで、個体発生における細胞死シグナルの揺らぎを生体内で可視化し、細胞社会からなる組織・器官形成の新たな構築原理・分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

我々は生体そのものを用いた生体イメージ

ングの重要性を考え、生体での使用に適したイメージングプローブの開発と可視化システムの構築を行ってきた。開発のポイントは1) シグナルの特異性が高いこと、2) SNの高い高感度プローブであること、3) 生体内での細胞内環境に影響されないこと、である。申請者らが開発したカスパーゼ活性を検出するプローブ SCAT (Sensor for activated caspases based on FRET)はこの全てを満たすものであり、FRET (fluorescent resonance energy transfer)を用いた生体イメージングプローブの中でも特に FRET 効率の変化が大きく使いやすいものである。

内在性カスパーゼ阻害因子である

DIAP1 (*Drosophila* Inhibitor of apoptosis protein 1) はユビキチンリガーゼ (E3) としての活性を持ち、カスパーゼに結合、分解することでカスパーゼの活性化を阻害する。しかしながら、一旦細胞死刺激が入ると DIAP1 自身の分解が促進され、DIAP1 分解がカスパーゼの活性化の引き金となり、細胞死が誘導される。そこで、我々は DIAP1 タンパク質の分解に着目し、そのタンパク質動態を生体イメージング解析することが可能な新規プローブ PRAP (pre-apoptosis signal detecting probe based on DIAP1 degradation) を作成した。

本研究では SCAT や PRAP を発現するトランスジェニック動物を作成し、スピニングディスクを用いたマルチポイントスキャナー、あるいはタンデムスキャナーを採用することにより、生体内において蛍光の退色や光毒性を少なくした蛍光イメージングを行うシステムを構築した。

4. 研究成果

【細胞死シグナルを器官発生で1細胞レベル検出する実験系の構築: ショウジョウバエ外感覚器の発生】

我々は PRAP を用いて、ショウジョウバエ中胸背毛の発生における細胞死シグナルのイメージング解析を行った。中胸背毛は1個の前駆体細胞 (sensory organ precursor: SOP) から非対称分裂により生ずる4種の細胞群から形成される。今回、中胸背毛を形成する細胞系譜の運命決定、非対称分裂、最終分化過程において、DIAP1 のタンパク質レベルは細胞種、及びその分化段階依存的に安定化、または分解促進されることが明らかとなっ

た。生体イメージングによって明らかとなったもう一つの驚きは、細胞死抑制に必須と考えられてきた DIAP1 が感覚器形成過程において消失することであり、この結果は、カスパーゼ活性化制御が多段階的に行われることを示唆している。本研究によって、外感覚器という細胞社会形成過程での細胞死シグナル動態が明らかとなった。カスパーゼ活性は全か無かの調節を受けているのではなく、一連の時間軸に沿って巧妙に調節されることで、カスパーゼの細胞死と非細胞死両方の機能を巧みに発揮させていることが明らかになった。

【発生における分化エラー細胞の同定】

発生ノイズともいえるべき分化エラー細胞を調べる一番直接的な方法は、細胞分化のプロセスを生体の中で細かに観察することである。この研究には生体イメージングが可能でかつ、多様な分化マーカーが知られている細胞系譜が有効である。上記 SOP からの全発生過程は蛹期に体の表面でおこるので長時間の安定した生体イメージングが可能である。この特徴を生かし、SOP が生まれるところから感覚器が完成するまでの過程を中胸で詳しく解析した。

SOP が生じたことは *neuralized* (細胞膜にある E3 ユビキチンリガーゼ、Delta のエンドサトーシスを促進) の発現が ON になることでわかる。SOP が生まれるとその細胞は Delta を発現し周りの細胞の Notch を活性化して神経系の細胞になるのを抑制するため (側方抑制)、近接細胞に SOP は出現しないことが遺伝学的な研究から明らかにされていた。しかし、SOP の出現を *neuralized (neu)* 遺伝子の発現を指標に (*neu-Gal4/UAS-GFP*) 観察していくと、将来 SOP となる細胞の近傍に *neu* 陽性の細胞が SOP の出現するタイミングとは関係なく出現することが明らかになった。このような細胞 (SOP 様細胞と呼ぶ) の殆どは一度分裂したのち、アポトーシスによって生体から除かれていった。

