

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840088

研究課題名(和文)細胞死耐性獲得をもたらす遺伝的制御メカニズム

研究課題名(英文)Genetic mechanisms for the acquisition of cell-death resistances

研究代表者

谷口 喜一郎(Taniguchi, Kiichiro)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：20554174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖能が低い組織は、生理的に細胞死耐性を獲得することで長期生存が可能になると考えられている。しかしながら、生体組織において細胞死耐性を実証した研究はほとんどない。本研究ではショウジョウバエ付属腺・脂肪体・後腸を用いて、細胞死の一つであるアポトーシスに対する耐性の解明に取り組んだ。付属腺・脂肪体・後腸は、強いアポトーシス耐性を示す組織である。解析の結果、付属腺・脂肪体・後腸においては共通して、エフェクターカスパーゼDcp-1の発現が低下しており、アポトーシス耐性をもたらしていることが明らかになった。また後腸では、カスパーゼ下流においても何らかの抑制機構を獲得していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis is a controlled cell death and a key process to eliminate malfunctioning and/or damaged cell for maintaining tissue homeostasis. Interestingly, the sensitivities to the stress-inducible apoptosis vary in different tissue. The sensitivities to the apoptosis is considered to be due to the acquisition of resistances to apoptosis. However, there are little studies that evidently demonstrates the physiological resistances to apoptosis in animal tissues. Here, we examined the physiological resistances to apoptosis in *Drosophila* tissues, male accessory gland, larval fat body and adult hindgut. In the results, we found that suppressed transcription of Dcp-1, an effector Caspase, was associated with resistances to apoptosis commonly in male accessory gland, larval fat body and adult hindgut. We also found that the hindgut additionally acquired some kind of suppression control downstream of effector Caspases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アポトーシス アポトーシス耐性 ショウジョウバエ カスパーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織恒常性は、細胞死による細胞の排除(細胞数の削減)と細胞増殖による細胞の補充(細胞数の増加)の絶妙なバランスによって維持されている。例えば、細胞増殖能が発達した組織では、細胞傷害に対する感受性も高く、細胞排除が積極的におこなわれる。一方で、組織構造・性質的に細胞増殖が抑えられた組織では、細胞死耐性を獲得することで、細胞の長期生存を可能にしていると考えられている(図1)。例えば、心筋組織においては、細胞死抑制遺伝子の発現が高いことが知られている。神経細胞においてもアポトーシス活性化因子の発現低下が起こることが知られている。また、アポトーシス耐性を病的に獲得することが、様々な組織破綻につながることも知られており、腫瘍組織その代表例といえる。このように、アポトーシス耐性の獲得は、組織多様化や恒常性維持において重要な要素といえる。一方で、生体組織において生理的なアポトーシス耐性を実証した例は極めて少ない。

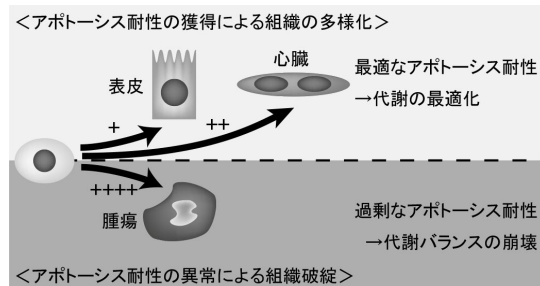


図1. アポトーシス耐性獲得と組織多様化

(2) 近年、ショウジョウバエ倍化組織(有糸分裂を行わずにDNA複製のみを行うことで核相が4N以上となる組織)に見られる、細胞死耐性に関して重要な報告がなされた。ショウジョウバエ倍化組織は、DNA傷害耐性を獲得している細胞である。この細胞死耐性の獲得は、アポトーシス誘導因子であるRHG遺伝子の転写が不活化することに起因する。一方で、RHG遺伝子を人為的に強制発現してもなお、細胞死を誘導できない組織が多数存在している。この結果は、いくつかのショウジョウバエ組織では、下流のシグナル経路において、多段階的に細胞死耐性が獲得されていることを意味している。

2. 研究の目的

(1) 多段階的な細胞死耐性の獲得メカニズムを理解するために、代表者は、ショウジョウバエ雄生殖器附属腺(以降は附属腺と略す)を用いた。附属腺は、i) RHG遺伝子の強制発現はアポトーシスを誘導しない、ii) エフェクターカスパーゼの強制発現は細胞死を誘導するという特徴を示した。この結果は、RHGより下流かつエフェクターカスパーゼより上流において、アポトーシス抑制制御を獲得していることを示唆している。そこで本研

