

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07378

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Acquisition of apoptosis resistances in Drosophila tissue

研究代表者

谷口 喜一郎 (Taniguchi, Kiichiro)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：20554174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス耐性は様々な組織において生理的に獲得されており、細胞の長期維持に寄与すると考えられている。興味深いことに、アポトーシス耐性は様々な病理組織においても獲得されることが知られている。今回、ショウジョウバエ倍加組織および人為的に誘導した異常倍加組織をもちいて、生理的・病的アポトーシス耐性の解明をおこなった。その結果、倍加組織である附属腺・脂肪体における生理的アポトーシス耐性は、実行カスパーゼDcp-1の発現低下によることがわかった。一方で、病的アポトーシス耐性を獲得する異常倍加組織では、同様に実行カスパーゼの発現低下が生じていたが、標的遺伝子はDcp-1ではなくDriceであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、生理的アポトーシス耐性を有する複数の組織において、共通して実行カスパーゼDcp-1の発現低下が生じていることがわかった。またDcp-1の発現低下自身が実際にアポトーシス耐性の実体であることも実証した。興味深いことに、検証した組織の一つである後腸では、Dcp-1低下に加えてさらに下流に抑制制御標的が存在していた。これは、アポトーシス耐性が多段階的に生じることで多様化する可能性を示唆している。また、病的アポトーシス耐性を誘導する染色第倍加は多くの腫瘍組織で見いだされる形質でもあり、本結果は腫瘍の薬剤耐性獲得の理解にも貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The sensitivities to inducible apoptosis vary among different tissues in animals. The resistances to apoptosis are acquired in several animal tissues probably to enable cell to survive for long-term. Interestingly, certain kinds of pathological tissue also acquire resistances to apoptosis. Here, I examined these physiologically- and pathologically-acquired resistances to apoptosis using Drosophila endoreplicate tissue and artificially-induced endoreplicate tissue, respectively. As a result, physiological endoreplicate tissues, accessory gland, fat body, hindgut similarly showed the reduction of effector Caspase Dcp-1. In addition, the overexpression of Dcp-1 but not upstream Caspase Drnc caused apoptosis in accessory gland and fat body. These results suggest that silencing of Dcp-1 is common regulation to acquire resistances to apoptosis. In contrast, the artificial induction of endoreplication caused reduction of another effector Caspase Drice.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アポトーシス耐性 カスパーゼ 組織恒常性 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

遺伝的に正常な組織であっても、各種ストレス (DNA 傷害・酸化ストレス、...等) にさらされることにより、突発的に異常細胞を生じるリスクがある。異常細胞は、組織に悪影響を与える可能性がある。このような危険性を前もって回避する仕組みの一つとして、アポトーシスによる自発的な細胞死が存在する。アポトーシスは、DNA 傷害や酸化ストレス等により誘導されることが知られており、そのシグナル経路は線虫からヒトに至るまで保存されている。

興味深いことに、アポトーシス感受性は、組織ごとに多様化していることが知られている。このようなアポトーシス感受性は、組織代謝とある程度の相関がみられる。例えば、組織の新陳代謝が活発な組織 (表皮・消化管) はアポトーシス感受性も高く、代謝を抑えて組織構築を高度化させた組織 (骨格筋・心臓) はアポトーシス感受性が低い。これらの事実から、多くの組織は、代謝バランスに応じて何らかの“生理的アポトーシス耐性”を獲得し、アポトーシス感受性を多様化させていると予想できる。しかしながら、アポトーシス耐性の多様化については、その実態の多くは不明である。

また、アポトーシス感受性の異常は様々な組織破綻をもたらすことが知られている。たとえば腫瘍組織は“病理的なアポトーシス耐性”を獲得した組織の代表といえる。近年、ショウジョウバエを用いた研究において、染色体倍加組織に見られる生理的アポトーシス耐性に関する報告がなされた。ショウジョウバエの染色体倍化組織は、高い細胞傷害耐性を獲得している細胞である。このアポトーシス耐性の獲得は、p53 転写因子依存的な DNA 傷害応答が欠損するという、癌化の初期ステップに類似する機構によることが示唆された。一方で、代表者は、p53 下流の細胞死誘導因子 Reaper を人為的に誘導してもアポトーシスがおこらない組織が、多数存在していることをみいだした。これらの結果は、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

