

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659032

研究課題名（和文）脳恒常性維持過程におけるカスパーゼ活性動態の解明

研究課題名（英文） Approach to reveal dynamics of caspase activation in maintaining brain homeostasis

研究代表者

 山口 良文（YOSHIFUMI YAMAGUCHI）
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教
 研究者番号：10447443

研究成果の概要（和文）：

進化的に保存されたタンパク質切断酵素であるカスパーゼが、睡眠をはじめとする脳恒常性維持過程にどのように関与するのか解明することを目指した。本研究では、細胞死実行に深く関わるカスパーゼ-3と、炎症応答に関与するカスパーゼ-1の活性化を検出・可視化できる新規プローブを用いて、既存の手法では検出されていない脳恒常性維持に関与する微弱なカスパーゼ活性化の検出を試みた。しかしながら、これらの新規プローブでも微弱なカスパーゼ活性化は検出されなかった。今後、検出法の改善等が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Caspases are evolutionary conserved cystein protease. In this study, we tried to reveal dynamics of caspase activation in maintaining brain homeostasis. For this purpose, we utilized two novel probes that allow us to detect caspases-1 or caspase-3 in real-time. However, we have not detected weak or mild activation of those caspases in the brain derived from sleep-deprived mouse or in primary cell culture. These results suggest that further improvement in detection method will be needed to observe weak or mild activation of caspases by these probes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：脳、カスパーゼ、神経免疫

1. 研究開始当初の背景

脳恒常性維持の上で睡眠は必須な生命活動であるにも関わらず、その生理的意義や制

御機構の分子的・統合的理解は未だ途についたばかりであり、今後精力的な研究が必要な分野と言える。例えば、睡眠制御に関与する神経核や液性因子に関しては長年の研究に

より明らかになりつつあるが、断眠により脳を構成する個々の細胞あるいは組織にどのような不都合が生じるのか、といった睡眠の過不足に対する細胞応答の理解は未だ殆ど不明である。睡眠に対する細胞レベルでの応答機構を明らかにすることは、睡眠の果たす役割を明らかにすることにつながる。本研究は、既存の手法では明らかにされていないカスパーゼ活性化動態の検出を、新規トランスジェニックマウスを用いて試みる点が画期的であり既存の手法では得られない成果が期待された。

2. 研究の目的

本研究は、カスパーゼファミリーの中でも免疫応答に関与するカスパーゼ-1 と、シナプス可塑性や神経突起の刈り込みといった現象への関与が明らかになってきたカスパーゼ-3 が睡眠時の細胞応答にどのように関与するか明らかにしたい。そのため、まずこれらカスパーゼの活性化動態を解明する。具体的には、これまでの手法では検出されていない微弱・局所的なカスパーゼ活性を、カスパーゼ活性を検出できる蛍光プローブ SCAT (Sensor for caspase activation based on FRET) を導入し検出することを目指した。

3. 研究の方法

微弱なカスパーゼ活性の検出はチャレンジングな課題であるが、カスパーゼの細胞死以外の機能を明らかにしていく上では避けては通れないものである。そこで、カスパーゼ活性を検出できる蛍光プローブ SCAT を発現する新規トランスジェニックマウスに対して断眠や感染誘導睡眠という強い睡眠圧を生じる処理を行い、そのマウスの脳各領域での SCAT の切断をウエスタンブロッティングにより調べる「in vivo 基質切断アッセイ」を行う。SCAT は、カスパーゼ切断配列でつないだ ECFP と Venus の間で生じる FRET を利用する蛍光蛋白質プローブである。活性化型カスパーゼによって SCAT が切断を受けるとその FRET が解消し、これを Venus/ECFP Ratio によりイメージングにより検出することによりカスパーゼ活性化が検出できる。まだその切断はウエスタンブロッティングによっても検出可能である (図 1)。SCAT のような偽基質を大量に発現するマウスでの「in vivo 基質切断アッセイ」により、微弱なカスパーゼ活性の変化の検出と、カスパーゼ活性亢進領域の同定が可能になるのではないかとこのアイデアである。さらに SCAT マウスを用いる事で、細胞レベルでの情報も得られると期待された。

内在性カスパーゼ活性 依存的な SCAT3 の切断

カスパーゼ阻害剤

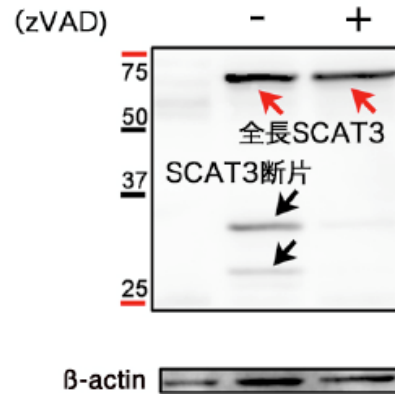


図 1: SCAT3 による in vitro cleavage assay

3. 研究成果

本研究課題では、カスパーゼ活性化検出レポーターを発現する遺伝子改変マウスを用いて、脳恒常性維持過程におけるカスパーゼ動態を可視化する系を樹立することを目指した。アポトーシス実行因子として知られるカスパーゼは、アポトーシス以外の生理現象にも関与することが近年明らかになっている。哺乳類神経系では、カスパーゼ-3 が培養スライスにおけるシナプス長期抑圧に、カスパーゼ-1 が睡眠の調節に関与することを示唆する報告がある。しかし、これらのカスパーゼの活性化が生きている個体脳内のどの部位・細胞で、どのような制御を受けて調節されているのかは全く不明である。そこで我々が樹立したカスパーゼ活性化を検出する蛍光蛋白質プローブ SCAT 発現トランスジェニックマウスを用い、これまで検出できなかった微弱なカスパーゼ活性化の検出を試みた。