究計画では、附属腺におけるアポトーシス耐性の抑制制御点の同定と制御メカニズムの解明を目指す。

(2) ショウジョウバエの組織には附属腺と同様に、DNA傷害やRHG遺伝子の強制発現においてもアポトーシスが誘導されない組織が存在する。これらの組織において、アポトーシス耐性制御点と制御メカニズムを解析し、附属腺との相違点・共通点について調べる。本研究計画では、アポトーシス耐性を持つショウジョウバエ組織として、幼虫脂肪体(中胚葉性組織)と成虫後腸(外胚葉性組織)を用いる。これらは、発生学的に由来の異なる組織であり、比較解析によりアポトーシス耐性獲得の多様性の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 代表者は、附属腺の細胞死耐性獲得に関与する最下流の制御点は、アポトーシス誘導因子であるRHG遺伝子より下流、活性化型エフェクターカスパーゼより上流に存在することを明らかにしている。そこで、この間のシグナル経路に含まれる因子(Dark, Dronc, Drice, Dcp-1、図2)について強制発現実験をおこない、アポトーシス誘導の可否を調べた。本実験では、Ay-Gal4システムを用いたFlip-out法とTub-Gal80^{TS}系統TARGETシステムを用いて遺伝的モザイクを作成し、任意の遺伝子について20時間または40時間の一過的な強制発現を行った。本強制発現アッセイにおいて、アポトーシス誘導が可能である遺伝子の中で再上流の遺伝子が、アポトーシス抑制制御点の候補といえる。幼虫脂肪体・成虫後腸についても、本強制発現アッセイを用いて解析を行った。

<アポトーシス経路の概要>

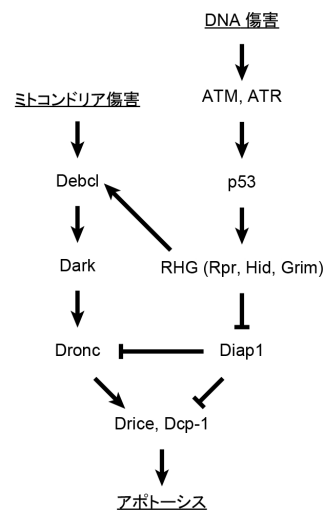


図2. アポトーシス経路と構成遺伝子の概要

(2) アポトーシス耐性を獲得するためのシンプルな制御機構として、アポトーシス関連遺伝子の発現制御が予想できる。そこで、半

定量 RT-PCR 法により任意の遺伝子の発現量の測定をおこなった。翅成虫原基(アポトーシス感受性組織)を比較コントロールとして用い、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸における遺伝子発現量との比較をおこなう。発現量を評価した遺伝子は、*Dark*, *Diap1*, *Diap2*, *Dronc*, *Strica*, *Dredd*, *Drice*, *Dcp-1*, *Damm*, *Decay*, *Drep-1*, *Drep-4* であり、リファレンス遺伝子には *Rpl32* を用いた。

(3) 本研究成果により、アポトーシス耐性には *Dcp-1* 遺伝子の発現抑制が関与していることが明らかになった。mRNA の発現抑制は、転写/エンハンサー依存的に制御されることが知られている。一方で過去の研究において、*Dcp-1* 遺伝子は miRNA によりタンパク質発現制御を受けていることが示唆されている。miRNA 制御は、標的遺伝子の翻訳抑制を行うと同時に mRNA の不安定化を行うため、mRNA 量にも影響を与える可能性がある。そこで、同定遺伝子の発現制御がエンハンサー依存的であるかを調べる。*Dcp-1* 遺伝子のエンハンサーレポーターである *Dcp-1-lacZ* を用いて、判定量 RT-PCR により *lacZ* mRNA 量を調べた。翅成虫原基を比較コントロールとして用い、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸における *lacZ* 発現量との比較を行った。リファレンス遺伝子には *Rpl32* を用いた。

