

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04774

研究課題名(和文) 個体ごとの表現型を決める非細胞死カスパーゼ活性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of non-cell death caspase activation that determines the phenotype of each individual.

研究代表者

三浦 正幸 (Miura, Masayuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：50202338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：非細胞死性のカスパーゼ活性による特定の基質プロセッシング(Basal Caspase Processing: BCP)によって表現度が制御される。しかしBCPの調節そのものに関する研究は今だ不明であり、また、BCPに関するゲノムワイドな解析も行われていなかった。ショウジョウバエ脳においてカスパーゼの活性化を制御する近接タンパク質を探索した結果、過剰発現によりカスパーゼの活性化を促進する分子として細胞接着因子Fasciclin 3(Fas3)を同定した。感覚剛毛数の表現度にはBCPが関わるが、この表現度に関わる遺伝子のゲノムワイドスクリーニングをGWASの手法を用いて行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理機能やストレス応答、薬剤への感受性、寿命といった表現型の程度は個体ごとに異なる。表現度は注目する表現型の個体間の強弱を示すが、BCPの制御機構の研究によって表現度制御の分子メカニズムの解明が進むと、疾患や老化といった個体差の大きな現象の理解を深めることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Expressivity of phenotype is regulated by Basal Caspase Processing (BCP) which is mediated through non cell death inducing caspase activity. However, the regulation of BCP is still unknown and genome-wide analysis of BCP has not been conducted yet. We performed the analysis of caspase-proximal proteins in Drosophila brain and identified the cell adhesion molecule Fasciclin 3 (Fas3) as a molecule that promotes caspase activation upon its overexpression. We performed genome-wide screening of genes involved in the BCP-regulated expressivity of sensory bristle numbers using the GWAS method.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：カスパーゼ 非アポトーシス 表現度 個体差 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

原因となる遺伝子変異があっても、遺伝的背景によって重篤度は大きく異なることが、糖尿病を含む生活習慣病で知られている。さらに遺伝的背景が同じであっても、生理機能やストレス応答、薬剤への感受性、寿命といった表現型の程度は個体ごとに異なる。表現度 (expressivity) と浸透度 (penetrance) は表現型のばらつきを表す遺伝学用語だが、表現度は注目する表現型の個体間の強弱を示す。表現度を決める要因に関しては、環境からのストレス応答をエピゲノム制御やゲノム変異との相関から読み解くことで進んできている。しかしながらゲノム変異やエピゲノム以外に表現度を生み出す分子遺伝学的な研究は未だ遅れている。

ヒトや昆虫は左右相称動物 (Bilateria) である。左右相性な生物においては個体の左右器官は発生時に同じ遺伝的背景と体内外環境を持つため、そのサイズや形態の非対称性の程度 (これを Fluctuating Asymmetry: FA と呼ぶ) は、個体内在性の生物学的ノイズに対する緩衝能力の低さを表すといえる。我々は、カスパーゼ活性を発生期に阻害すると、予想に反して翅の細胞数が 5-10% 減少するとともに、左右の組織細胞数を一定に保つことができなくなり、翅の FA が増加することを見出した。この現象に関わるカスパーゼを遺伝学的に調べたところ、Caspase-3 と相同ではあるが生体でのアポトーシス実行への関与は少ない Dcp-1, Decay というカスパーゼが関わっていた (Shinoda et al., PNAS 116, 20539, 2019)。これは非細胞死性のカスパーゼ活性による特定の基質プロセッシング (Basal Caspase Processing: BCP) によって表現度が制御される例となった。

個体間の表現型が BCP によってばらつくもう一つの例として、ショウジョウバエカスパーゼ活性化因子 (Adapf-1) 変異体では胸部背盾板に左右 2 本ずつ生じる外感覚器である大剛毛の数が左右問わず増加する現象が挙げられる。その分子メカニズムを調べると、感覚器前駆体細胞 (SOP) が生まれるプロニューラルクラスターで BCP によって Shaggy46/GSK3 $\beta$  のプロセッシングがおこって活性化し、モルフォゲン Wnt のシグナルを抑制することで SOP 数を決めていた (Kanuka et al., EMBO J., 24, 3797, 2005)。この BCP は TBK1 のショウジョウバエホモログ IKK $\epsilon$  による内因性カスパーゼ阻害タンパク質 DIAP1 のリン酸化による分解促進によって調節されていた (Kuranaga et al., Cell 126, 583, 2006)。大剛毛数は 4 本だが野生型でも数%の割合で 5~6 本に増加する。この大剛毛数の増加を指標に係する遺伝子のスクリーニングをした結果、遺伝子発現抑制性のヒストンメチル化である H3K9me3 を触媒するメチルトランスフェラーゼ dSETDB1 が得られた (Shinoda et al., GTC 21, 378, 2016)。以上のように、BCP による表現型がばらつく現象の解析を行なってきたが、BCP の調節そのものに関する研究は今だ不明であった。また、BCP に関するゲノムワイドな解析も行われていなかった。

