

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16137

研究課題名(和文) 近接依存性標識法TurboIDによる、細胞を殺さないカスパーゼ活性の解析

研究課題名(英文) The analysis of non-apoptotic caspase activity by TurboID-mediated proximal labeling

研究代表者

篠田 夏樹 (Shinoda, Natsuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：30838397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から、Caspase-3ファミリータンパク質であるDriceとDcp-1のうち、Dcp-1のみが非細胞死性にショウジョウバエの翅サイズを制御するとの結果を得ていた。本研究により、Dcp-1に特異的な基質Acinusの切断が翅サイズ制御に重要であること、TurboIDによる近接依存性標識により、DriceとDcp-1それぞれの近傍に存在するタンパク質が異なること、DriceとDcp-1では過剰発現による細胞死誘導能が異なることが明らかとなった。以上より、細胞死性、非細胞死性の両面において、Caspase-3ファミリータンパク質の使い分け機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞死実行因子として有名なカスパーゼは、細胞死を超えてその他多くの生理機能を発揮する。しかし、なぜカスパーゼが細胞死を回避しながら、その他の生理機能を発揮することができるのか、その分子機構の理解は未だ不十分である。本研究から、同一のアミノ酸配列(典型的にはDEVD-G)を切断するCaspase-3ファミリータンパク質DriceとDcp-1の細胞文脈に応じた使い分けが、細胞死を回避しながら、その他の生理機能の発揮を可能にする分子機構の一端であることが提示された。提示された概念は、その他のカスパーゼの非細胞死性の機能の分子機構の理解を進めうるものである。

研究成果の概要(英文)：I have previously found that among the Caspase-3 family proteins, Drice and Dcp-1, only Dcp-1 regulates Drosophila wing size in a non-apoptotic manner. In this study, I found that cleavage of Acinus, a substrate specific for Dcp-1, is important for the regulation of wing size. In addition, by using TurboID-mediated proximity labeling, I found that proteins in proximal to Drice and Dcp-1 are different from each other. Furthermore, I found that Drice and Dcp-1 differ in their ability to induce cell death upon overexpression. These results indicate the existence of a mechanism by which Caspase-3 family proteins are used in different ways in both apoptotic and non-apoptotic processes.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：カスパーゼ 非細胞死性の機能 TurboID 近接依存性標識法 ショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞死実行因子として有名なカスパーゼは、多細胞生物において細胞死を超えてその他多くの生理機能を発揮することが明らかとなっていた。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、細胞運動性の制御が、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た。また、哺乳類でも皮脂腺の増大にカスパーゼが非細胞死性に寄与することが報告されており、種を超えて保存された機構であることが予想されていた。興味深いことに、ショウジョウバエで新たに開発された遺伝学的カスパーゼ活性レポーター (CaspaseTracker) と細胞系譜追跡実験を組み合わせた研究から、ほとんどの細胞が生体を構成するまでに一度はカスパーゼを活性化する (ただし、細胞死により除去されない) 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極めて広範に発揮されることが期待されていた。これら一連のカスパーゼによる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った。一方で、なぜカスパーゼが細胞死を回避しながら、その他の生理機能を発揮することができるのか、その分子機構の理解は不十分であった。研究代表者のこれまでの研究からも、カスパーゼの非細胞死性の生理機能として、ショウジョウバエの翅サイズの制御が見出されていた。さらに、その分子機構の詳細な解析から、文脈に応じて扱う Caspase-3 ファミリータンパク質を替えることで、細胞死の実行と非細胞死性の生理機能の発揮の切り替えが制御されている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、Caspase-3 ファミリータンパク質が非細胞死性に関与する細胞プロセス及びその分子機構を理解し、ショウジョウバエ翅サイズを制御する分子機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

カスパーゼが細胞死の実行と非細胞死性の機能の発揮を切り替える様式として、カスパーゼ相互作用タンパク質を介した活性化調節や細胞内局在制御、基質特異性の制御が想定された。そこで、近接依存性標識手法 TurboID によるカスパーゼ相互作用タンパク質の網羅的探索手法を導入した。具体的には、Drice と Dcp-1 の機能的な違いを明らかにするために、CRISPR/Cas9 法を用いて Drice と Dcp-1 の C 末端それぞれに TurboID をノックインしたショウジョウバエ系統を作出した。作出した系統において、ピオチン標識されたカスパーゼ近傍タンパク質をストレプトアビジンにより生成し、質量分析により網羅的に同定した。また、Drice と Dcp-1 の細胞死への寄与を検討した。具体的には、ショウジョウバエ S2 細胞への Drice と Dcp-1 及びそれぞれの各タンパク質ドメインを交換したキメラタンパク質の過剰発現により、細胞死誘導能の比較解析を行った。