SOP 様細胞は非対称分裂をせず、*neu* の発現が持続しない。正常に SOP になった細胞では周りの上皮に比べ Notch 活性化が速やかに低下していくが SOP 様細胞では高い持続的な Notch 活性化が見られた。これは神経系マーカー *neu* を発現した SOP 様細胞の性質に矛盾が生じ、分化に失敗した細胞であることを示

している。SOP 様細胞は全体の SOP に対して 20% の割合で生じ、その殆どはアポトーシスで失われる。Notch ヘテロ変異体では、20% 余分に SOP が生じ、その分だけ余分な中胸背毛が生じることから、SOP 様細胞の出現とアポトーシス制御には Notch が関わっていることが考えられる。このように生体イメージングによって分化に失敗した細胞の存在が明らかになり、外感覚器配置パターンを作るには、側方抑制だけではなく、アポトーシスが発生で生じるエラーを取り除くことで完成されることを示している。アポトーシスの機能として不要細胞、危険細胞の除去が言われて来たが、それに加え、細胞社会の中で細胞が特殊化していくプロセスではアポトーシスによる分化に不具合が生じた細胞除去による発生ノイズの消去がおきていることが明らかになった。よって、アポトーシス不全は、分化エラー細胞の蓄積や非アポトーシス細胞からの危険信号因子放出を増加させ、発生の進行に影響することが考えられた。

【組織再編成における細胞死と細胞増殖】

ショウジョウバエ変態時の腹部表皮再構築過程においてカスパーゼ活性化を詳細に観察したところ、特徴的な活性化の時空間的なパターンを見出した。ヒストブラスト細胞増殖を遺伝学的または光操作で人為的に操作することで、入れ替わる細胞間での局所的な相互作用が幼虫表皮細胞のアポトーシスを制御していることが明らかになった。さらに、細胞周期をモニタリングすることで、ヒストブラスト側では S/G2 期からの細胞周期進行がそれに接する幼虫細胞のアポトーシスを誘導するのに必要であることが明らかとなった。こうした細胞間相互作用を介した細胞非自律的にアポトーシスを誘導する仕組みは「細胞競合」という、異なる増殖速度をもつ細胞間の相互作用と類似している。増殖細胞とその境界にある細胞でカスパーゼが特異的に活性化される現象は「再編成境界」とでも呼べるシグナルの境界面が細胞競合一般に存在することを考えさせる。この境界が出来ないと再編プロセスの遅延がおこり、決められた時間枠で進行する発生や組織再生には大きな影響を及ぼすことが予想される。細胞競合はがん細胞が周辺組織を駆逐するプロセス、細胞再生系における幹細胞と分化した細胞の間の

相互作用にも寄与すると考えられており、今回の研究から示唆される細胞間相互作用と共通した仕組みの存在が考えられる。

【ほ乳類神経発生における細胞死シグナル】

上記ショウジョウバエを用いた生体イメージングの研究から、細胞死シグナルダイナミクスが発生の様々な局面に関わることが見えてきた。では、ほ乳類神経系の発生過程において、細胞死シグナルはどのような機能を持っているのだろうか。これを調べる目的で、2つのアプローチによってカスパーゼ活性を検出する実験系を構築した。1)抗体を用いる方法と2)SCATを用いる方法である。

1) 神経発生の様々な局面を、抗活性化カスパーゼ3抗体を用いて調べたところ、発生中の嗅覚神経軸索で強いカスパーゼ活性が検出され、この活性は直接的にはアポトーシスを誘導しないものであることが明らかになった。さらに、この領域で活性化されるカスパーゼ9の基質としてSemaphorin 7Aを見いだした。カスパーゼ活性化がおきない変異体では嗅覚神経軸索走行に異常が観察され、その際に嗅覚神経細胞数に異常は無かったため、カスパーゼ活性が非細胞死機能として軸索走行制御に関わることが判ってきた。