代表者は、ショウジョウバエにおいて複数の倍加組織がアポトーシス誘導因子 *reaper* を強制発現してもアポトーシスが起こらないことをみいだしている。すなわち、アポトーシス耐性制御点は、Reaper 下流のカスパーゼ経路に存在すると考えられた。今回、発生学的に起源が異なる3つの組織、幼虫脂肪体・生殖器附属腺・成虫後腸をモデルとして用いた。また、アポトーシス耐性を持たない一般的な組織としては幼虫翅原基を用いた。本研究では、これら3つのアポトーシス耐性組織においてアポトーシス耐性制御点の実体を明らかにし、共通点・相違点をみいだすことをめざす。

また代表者は、人為的に染色体の異常倍加を誘導することで同様にアポトーシス耐性を誘導することもみいだしている。染色体倍数性の異常は、腫瘍組織でもよく見られる異常であることから、この異常倍加組織を病理的アポトーシス耐性獲得組織のモデルとして用いて同様にアポトーシス制御点を明らかにする。

3. 研究の方法

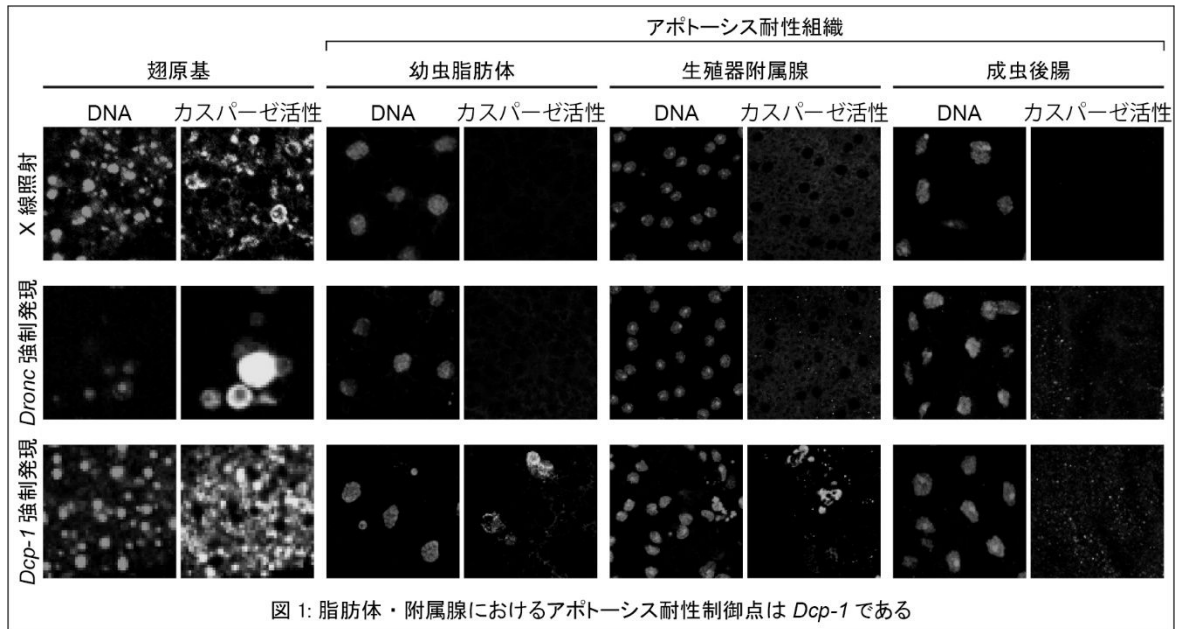
(1) 脂肪体・生殖器附属腺・後腸における生理的アポトーシス耐性の制御点を明らかにするために、カスパーゼ遺伝子群の強制発現をおこない細胞死誘導が生じる制御ポイントを明らかにする。すなわち、あるカスパーゼ遺伝子の強制発現において、アポトーシスが生じた場合は制御点はその上流に存在し、生じなかった場合は制御点はその下流と判断する。また、カスパーゼ遺伝子群およびカスパーゼ抑制遺伝子群の mRNA 発現レベルを RT-PCR により調べる。