4. 研究成果

研究代表者のこれまでの研究から、Caspase-3 ファミリータンパク質である Drice と Dcp-1 のうち、Dcp-1 のみが非細胞死性にショウジョウバエの翅サイズを制御するとの結果を得ていた。そこで、TurboID による近接依存性標識により、Drice と Dcp-1 それぞれの近傍に存在するタンパク質を評価したところ、近傍タンパク質が異なることが明らかとなった。Caspase-3 ファミリータンパク質の活性化及び細胞死の実行には、アポトーシス開始に必要な Caspase-9 のオルソログである Dronc が必要と考えられていた。一方で、カスパーゼ活性検出プローブ SCAT3 を用いた解析から、Dronc 非存在下でも Caspase-3 ファミリータンパク質の基礎的な活性が存在することが明らかとなった。また、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。そこで、翅サイズに対する Acinus 切断の寄与を検討した結果、Acinus の切断が翅サイズを制御する上で重要であることが明らかとなった。以上より、生きている細胞の基礎的なカスパーゼ活性によるタンパク質代謝が、器官成長の促進に重要であることが示された。また、非細胞死性の機能発揮の分子基盤として、異なる近傍タンパク質構成を有する Caspase-3 ファミリータンパク質の使い分け機構の存在が示唆された (Shinoda et al., PNAS, 2019)。

さらに、作出したショウジョウバエ系統を用い、Drice と Dcp-1 のそれぞれの近傍に存在するタンパク質を質量分析により網羅的に探索した。その結果、翅の前駆体組織である翅成虫原基において、Drice と Dcp-1 のそれぞれに特異的なタンパク質群の同定に成功した。また、同様の解析をショウジョウバエの頭部において行い、翅成虫原基とは異なる頭部特異的な近傍タンパク質群の同定に成功した。以上の結果から、Drice または Dcp-1 特異的及び組織特異的な近傍タンパク質が存在することが確認され、それらがカスパーゼの細胞死性、非細胞死性の機能の発揮に関与する可能性が示唆された。カスパーゼ活性は、生涯にわたってその活性が変動する。例えば、ショウジョウバエの特定の神経細胞において、加齢依存的なカスパーゼの活性化にともなう細胞脱落が認められる。今後、同定したカスパーゼ種特異的、細胞種特異的な近傍タンパク質群の、カスパーゼ活性化調節機構への関与を解析することで、細胞死性、非細胞

死性の両面において、文脈に応じたカスパーゼの使い分けによる生理機能発揮及びその分子機構が明らかになることが期待される。

また、Drice と Dcp-1 のそれぞれのカスパーゼの細胞死誘導能の違いを検討した。具体的には、ショウジョウバエ S2 細胞への Drice と Dcp-1 及び各タンパク質ドメインを交換したキメラタンパク質を過剰発現し、細胞死誘導能を比較した。その結果、Drice の過剰発現は細胞死を誘導しない一方で、Dcp-1 の過剰発現は細胞死を誘導することが明らかとなった。また、Drice と Dcp-1 の各タンパク質ドメインを交換したキメラタンパク質の解析から、プロドメインではなく、比較的配列の類似する酵素ドメインが、過剰発現による細胞死誘導能の違いを説明するに重要であることが明らかとなった。また、遺伝学的な解析から、Dcp-1 はその活性化に、アポトソーム構成要素である開始カスパーゼ Dronc、及びそのアダプタータンパク質 Dark を必ずしも必要としないことが明らかとなった。以上の結果から、細胞死誘導能の面においても、Caspase-3 ファミリータンパク質は異なり、その使い分け機構が存在する可能性が示唆された。

ショウジョウバエ蛹期胸部の融合をモデルとした研究から、その正中線においてカスパーゼの活性化をとまなう細胞脱落が観察されること、カスパーゼの活性化に活性酸素種が必要であることが示唆されていた。この研究において研究代表者は、カスパーゼ活性検出プローブ SCAT3 を安定発現する S2 細胞を作出し、活性酸素種によるカスパーゼ活性化動態を観察することで、活性酸素種がカスパーゼの活性化を S2 細胞においても誘導することを示した (Fujisawa, Shinoda et al., *iScience*, 2020)。

本研究では、Caspase-3 ファミリータンパク質およびその近傍タンパク質に着目した研究から、細胞死性、非細胞死性の両方の局面において、Caspase-3 ファミリータンパク質の使い分け機構が存在する可能性を示した。提示された可能性は、その他のカスパーゼの細胞死性、非細胞死性の機能の分子機構の理解を進めうるものである。今後、カスパーゼタンパク質及びその活性化の細胞内動態の解析により、なぜカスパーゼが細胞死を回避しながら、その他の生理機能を発揮することができるのか、その分子機構の全容が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujisawa Y, Shinoda N, Chihara T, Miura M	4. 巻 23
2. 論文標題 ROS Regulate Caspase-Dependent Cell Delamination without Apoptosis in the Drosophila Pupal Notum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101413-101413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinoda, N., Hanawa, N., Chihara, T., Koto, A., Miura, M.	4. 巻 116
2. 論文標題 Dronc-independent basal executioner caspase activity sustains Drosophila imaginal tissue growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 20539, 20544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904647116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 篠田夏樹, 花輪望未, 三浦正幸
2. 発表標題 細胞死実行カスパーゼの非細胞死性機能に関わる, カスパーゼ周辺微小環境の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠田夏樹, 花輪望未, 千原崇裕, 古藤日子, 三浦正幸
2. 発表標題 基礎的な実行カスパーゼ活性はショウジョウバエの翅の成長を促進する
3. 学会等名 第28回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinoda, N., Hanawa N., Chihara T., Koto A., Miura, M.
2. 発表標題 Dronc-independent basal executioner caspase activity sustains Drosophila imaginal tissue growth
3. 学会等名 Non-Apoptotic Roles of Apoptotic Proteins (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞を殺さない基礎的なカスパーゼ活性による器官サイズの制御機構の解明 https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_00010.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------