## 2. 研究の目的

ある一つの遺伝子変異がもたらす表現型の程度が異なる事例は数多く知られる。遺伝的な量的形質因子の関与や生育環境の違いによるエピゲノム制御がその要因として挙げられる。個体ごとの表現型の強弱といった違い (表現度: expressivity) を生み出す決定的な機構の研究はいまだ断片的である。本研究では遺伝学的な解析に最適なショウジョウバエを用い、BCP の調節によって表現度を決めるメカニズムの理解から発生の頑強性、ストレス応答や健康寿命を支える新たな仕組みの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) カスパーゼの基礎的活性化プラットフォームの解明

アポトーシス時の強力な活性化の影に隠れて見えづらかった BCP 活性化の研究は、その生理機能を理解する上で鍵となる重要度を持つ。カスパーゼが活性化し機能する微小環境である「BCP 場」を包括的に捉えるためカスパーゼ近傍に存在するタンパク質を近接依存標識

法 TurboID によってショウジョウバエ組織、細胞を用いて同定する。

#### (2) BCP 基質の同定と解析

上記カスパーゼ近傍に存在するタンパク質から基質となる分子を同定し、その機能を解析する。

#### (3) カスパーゼ活性化状態の解析系の構築

BCP 場では細胞内局所でのカスパーゼ活性があり、生理機能を調節すると考えられる。よって、細胞内局所でのカスパーゼ活性化を FRET probe によって検出するプローブを作成する。Gal4/UAS システムを利用した高感度カスパーゼ活性検出レポーター (CaspaseTracker) の原理を応用し、特定の細胞種のみで高感度かつ非侵襲的にカスパーゼ活性化動態を補足するレポーター系統を作出する。

#### (4) BCP 調節に関わるゲノムワイドなスクリーニング系の構築

ショウジョウバエにはゲノム配列が解読された約 200 系統の野生型 (*Drosophila* Genetic Reference Panel (DGRP) 系統が整備されており、Genome-Wide Association (GWA) mapping を用いたゲノムワイドスクリーニングが可能である。DGRP を用いた大剛毛数のばらつきを指標にしたスクリーニングにより BCP に関わるゲノム領域を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) カスパーゼの基礎的活性化プラットフォームの解明

ショウジョウバエ脳においてカスパーゼの活性化を制御する近接タンパク質を探索した。その結果、過剰発現によりカスパーゼの活性化を促進する分子として、細胞接着タンパク質 Fasciclin 3 (Fas3) を同定した。Fas3の過剰発現は細胞死を誘導しないことから、BCPの活性化を制御することが示唆された。

#### (2) BCP 基質の同定と解析

カスパーゼ近傍に存在するタンパク質から、哺乳類でのカスパーゼ基質も参考に、ショウジョウバエにおける BCP 基質を探索した。その結果、細胞分裂時の染色体分離を保證する Spindle Assembly Checkpoint 構成因子である *Drosophila* BubR1 を BCP 基質として同定した。また、カスパーゼの切断部位として D451 と D571 の 2 カ所を同定した。BubR1 切断の生理的意義を解析するため、BAC レスキュー法を用いて非切断型 BubR1 変異体ショウジョウバエ系統を作出した。翅成虫原基を用いた細胞分裂時のライブイメージング解析から、微小管重合をコルヒチンを用いて阻害した時に変異体では野生型と比較して分裂期の延長が観察され、非切断型変異は機能強化変異である可能性が示唆された。マウスを用いた研究から、BubR1 の機能強化は寿命の延長に寄与することが示されている。そこで、作出した系統の寿命を測定したところ、非切断型変異体で野生型と比較して寿命の延長が確認された。以上の結果から、カスパーゼが BCP 基質である BubR1 の切断を介して非細胞死性に寿命を制御する可能性を見出した。