まず、我々が今回樹立したカスパーゼ 3 活性化を検出できる SCAT3 トランスジェニックマウス (雑誌論文参照) に対し睡眠圧を亢進させる断眠刺激を与え、そののち脳の各領域を摘出し、SCAT3 の切断を調べる「in vivo 基質切断アッセイ」を行なった。その結果、大脳皮質、視床、視床下部、脳幹におけるカスパーゼ-3 の活性化は、断眠時と通常時で有意な差は認められないことがわかった。微弱活性が認められない原因として、脳の領域分けのやり方が適切でない可能性 (つまり、活

性化は非常に限られた領域で生じており、全体的なサンプリングでは検出できない)と、そもそもSCAT3ではカスパーゼ-3微弱な活性化を検出できない可能性とが考えられた。

一方、カスパーゼ-1活性化を検出するSCAT1マウスの樹立にも我々は最近成功した(学会報告②-③参照)。これらのマウスで微弱なカスパーゼ活性が検出されるかをまず検討した。脳での検討は領域分けの至適期がまだ行なえていなかったため、まずカスパーゼ-1活性化が生じることが明らかである培養マクロファージにおいてこの点を検討した。カスパーゼ-1活性化刺激(polydA:dT)の強さ(濃度)を変化させた場合に、カスパーゼ-1活性化の指標となるIL-1bの放出は上昇した。このとき、SCAT1のVenus/ECFP Ratio変化は、ごく一部の細胞死する細胞で強く検出されたが、その他の生細胞では検出されなかった。興味深いことに、このとき、細胞死する細胞数とIL-1b放出量には正の相関が認められた(図2)。これらの結果は、微弱なカスパーゼ-1活性化は少なくともマクロファ

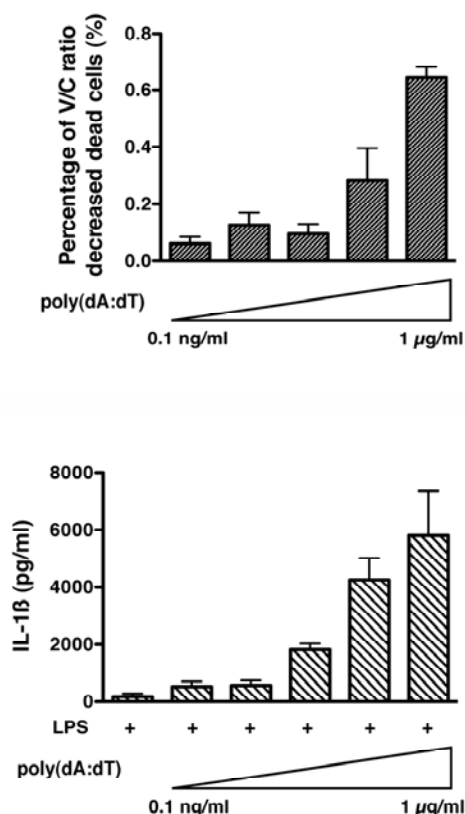


図2：カスパーゼ1活性化死細胞数(上段)とIL-1b放出量との関係

ージにおいてはSCAT1では検出されないことを示唆している。実際、低濃度刺激領域ではウエスタンブロッティングではこれらの活性は検出が非常に困難であった。

本研究課題とは別に行なっているSCAT3を用いたイメージングにおいても、これまでのところ微弱なカスパーゼ活性化(細胞死を伴わないカスパーゼの活性化)はこれまでのところ検出できていない。以上一連の結果はSCATを用いて微弱・局所的なカスパーゼ活性化を検出することは、現在我々が採用しているイメージング手法やウエスタンブロッティング等の手法では非常に困難であることを示唆している。神経細胞や生体脳における微弱なカスパーゼ活性が検出できる可能性はまだ残されているが、これを行なうには、脳領域分けの詳細な検討および、単一細胞レベルでのSCAT1/3の蛍光寿命測定によりFRETイメージング等、新技術の導入を行なう必要があると考えられる。今後、今回の解析から明らかになったこれらの改善すべき点を克服していきたい。

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1件)

Yoshifumi Yamaguchi, Naomi Shinotsuka, Keiko Nonomura, Kiwamu Takemoto, Keisuke Kuida, Hiroki Yosida, Masayuki Miura: Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure *Journal of Cell Biology*, 195, 1047-1060, 2011

[学会発表] (計3件)

- ① Koichi Shikada, Yoshifumi Yamaguchi, Ting Liu, Kiwamu Takemoto, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Erina Kuranaga, Masayuki Miura; Evaluation of SCAT1: a genetically- encoded probe for detecting activation of caspases- 1 in living cells 日本分子生物学会 2011.12.16 (横浜)
- ② Ting Liu, Yoshifumi Yamaguchi, Koichi Shikada, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Kiwamu Takemoto, Erina Kuranaga, Masayuki Miura; Visualization of Inflammasome activation: monitoring caspase-1 activity in living cells by a genetically-encoded probe SCAT1 日本分子生物学会 2012.12.11-14 (福岡)
- ③ COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES "Mechanisms and Functions of Non-apoptotic Cell Death" 2013.4.15-19 (蘇州・中国)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 良文 (YOSHIFUMI YAMAGUCHI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：10447443