4. 研究成果

(1) 附属腺において、アポトーシス関連遺伝子 (*Dark*: カスパーゼ活性化因子, *Dronc*: イニシエーターカスパーゼ, *Drice*: エフェクターカスパーゼ, *Dcp-1*: エフェクターカスパーゼ) について単独での強制発現実験を行った。その結果、附属腺においてアポトーシスを誘導した遺伝子は、*Dcp-1* のみであった。*Ark*, *Dronc*, *Drice* のアポトーシス誘導能について、さらなる検証をするために、*rpr* との共発現実験 (*rpr+Dark*, *rpr+Dronc*, *rpr+Drice*) による検証も行った。その結果、いずれの場合においても、附属腺においてアポトーシスは誘導されなかった。

さらに、幼虫脂肪体・成虫後腸においても同様の強制発現を行った。その結果、幼虫脂肪体においては、附属腺と同様に、*Dcp-1* のみがアポトーシスを誘導した。一方で、成虫後腸においては、いずれの遺伝子もアポトーシスを誘導しなかった。これらの結果は、附属腺・幼虫脂肪体におけるアポトーシス抑制制御点は、共に *Dcp-1* 遺伝子であることを示唆している。一方で、成虫後腸におけるアポトーシス制御点は不明だが、カスパーゼ経路の下流に存在することを示唆している。

(2) 判定量 RT-PCR 法を用い、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸においてアポトーシス関連遺伝子の発現量を測定した (図 3)。その結果、附属腺・幼虫脂肪体では、*Dcp-1* の発現量が低いことが明らかになった (図 3)。この結果

は、強制発現アッセイの結果と一致しており、附属腺・幼虫脂肪体におけるアポトーシス耐性は *Dcp-1* の発現抑制によることが示唆された。興味深い点として、*Dcp-1* の発現は、成虫後腸においても低下がみられた (図 3)。強制発現アッセイの結果を考慮すると、1) 附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸では共通のアポトーシス耐性として *Dcp-1* の発現抑制が起きている、2) 成虫後腸ではさらに下流においてもアポトーシス耐性を獲得していると総括できる。

その他のアポトーシス関連遺伝子についても、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸において発現量が多様であることが明らかになった (図 3)。*Dark* は、幼虫脂肪体において発現量が低かった。*Dronc* は、成虫後腸において発現量が低かった。*Strica* は、幼虫脂肪体において発現量が高かった。*Drice* は、成虫後腸において発現量が低かった。*Damm* は、成虫後腸において発現量が高かった。*Decay* は、幼虫脂肪体・成虫後腸で特異的な発現が見られた。*Dark*, *Dronc*, *Drice* の発現低下は、アポトーシス感受性を低下させる要因になりうる。*Strica*, *Damm*, *Decay* の発現上昇はアポトーシス感受性を上昇させる要因になりうる。一方で、これらアポトーシス関連遺伝子の発現変動が、アポトーシス感受性に関与しているという証拠は得られていない。また、*Damm*, *Decay* といったカスパーゼによるアポトーシス制御については不明な点が多い。しかしながら、これらの結果は、組織ごとにカスパーゼ活性化能が潜在的に異なる可能性を示唆している。

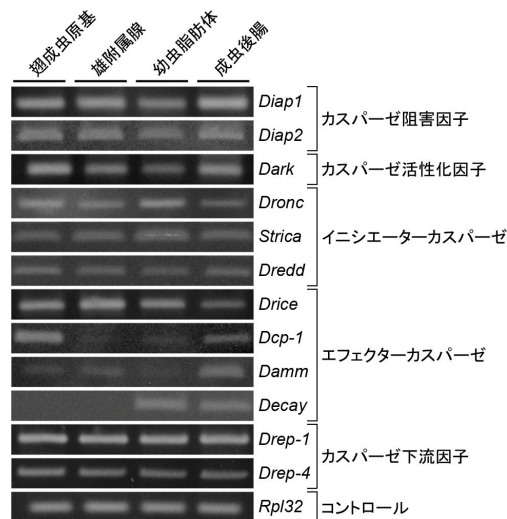


図 3. アポトーシス関連遺伝子の発現量測定

(3) 本研究において、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸が共通して獲得するアポトーシス耐性として、*Dcp-1* の発現抑制の存在が明らかになった。そこで、*Dcp-1* の発現制御がエンハンサー依存的であるかどうかを調べた。*Dcp-1* のエンハンサー活性依存的に *lacZ* を発現する *Dcp-1-lacZ* を用いて、附属腺・幼虫

脂肪体・成虫後腸における *lacZ* 発現量を判定量 RT-PCR により調べた。その結果、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸では翅成虫原基と比べて *lacZ* の発現量が低かった。この結果は、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸における、*Dcp-1* の発現低下は、エンハンサー依存的であることが明らかになった。

