

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15080

研究課題名（和文）カスパーゼ反応場から読み解く、その非細胞死性の機能

研究課題名（英文）The functional analysis of non-lethal caspase activity by deciphering caspase microenvironment

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究から、細胞死実行因子カスパーゼは反応場を形成することで、非細胞死性の活性化が可能となることが示唆されていた。本研究により、カスパーゼに近接し、非細胞死性の活性化を誘導する分子実体（細胞接着因子Fasciclin 3）が同定された。さらに、カスパーゼ近接タンパク質群が老化依存的に変容すること、老化依存的に近接するタンパク質の一部がカスパーゼの活性化を駆動することを示した。以上より、カスパーゼ反応場が流動的であり、それにより状況に応じた非細胞死性の作用が可能となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞死実行因子カスパーゼは、細胞死を超えて多くの生理機能を発揮する。しかし、その分子機構の理解は不十分である。本研究から、近接タンパク質で構成される反応場が、細胞内の一部に限局した非細胞死性の活性化を惹起する可能性を示した。さらに、反応場が老化依存的に変容し、それにより活性化が惹起される可能性を示した。本研究で提唱した、近接タンパク質によって構成される反応場という概念は、多義的な酵素の細胞内での振舞いとその作用を理解するに資するものである。

研究成果の概要（英文）：I have previously suggested the possibility that non-lethal activation of caspase is harnessed by its proximal proteins. In this study, I found that Fasciclin 3, one of the proximal proteins of caspase, facilitates non-lethal activation of caspase. Additionally, I discovered that the proximal proteins of caspase change in an aging-dependent manner. Moreover, a portion of the proximal proteins that change during aging promotes caspase activation. These results indicate that the caspase microenvironment is rather variable depending on the context, which could facilitate appropriate non-lethal functions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：カスパーゼ 非細胞死性の機能 TurboID APEX2 近接依存性標識法 ショウジョウバエ 老化 MASCa

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞死実行因子であるカスパーゼは、細胞死を超えて多くの生理機能を発揮することが報告されていた。興味深いことに、ショウジョウバエでは、発生過程においてほとんどの細胞が一度はカスパーゼの活性化を経験する(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性に及ぼす生理機能は極めて広範にわたることが期待されていた。カスパーゼの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。しかし、なぜ細胞死実行因子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った。研究代表者は研究開始当初までに、ショウジョウバエの実行カスパーゼであるDcp-1とDriceのうち、Dcp-1のみが非細胞死性に成虫原基の器官成長を促進することを示していた。また、近接依存性標識法TurboIDを導入し、Dcp-1とDriceそれぞれの近傍に存在するタンパク質群を質量分析により網羅的に探索、同定していた。Dcp-1とDriceがそれぞれに異なる近接タンパク質群を有していたことから、カスパーゼはそれぞれに固有の反応場を形成し、それにより固有の機能の発揮が可能となる可能性を示していた。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの実行カスパーゼであるDcp-1とDriceのうち、近接依存性標識法を駆使し、特にDcp-1に固有な反応場の解析を通して、新奇非細胞死性の生理機能の発見、及びカスパーゼが細胞を殺すことなく生理機能の発揮を可能とする分子基盤を解明することを研究開始当初の目的としていた。

3. 研究の方法

細胞死実行因子であるショウジョウバエ実行カスパーゼDcp-1とDriceは翅成虫原基においてそれぞれに固有の近接タンパク質群からなる反応場を形成することで、非細胞死性の機能をそれぞれに発揮することが想定された。そこで、カスパーゼ近接タンパク質群をより包括的に解析するため、近接依存性標識法APEX2を導入した。また、翅成虫原基と異なる組織であるショウジョウバエ成虫の脳においてもTurboIDによりカスパーゼ近接タンパク質群を同定し、組織間の比較解析を行った。さらに、成虫の脳においては加齢依存的な近接タンパク質群の変化も質量分析により評価した。研究開始当初、非細胞死性の微弱なカスパーゼの活性化を生体で検出するレポーターショウジョウバエ系統は限定的であった。そこで、これまでよりも高感度なカスパーゼ活性化検出レポーターショウジョウバエ系統(a gal4-Manipulated Area Specific CaspaseTracker/CasExpress; MASCaT)を作出した。これまでに、特定の嗅覚受容体神経において老化依存的なカスパーゼの活性化が観察されることが報告されていた。そこで、MASCaTにより検出されるカスパーゼの活性化を指標とし、老化依存的に増加する近接タンパク質群に対するRNAiスクリーニングを実施した。

4. 研究成果

これまでの自身の近接依存性標識法TurboIDを用いた研究から、細胞死実行因子であるショウジョウバエ実行カスパーゼDcp-1とDriceはそれぞれに固有の反応場を形成し、非細胞死性の機能を発揮することが示唆されていた。まず、カスパーゼ近接タンパク質群をより包括的に解析するため、近接依存性標識法APEX2を導入した。ショウジョウバエS2細胞において、実行カスパーゼに融合したTurboIDとAPEX2は、大部分は互いに異なるタンパク質群を同定した。共通に同定された少数のタンパク質を候補として、カスパーゼ活性に及ぼす影響を評価したところ、細胞死を誘導しない程度の弱い活性化を促すタンパク質が同定された。しかし、研究開始当初の目的としていたDcp-1の反応場を解析することは、1. TurboID/APEX2で同定した近接タンパク質をDcp-1と免疫共沈降することがほとんどの場合で不可能であり、さらなる生化学的な解析が難しいこと、2. 得られた候補タンパク質の大部分が機能未知のタンパク質であり、カスパーゼの新奇非細胞死性の機能を類推することが難しいこと、の2点からの難航した。