(2) アポトーシス制御点の候補遺伝子 (上記(1)の結果より) の発生学的な獲得ステージおよび制御メカニズムを明らかにする。アポトーシス誘導因子をコードする *reaper* を各々の組織において発生ステージ特異的 (運命決定後・増殖期・成熟期) に誘導し、アポトーシス耐性が生じる段階を明らかにする。また各々の組織において、共通性の高い制御としてエクジソン・ゲノム不活化・マイクロ RNA の関与について調べ、アポトーシス耐性 (例えば候補遺伝子の抑制) をもたらす制御メカニズムを明らかにする。

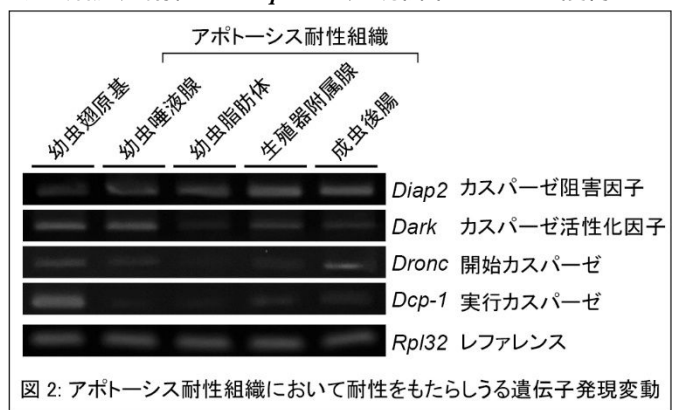
(3) 人為的に誘導した倍加異常組織を用いて病理的アポトーシス耐性獲得の分子メカニズムを明らかにする。カスパーゼ遺伝子群およびカスパーゼ抑制因子について、mRNA 発現レベルを RT-PCR により明らかにする。また(2)と同様に、制御メカニズムの解明をおこない、生理的アポトーシス耐性との共通点・相違点をあきらかにする。

4. 研究成果

(1) 脂肪体・附属腺・後腸において、カスパーゼ活性化因子 *Dark*、開始カスパーゼ *Dronc* (全長およびプロセス型)、実行カスパーゼ *Dcp-1* および *Drice* (全長およびプロセス型) を一過的に強制発現させ、アポトーシスの有無を調べた (DNA 凝集とカスパーゼ活性化を指標とする)。その結果、*Dark*・*Dronc* (全長およびプロセス型) の強制発現は、いずれの組織においてもアポトーシスを全く誘導しなかった (図 1)。一方で、実行カスパーゼ *Dcp-1* (全長およびプロセス型) の強制発現は附属腺および脂肪体においてアポトーシスを強く誘導することがわかった (図 1)。これらの結果は、附属腺および脂肪体のアポトーシス耐性の下流制御点は *Dcp-1* であることが示唆された。意外な結果として、もう一つの実行カスパーゼ *Drice* (全長およびプロセス型) の強制発現は、いずれの組織においてもアポトーシスを誘導しなかった。この詳細については不明であるが、*Dcp-1* は自己活性化が可能であるのに対して、*Drice* は他のカスパーゼによる活性化が必要であることが理由かもしれない。一方で、後腸においては、いずれの因子を強制発現 (複数遺伝子の共発現も含める) してもアポトーシスが誘導されなかった (図 1)。この結果は、後腸ではカスパーゼ活性自体に対する下流応答機構が不活化していることが示唆している。