(4) 本研究により、ショウジョウバエ組織では次のような多段階的なアポトーシス耐性の獲得が生じている可能性が考えられた。ショウジョウバエ組織の中で、倍加組織では、*RHG* 遺伝子の不活化によってアポトーシス耐性を獲得することが、海外のグループにより報告されており、これが第一の獲得といえる(図 4)。これにより、DNA 傷害によるアポトーシス応答がブロックされることになる。

今回の研究により、倍加細胞の一部(附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸)では、*Dcp-1* 遺伝子の転写抑制による第二のアポトーシス耐性を獲得することが明らかになった(図 4)。これにより、カスパーゼ経路の活性化応答が大きく低下することになる。興味深い点として、附属腺・幼虫脂肪体・成虫後腸は発生学的に由来が異なる組織であるにもかかわらず、同様の制御機構を獲得する点である。また、成虫後腸は、カスパーゼ下流においても、アポトーシス耐性を獲得していることが示唆された(図 4)。今回の研究成果により、アポトーシス耐性が段階的に獲得されることで、アポトーシス感受性多様化していることが実証された。

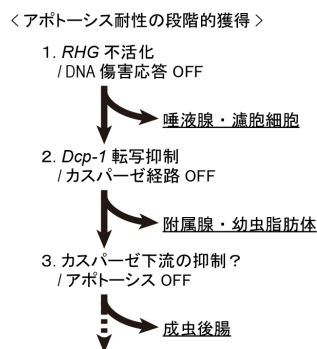


図 4. アポトーシス耐性獲得モデル

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 5 件)

Okumura T., Takeda K., Kuchiki M., Akaishi M., Taniguchi K., Adachi-Yamada, T., GATAe regulates intestinal stem cell maintenance and differentiation in *Drosophila* adult midgut, *Developmental Biology*, 査読有、410 巻、2016、24-35
DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.12.017

Okumura T., Sasamura T., Inatomi M., Hozumi S., Nakamura M., Hatori R., Taniguchi K., Nakazawa N., Suzuki E., Maeda R., Yamakawa T., Matsuno K., Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric development in *Drosophila*, *Genetics*, 査読有、119 巻、2015、1183-1199

DOI: 10.1534/genetics.115.174698

Taniguchi K., Kokuryo A., Imano T., Minami R., Nakagoshi H., Adachi-Yamada T., Isoform-specific functions of Mud/NuMA mediate binucleation of *Drosophila* male accessory gland cells, *BMC Developmental Biology*, 査読有、14 巻、2014、46

DOI: 10.1186/s12861-014-0046-5

Okumura T., Takeda K., Taniguchi K., Adachi-Yamada T., betanin integrin inhibits chronic and high level activation of JNK to repress senescence phenotypes in *Drosophila* adult midgut, *PLoS One*, 査読有、9 巻、2014、e89387

DOI: 10.1371/journal.pone.0089387

Hatori R., Ando T., Sasamura T., Nakazawa N., Nakamura M., Taniguchi K., Hozumi S., Kikuta J., Ishii M., Matsuno K., Left-right asymmetry is formed in individual cells by intrinsic cell chirality, *Mechanisms of Development*, 査読有、133 巻、2014、146-162

DOI: 10.1016/j.mod.2014.04.002

〔学会発表〕(計 4 件)

谷口 喜一郎、ショウジョウバエ組織における生理的アポトーシス耐性の解析、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015/12/1-4、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

谷口 喜一郎、Isoform-specific functions of Mud/NuMA mediate binucleation of *Drosophila* male accessory gland cells, 11th Japanese *Drosophila* Research Conference、2014/6/4-6、金沢歌劇座(石川県・金沢市)

谷口 喜一郎、Isoform-specific functions of Mud/NuMA mediate binucleation of *Drosophila* male accessory gland cells, 55th Annual *Drosophila* Research Conference、2014/3/26-30、San Diego (U.S.A.)

谷口 喜一郎、Mud/NuMA はショウジョウバエ雄生殖器附属腺において細胞二核化を制御する、第 65 回日本細胞生物学

会大会、2013/6/19-21、ウインクあいち
(愛知県・名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~e090001/>

6．研究組織

(1)研究代表者

谷口 喜一郎 (TANIGUCHI, Kiichiro)

学習院大学・理学部生命科学科・助教

研究者番号：20554147

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し