そこで、もう1つのショウジョウバエ実行カスパーゼであるDriceに焦点を絞り、研究を進めた。具体的にはまず、Dcp-1とDriceのうち、Driceのみを特異的に発現する組織であるショウジョウバエ成虫の脳においてTurboIDによりカスパーゼ近接タンパク質群を網羅的に同定した。同定した近接タンパク質群のうち、形質膜に存在するタンパク質である細胞接着因子Fasciclin 3がスプライシングアイソフォーム特異的にDriceと近接することを見出した。次に、Fasciclin 3がDriceの活性化に及ぼす影響を評価するため、これまでよりも高感度に形質膜のカスパーゼの活性化を検出するレポーターショウジョウバエ系統(a gal4-Manipulated Area Specific CaspaseTracker/CasExpress; MASCaT)を作出した。MASCaTを用いた解析から、Fasciclin 3が特定の嗅覚受容体神経において非細胞死性の活性化を惹起することを見出した。

以上の結果から、Drice においても近接タンパク質からなる固有の反応場が確かに存在し、それらが細胞内の一部（形質膜）に限局した活性化を惹起することで、非細胞死性の機能の発揮が可能となるとの仮説が支持された。

さらに、生理的条件下におけるカスパーゼ反応場の変動と、それによるカスパーゼ機能への影響の検証を目指した。まず、成虫の脳において加齢依存的な Drice 近接タンパク質群の変化を質量分析により網羅的に検出した。その結果、Drice 近接タンパク質群は老化依存的に変動することを見出した。これまでに、特定の嗅覚受容体神経において老化依存的なカスパーゼの活性化が観察されることが報告されていた。そこで、MASCAT によって検出されるカスパーゼの活性化を指標とし、老化依存的に増加する近接タンパク質群に対する RNAi スクリーニングを実施した。その結果、老化依存的にカスパーゼの活性化を促進する 2 つのタンパク質を同定した。以上の研究結果は、生体組織においてカスパーゼ近接タンパク質からなる固有の反応場が条件依存的に変動し、その結果としてカスパーゼの活性化が駆動される可能性を示す。

本研究では、カスパーゼが一群の近接タンパク質と形成する固有の反応場が、細胞内の一部に限局した非細胞死性の活性化を促す可能性を具体的な分子実体と共に示した。また、反応場が老化依存的に変容し、それにより老化依存的なカスパーゼの活性化が駆動される可能性を、その候補タンパク質と共に示した。今後、同定した候補タンパク質とカスパーゼとの分子的な関係性を解析することで、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、その分子機構の全容が明らかになることが期待される。また本研究で得られた成果から、老化依存的な近接タンパク質の変容を駆動する分子実体の存在が示唆された。また、カスパーゼ反応場の変容によりカスパーゼ活性の作用が変化する可能性も示された。これら 2 つの新たな研究課題が、本研究で樹立した方法論により、実験的に検証可能となりつつある。今後、これら研究課題に取り組むことで、カスパーゼのみならず、酵素反応一般がいかにして細胞、ひいては個体に対して多義的に作用するのか、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0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Natsuki Shinoda
2. 発表標題 Caspase and its proximal proteins define local activating platforms for non-lethal functions
3. 学会等名 The 2nd International Conference of Non-Lethal Roles of Cell Death Proteins (国際学会)
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 細胞内局所的カスパーゼ活性解析に向けたDual FRETシステムの構築
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 村本雅哉, 花輪望未, 篠田夏樹, 三浦正幸
2. 発表標題 生体膜に限局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 篠田夏樹, 三浦正幸
2. 発表標題 ミトコンドリアマトリックスに存在するカスパーゼ活性の解析
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会大会
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 日本細胞生物学会大会
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 Proximal proteins define the caspase activation platform for non-apoptotic functions
3. 学会等名 第15回 日本ショウジョウバエ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠田夏樹
2. 発表標題 非細胞死性の機能の発揮を可能とするカスパーゼ反応場の解析
3. 学会等名 第3回 細胞死コロキウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠田夏樹
2. 発表標題 ミトコンドリアマトリックスに存在するカスパーゼ活性の解析
3. 学会等名 第2回 細胞死コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平雄介, 篠田夏樹, 三浦正幸
2. 発表標題 局在型mSCAT3を用いた細胞内局所的カスパーゼ活性の解析
3. 学会等名 第29回 日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小木曾和志, 篠田夏樹, 三浦正幸
2. 発表標題 近接依存性標識法APEX2によるショウジョウバエアポトーシス実行カスパーゼ近傍タンパク質の解析
3. 学会等名 第29回 日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021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 ショウジョウバエにおける老化依存的なカスパーゼ活性を制御するカスパーゼ近傍タンパク質の解析
3. 学会等名 第29回 日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021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 Proximity labeling by TurboID identified a novel caspase activator causing neuronal apoptosis during aging
3. 学会等名 第14回 日本ショウジョウバエ学会
4. 発表年 2021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 Analysis of proximal proteins of caspases that are responsible for age-dependent activation in Drosophila
3. 学会等名 第64回 日本神経化学会大会
4. 発表年 2021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