次に、脂肪体・附属腺・後腸においてカスパーゼ遺伝子群およびカスパーゼ阻害因子の発現を調べた (開始カスパーゼ活性化因子 *Dark*; 開始カスパーゼ *Dronc*, *Strica*, *Dredd*; 実行カスパーゼ *Drice*, *Dcp-1*, *Damm*, *Decay*; カスパーゼ阻害因子 *Diap1*, *Diap2*)。その結果、すべてのアポトーシス耐性組織において、*Dcp-1* の発現が低下していた。前述の強制発現実験の結果を踏まえると、少なくとも脂肪体と附属腺における細胞死耐性は *Dcp-1* の発現低下によって獲得されていることが示唆された (図 1)。一方、カスパーゼ下流の応答が不活化していると考えられた後腸においても *Dcp-1* の発現は低下していた (図 1)。また、各々の組織においてカスパーゼ制御遺伝子群の発現低下・発現上昇が多様に生じていた (図 1)。これらの結果は、倍加組織における共通標的は *Dcp-1* であるが、カスパーゼ関連遺伝子群の遺伝子発現が多様に制御されることで、多様なアポトーシス感受性が生み出されている可能性を示唆している。



(2) 脂肪体・生殖器附属腺・後腸におけるアポトーシス耐性が、どの段階の発生ステージにおいて獲得されているかを調べた。その結果、いずれの組織においても組織分化直後 (マーカー遺伝子の発現) の時点でアポトーシス耐性を獲得していた。分化時において *reaper* 強制発現モザイクをつくりだしたところ、その後の成熟組織においてもモザイクが排除されることなく生存していた。この結果は、アポトーシス耐性が組織分化直後に獲得されていることを示唆している。残念ながら、さらなる初期発生ステージにおける検証はできていない。また、各々の組織における分化制御に関与する遺伝子の RNAi 等を行ったが、現時点ではアポトーシス耐性への影響は確認できていない。

次に、アポトーシス耐性の実体として見いだされた実行カスパーゼ *Dcp-1* の発現抑制が、いかにして制御されているかについて検証した。脂肪体・生殖器附属腺・後腸においてエクジソン受容体 *EcR*、miRNA プロセッシングに關与する *drosha*、ヘテロクロマチン化に關与する *HP1* に対する RNAi を行い、X 線または *reaper* 強制発現に対するアポトーシス耐性が失われるかどうか検証した。しかしながら、いずれの条件においてもアポトーシスは誘導されなかった（アポトーシス耐性は失われない）。また、*Dcp-1* の発現についても検証したが、いずれの条件においても発現低下は失われなかった。今回、残念ながら *Dcp-1* の発現制御メカニズムの同定には至らなかったが、少なくともエクジソン・miRNA・ゲノム不活化といったグローバルの発現制御メカニズムには依存していないことが示唆された。

(3) M 期サイクリン阻害因子をコードする *fzr* を一過的に強制発現することで、人為的に異常な染色体倍加をゆうどうすることができる (図 2)。また、この倍加処理により通常は X 線においてアポトーシス誘導を生じる翅原基が、X 線非感受性になることをみいだしている。

まず、この倍加組織においてアポトーシス誘導因子である *reaper* の発現誘導がおきるか検証した。その結果、倍加組織では X 線照射を行わない場合においても *reaper* が誘導されており X 線照射時においては、さらに発現上昇がみられた。この結果は、倍加組織において X 線に対する初期応答は失われていないことがわかった。

次に、カスパーゼ遺伝子群およびカスパーゼ阻害遺伝子群 ((1)と同様の 10 遺伝子) の発現変動について調べた。その結果、倍加誘導により実行カスパーゼ *Drice* の発現が顕著に低下することがわかった。一方で興味深いことに、脂肪体・附属腺・後腸においてみられた *Dcp-1* の発現低下は、生じなかった。これらの結果より、生理的アポトーシス耐性と病的アポトーシス耐性はいずれも、実行カスパーゼを制御標的とするという共通性はあるものの、*Dcp-1* と *Drice* という異なる遺伝子を標的することがわかった。

最後に、倍加細胞における *Drice* の発現低下に寄与する制御メカニズムについて、(2)と同様に *EcR*、*drosha*、*HP1* に対する RNAi を行うことで、アポトーシス耐性が失われるかについて検証した。しかしながら、いずれの場合においても、X 線に対するアポトーシス耐性・*Drice* の発現低下といったアポトーシス耐性が失われることはなかった。