2) ほ乳類神経発生における細胞死シグナルの動態を生体イメージングによって解析する目的でSCAT3を発現するトランスジェニックマウスの作成を行った。本研究では、大量のアポトーシスが観察される哺乳類神経管閉鎖に注目した。神経管とは脳や脊髄のもととなる器官であり、板状の神経板の左右両端が筒状の神経管となるように融合するという、神経管閉鎖を経て形成される。この神経管閉鎖が正常に完遂されることが、その後の中枢神経系の発生には必須である。致死的な先天性奇形である外脳症や無脳症、また治療は可能ですが発症率の高い水頭症や二分脊椎の原因の1つは、神経管閉鎖の異常であると考えられている。神経管閉鎖の過程では、神経板の融合部周辺で大量のアポトーシスが起ることが知られ、また、この時期のアポトーシスが減少したマウスでは頭部に神経管閉鎖異常が高頻度で起ることが観察されることから、頭部神経管閉鎖過程ではアポトーシスが重要な働きを担うことが示唆

されていたが、実際にアポトーシスが頭部神経管閉鎖にどのような影響を与えるのかは不明であった。これはアポトーシス細胞は通常すぐに除去されてしまい、取り出した胚を固定して調べるというこれまでの研究手法では、検出できるものはごく一部であること、さらに神経管閉鎖は非常にダイナミックな形態変化をともなう子宮内で進行する現象のため、既存の研究手法では、アポトーシスの有無と神経管閉鎖の成否という結果の判定しかできず、両者の関係性を詳細に見ることができなかったことに起因している。

そこで本研究では、生体内におけるアポトーシスの検出の難しさという問題点を、超高速スキャン型共焦点顕微鏡を用いたライブイメージング技術と、当研究室で開発したカスパーゼ活性化検出蛍光プローブ SCAT を組み合わせることで克服した。これにより、哺乳類頭部神経管閉鎖過程とそこで起こるアポトーシスとカスパーゼ活性化を同時可視化することに初めて成功した。

哺乳類頭部神経管閉鎖過程においてアポトーシスした細胞には、少なくとも2種類のふるまいがあることがわかった。通常、カスパーゼ3を活性化したアポトーシス細胞は断片化しすぐに近傍の組織に呑み込まれることにより取り除かれることが知られている。しかし、頭部神経管閉鎖過程ではこれらの断片化する死細胞 (classical (C)-type 細胞) に加え、断片化せずに組織から脱落し長時間そこに留まる細胞 (dancing (D)-type 細胞と命名) があることが、生体イメージングにより明らかになった。

頭部神経管閉鎖の速度解析を行った結果、これらのアポトーシスを阻害した場合には、頭部神経管閉鎖の速度が顕著に減少することが明らかになった。また、アポトーシス欠損時には頭部神経管閉鎖が一進一退する様子も観察された。これらの結果から、アポトーシスは頭部神経板の形態形成運動に寄与することで、頭部神経管閉鎖の円滑な進行に貢献することが示唆された。

本研究で開発したアポトーシスと哺乳類頭部神経管閉鎖動態の同時可視化システムは、頭部神経管閉鎖異常を示す多数のマウス変異体の解析にも応用可能であり、今後そうした解析を重ねることで神経管閉鎖を可能とする細胞動態の解明が期待できる。また、この実験系において単一細胞レベルでの観

察を可能にすることで、細胞ストレス状態の揺らぎを解析することが出来ると考えられる。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 15 件)

Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., and Miura, M.: Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J. Cell Biol.* 195, 1047-1060, 2011
doi/10.1083/jcb.201104057

Kanda, H., Igaki, T., Okano, H., and Miura, M.: Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced non-apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18977-18982, 2011
doi/10.1073/pnas.1103242108

Nakajima, Y-I, Kuranaga, E., Sugimura, K., Miyawaki, A., and Miura, M.: Non-autonomous apoptosis is triggered by local cell cycle progression during epithelial replacement in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol.*, 31, 2499-2512, 2011
doi:10.1128/MCB.01046-10