#### (3) カスパーゼ活性化状態の解析系の構築

カスパーゼの細胞内局所に限局した活性の可視化を目的として、FRET を基盤としたカスパーゼ活性検出プローブ SCAT3 を改良したイメージングシステムの構築を行なった。現在までに、プローブへのオルガネラ局在シグナルの付与、蛍光タンパク質への monomeric 変異の導入、mKO /mKate2 FRET ペアの導入を行なった。これらの改良型プローブを用い、mECFP/mVenus FRET ペアと mKO /mKate2 FRET ペアによる細胞内の異なる場所でのカスパーゼ活性の同時イメージングに成功した。

近接タンパク質がカスパーゼ活性に及ぼす影響を評価するために、Gal4/UAS システムにより狙った細胞種のみで高感度にカスパーゼ活性を可視化しつつ、同時に遺伝子操作を可能とする新規高感度カスパーゼ活性レポーター系統 (gal4-Manipulated Area Specific CaspaseTracker/CasExpress (MASCaT)) を作出した。MASCaT の開発は Fas3 による BCP 活性化制御の解析に有効であった。

#### (4) BCP 調節に関わるゲノムワイドなスクリーニング系の構築

感覚剛毛数の表現度に関わる遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを、ゲノム配列が解読されている野生型 (*Drosophila* Genetic Reference Panel (DGRP) 系統を用いたGenome-Wide Association Study (GWAS) (Mackay et al., Nature 482, 173, 2012)の手法を用いて行った。これまでの解析によって表現度を司る候補SNPsが複数検出され、これらのSNPsを有する遺伝子が表現度に影響するかの解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Awazu Midori, Yamaguchi Yoshifumi, Nagata Michio, Miura Masayuki, Hida Mariko	4. 巻 559
2. 論文標題 Caspase-3 regulates ureteric branching in mice via cell migration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 28 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Anegawa Daisuke, Sugiura Yuki, Matsuoka Yuta, Sone Masamitsu, Shichiri Mototada, Otsuka Reo, Ishida Noriko, Yamada Ken-ichi, Suematsu Makoto, Miura Masayuki, Yamaguchi Yoshifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived $\alpha$ -tocopherol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02297-6	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 Yoshida Ayako, Kawata Daisuke, Shinotsuka Naomi, Yoshida Mariko, Yamaguchi Yoshifumi, Miura Masayuki	4. 巻 170
2. 論文標題 Evidence for the involvement of caspases in establishing proper cerebrospinal fluid hydrodynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Kyoko, Oi Ayano, Kosakamoto Hina, Yamauchi Toshitaka, Kadoguchi Hibiki, Kuraishi Takayuki, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of innate immunity during development induces unresolved dysbiotic inflammatory gut and shortens lifespan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 49103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.049103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sim Erinn Zixuan, Enomoto Takayuki, Shiraki Nobuaki, Furuta Nao, Kashio Soshiro, Kambe Taiho, Tsuyama Tomonori, Arakawa Akihiro, Ozawa Hiroki, Yokoyama Mizuho, Miura Masayuki, Kume Shoen	4. 巻 40
2. 論文標題 Methionine metabolism regulates pluripotent stem cell pluripotency and differentiation through zinc mobilization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111120 ~ 111120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111120	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 Kosakamoto Hina, Okamoto Naoki, Aikawa Hide, Sugiura Yuki, Suematsu Makoto, Niwa Ryusuke, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Sensing of the non-essential amino acid tyrosine governs the response to protein restriction in Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 944 ~ 959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-022-00608-7	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 Mizuno Rin, Hojo Hiroaki, Takahashi Masatomo, Kashio Soshiro, Enya Sora, Nakao Motonao, Konishi Riyo, Yoda Mayuko, Harata Ayano, Hamanishi Junzo, Kawamoto Hiroshi, Mandai Masaki, Suzuki Yutaka, Miura Masayuki, Bamba Takeshi, Izumi Yoshihiro, Kawaoka Shinpei	4. 巻 13
2. 論文標題 Remote solid cancers rewire hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide-N-methyltransferase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30926-z	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 Hayashi Yoshiki, Kashio Soshiro, Murotomi Kazutoshi, Hino Shinjiro, Kang Woojin, Miyado Kenji, Nakao Mitsuyoshi, Miura Masayuki, Kobayashi Satoru, Namihira Masakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Biosynthesis of S-adenosyl-methionine enhances aging-related defects in Drosophila oogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-09424-1	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 Kosakamoto Hina, Obata Fumiaki, Kuraishi Junpei, Aikawa Hide, Okada Rina, Johnstone Joshua N., Onuma Taro, Piper Matthew D. W., Miura Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Early-adult