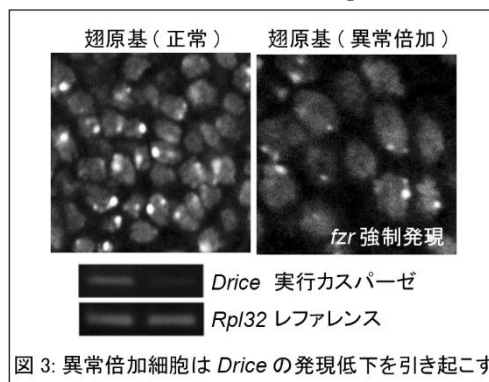


図 3: 異常倍加細胞は *Drice* の発現低下を引き起こす

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 谷口喜一郎, 井垣達氏	4. 巻 268
2. 論文標題 細胞極性の崩壊によるがん化のメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 496-500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kubo, A., Matsuka, M., Minami, R., Kimura, F., Sakata-Niitsu, R., Kokuryo, A., Taniguchi, K., Adachi-Yamada, T., Nakagoshi, H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Nutrient conditions sensed by the reproductive organ during development optimize male fecundity in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 557-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12600	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 Taniguchi, K., Kokuryo, A., Imano, T., Nakagoshi, H., Adachi-Yamada, T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Binucleation of Accessory Gland Lobe Contributes to Effective Ejection of Seminal Fluid in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 446-458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs170188	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 Takeda Koji, Okumura Takashi, Terahata Mayu, Yamaguchi Mio, Taniguchi Kiichiro, Adachi-Yamada Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 <i>Drosophila</i> Peptide Hormones Allatostatin A and Diuretic Hormone 31 Exhibiting Complementary Gradient Distribution in Posterior Midgut Antagonistically Regulate Midgut Senescence and Adult Lifespan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 75-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs160210	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 谷口 喜一郎, 井垣 達吏	4. 巻 12
2. 論文標題 細胞競合とがん	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 血液フロンティア	6. 最初と最後の頁 64-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 谷口 喜一郎, 井垣 達吏	4. 巻 6
2. 論文標題 細胞競合の分子機構とその生理的な意義	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ライフサイエンス 領域統合レビュー	6. 最初と最後の頁 e008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7875/leading.author.6.e008	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 Iida, C., Ohsawa, S., Taniguchi, K., Yamamoto, M., Morata, G., Igaki, T	4. 巻 9
2. 論文標題 JNK-mediated Slit-Robo signaling facilitates epithelial wound repair by extruding dying cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56137-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 該当する

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Taniguchi, K., Igaki, T.
2. 発表標題 Polarity-mediated cell competition shapes germ-line stem cell niche in Drosophila
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Cell Polarity Signaling (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taniguchi, K., Igaki, T.
2. 発表標題 Role of cell competition in shaping germ-line stem cell niche
3. 学会等名 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口喜一郎, 井垣達史
2. 発表標題 個体発生・維持におけるがん抑制型細胞競合の生理的役割
3. 学会等名 第7回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taniguchi, K., Igaki, T.
2. 発表標題 Tumor-suppressive cell competition shapes germ-line stem cell niche in Drosophila
3. 学会等名 Keystone Symposia, Cell Competition in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口 喜一郎, 井垣 達史
2. 発表標題 個体発生・維持におけるがん抑制型細胞競合の生理的役割
3. 学会等名 第7回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口喜一郎、安達卓
2. 発表標題 Binucleation of male accessory gland cells elevates reproductive capacity in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 12th Japanese <i>Drosophila</i> Research Conference
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Taniguchi, K., Igaki, T.
2. 発表標題 Cell competition effector Sas-Ptp10D facilitates apoptosis for the proper shaping of germ-line stem cell niche
3. 学会等名 The 5th Asia Pacific <i>Drosophila</i> Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takeda, K., Okumura, T., Taniguchi, K., Adachi-Yamada, T.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 308
3. 書名 <i>Drosophila</i> Models for Human Diseases (Adult Intestine Aging Modelを担当)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>井垣研究室・システム機能学 http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genetics/</p> <p>学習院大学・安達研究室 https://www.univ.gakushuin.ac.jp/sci/bio/laboratory/detail-adachi/</p>

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