Kuranaga, E., Matsunuma, T., Kanuka, H., Takemoto, K., Koto, A., Kimura, K and Miura, M.: Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia. *Development* 138, 1493-1499, 2011
doi:10.1242/dev.058958

Tonoki, A., E. Kuranaga, N. Ito, Y. Nekooki-Machida, Tanaka, M., and Miura, M.: Aging causes distinct characteristics of polyglutamine amyloids in vivo. *Genes to Cells* 16, 557-564, 2011
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01505.x

Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs. *Current Biol.* 21, 278-287, 2011
DOI 10.1016/j.cub.2011.01.015

Koto, A., and Miura, M.: Who lives and who dies: role of apoptosis in quashing developmental

errors. *Comm. Integ. Biol.* 4, 495-497, 2011
DOI: 10.1016/j.cub.2011.0.

Miura, M.: Apoptotic and non-apoptotic caspase functions in neural development. *Neurochemical Res.* 36, 1253-1260, 2011
DOI 10.1007/s11064-010-0341-x

Miura, M.: Active participation of cell death in development and organismal homeostasis. *Dev. Growth. Diff.* 53, 125-136, 2011
doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01228.x

Ohsawa, S., Hamada, S., Kuida, K., Yoshida, H., Igaki, T., and Miura, M.: Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 13366-13371, 2010
doi/10.1073/pnas.0910488107

Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., and Miura, M.: Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon mediated gene transfer system. *Genes to Cells* 15, 501-512, 2010
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01397.x

Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M.: Temporal regulation of *Drosophila* IAP determines the dual functions of caspases in sensory organ development. *J. Cell Biol.* 187, 219-321, 2009
doi/10.1083/jcb.200905110

Ohsawa, S., Hamada, S., Asou, H., Kuida, K., Uchiyama, Y., Yoshida, H., and Miura, M.: Caspase-9 activation revealed by Semaphorin 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. *J. Neurosci.* 29, 11385-11392, 2009
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4780-08.2009

Ohsawa, S., Hamada, S., Yoshida, H., and Miura, M.: Caspase-mediated changes in Histone H1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons. *Cell Death Diff.* 15, 1429-1439, 2008

doi:10.1038/cdd.2008.71

Takemoto, K., Kuranaga, E., Tonoki, A., Nagai, T., Miyawaki, A., and Miura, M.: Local initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 13367-13372, 2007
doi_10.1073_pnas.0702733104

[学会発表] (計 7 件)

Miura, M.: Physiological function of caspases in organogenesis and tissue remodeling. 25th Annual French *Drosophila* Conference. 2011. 10.17-20. Lyon, France

Miura, M. The replacement boundary coordinates epidermal remodeling in *Drosophila*. 第 63 回日本細胞生物学会シンポジウム 2011.6.27-29, 札幌、日本

Miura, M.: Roles of programmed cell death signaling in *Drosophila* sensory organ development. International Symposium on "Cell Cycle and Development". 2010.3.15-17, Kyoto, Japan

Miura, M.: Caspase regulates axon pathfinding and maturation of mouse olfactory neurons. International Symposium on Morphological Sciences. 2010.9.18-22, Taormina, Italy

Miura, M.: TNF signaling and its physiological roles in *Drosophila*. 12th International TNF conference. 2009.4.26-29 Madrid, Spain

Miura, M.: In vivo dynamics of cell death signaling in the *Drosophila* sensory organ development. International Cell Death Society Symposium. 2008, 6.6-9, Shanghai, China

Miura, M.: Non-apoptotic function of caspase signaling in *Drosophila*. in Keystone Symposium on Apoptotic and Non-apoptotic Cell Death Pathways. 2007. 4. 15-20. Monterey, California, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：生体刺激存在下で mRNA のフレームシフトを利用した蛋白質の発現方法

発明者：三浦正幸、岩脇隆夫

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：4446057

取得年月日：平成 22 年 1 月 29 日

国内外の別：日本

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~genetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 正幸 (MIURA MASAYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：50202338