methionine restriction reduces methionine sulfoxide and extends lifespan in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-43550-2	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 Fujita Sosuke, Takahashi Mako, Kumano Gaku, Kuranaga Erina, Miura Masayuki, Nakajima Yu-ichiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Distinct stem-like cell populations facilitate functional regeneration of the <i>Cladonema medusa</i> tentacle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3002435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3002435	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 Nagai Hiroki, Nagai Luis Augusto Eijy, Tasaki Sohei, Nakato Ryuichiro, Umetsu Daiki, Kuranaga Erina, Miura Masayuki, Nakajima Yuichiro	4. 巻 58
2. 論文標題 Nutrient-driven dedifferentiation of enteroendocrine cells promotes adaptive intestinal growth in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 1764 ~ 1781.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2023.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashio Soshiro, Masuda Shu, Miura Masayuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Involvement of neuronal tachykinin-like receptor at 86C in <i>Drosophila</i> disc repair via regulation of kynurenine metabolism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107553 ~ 107553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107553	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 Natsuki, Horikoshi Misuzu, Taira Yusuke, Muramoto Masaya, Hirayama Shoshiro, Murata Shigeo, Miura Masayuki	4. 巻 290
2. 論文標題 Caspase cleaves <i>Drosophila</i> to modulate spindle assembly checkpoint function and lifespan of the organism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 4200 ~ 4223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Shotaro, Kashio Soshiro, Nishimura Kei, Takeishi Asuka, Kosakamoto Hina, Obata Fumiaki, Kuranaga Erina, Chihara Takahiro, Yamauchi Yoshio, Isobe Toshiaki, Miura Masayuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Damage sensing mediated by serine proteases Haya and Persephone for Toll pathway activation in apoptosis-deficient flies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010761	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 Hikawa Naoto, Kashio Soshiro, Miura Masayuki	4. 巻 300
2. 論文標題 Mating-induced increase of kynurenine in <i>Drosophila</i> ovary enhances starvation resistance of progeny	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105663 ~ 105663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2024.105663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosakamoto Hina, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 151
2. 論文標題 Epidermal tyrosine catabolism is crucial for metabolic homeostasis and survival against high-protein diets in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev.202372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.202372	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9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masayuki Miura
2. 発表標題 Genetic control of animal aging by amino acids metabolism
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会国際シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦正幸
2. 発表標題 代謝による個体老化の臨界期制御
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦正幸
2. 発表標題 個体老化を制御する栄養感受性臨界期の存在
3. 学会等名 第41回日本認知症学術集会、第37回日本老年精神医学会合同開催（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平雄介、篠田夏樹、三浦正幸
2. 発表標題 アポトーシスにおける細胞内局所的カスパーゼ活性の解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村本雅哉、花輪望未、篠田夏樹、三浦正幸
2. 発表標題 生体膜に局限した非細胞死性カスパーゼ反応場の発見とその機能解析
3. 学会等名 第30回 日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki Miura
2. 発表標題 Non-lethal caspase activation in aged Drosophila olfactory neurons
3. 学会等名 Japan Australia Meeting on Cell Death (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦正幸
2. 発表標題 カスパーゼ生体機能の探索
3. 学会等名 第31回日本Cell Death学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平雄介、篠田夏樹、三浦正幸
2. 発表標題 Dual FRETシステムを基盤とした細胞内局所的カスパーゼ活性の解析
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠田夏樹、堀越水涼、平雄介、村本雅哉、平山尚志郎、村田茂穂、三浦正幸
2. 発表標題 カスパーゼは紡錘体チェックポイント構成因子BubR1を切断し、シヨウジョウバエ個体の寿命を制限する
3. 学会等名 第31回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------