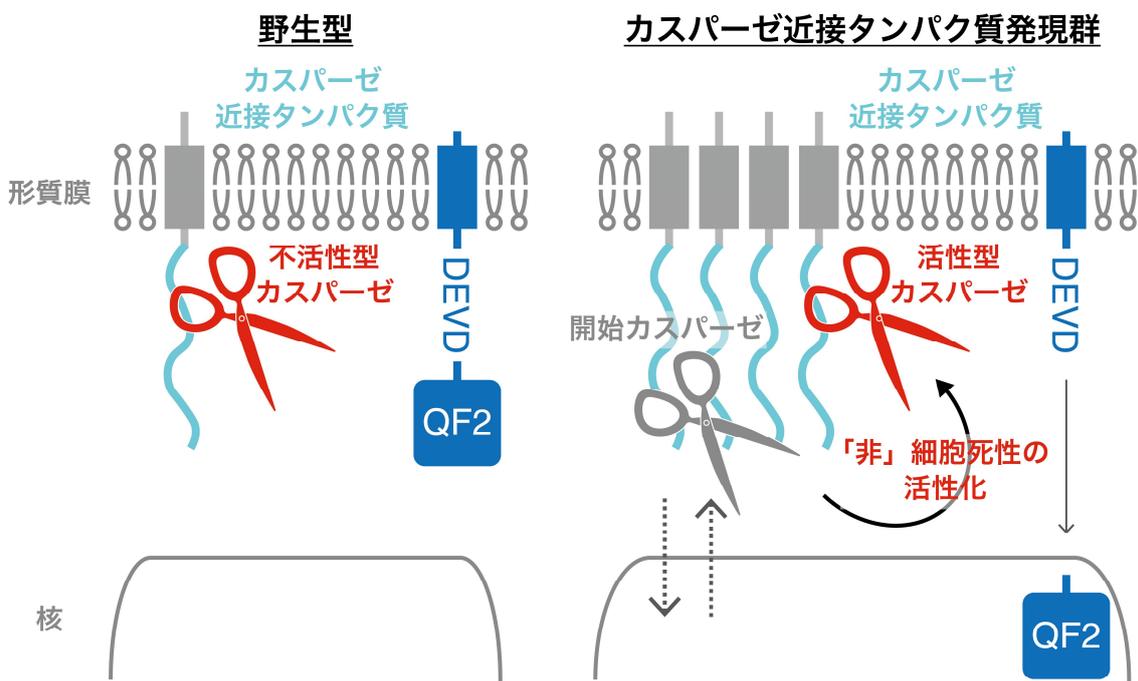


生きる神経細胞の中で区画化された「死の酵素」の活性化 ——嗅覚神経において「非」細胞死性のカスパーゼの活性化を 可能とする分子機構——

発表のポイント

- ◆細胞死実行因子カスパーゼは、ショウジョウバエの嗅覚神経において形質膜タンパク質と近接して存在し、またそれらが「非」細胞死性の活性化を促進することを見出しました。
- ◆嗅覚神経におけるカスパーゼの「非」細胞死性の活性化は、ショウジョウバエ個体の匂い刺激に対する誘引行動を抑制することを明らかにしました。
- ◆生きた細胞においてカスパーゼが「非」細胞死性に機能するためには、細胞内局所にその活性化を隔離することが重要である可能性を示しました。これまでに多数報告されているカスパーゼの「非」細胞死性の機能の分子機構を考える上で、重要な知見となることが期待されます。

生きる神経細胞の中で区画化された「死の酵素」の活性化



本研究が提案する「非」細胞死性のカスパーゼの活性化を引き起こす分子機構の模式図

概要

東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の村本雅哉大学院生（研究当時）、花輪望未大学院生（研究当時）、三浦正幸教授（研究当時）、篠田夏樹助教による研究グループは、広島大学と共同で、細胞死実行因子であるカスパーゼ（注1）の「非」細胞死性の活性化を可能とする分子機構を明らかにしました。カスパーゼは細胞死以外にも多様な細胞機能を制御します。しかし、

その「非」細胞死性の活性化を可能とする分子機構は未だ明らかではありませんでした。本研究では、ショウジョウバエを用いて、カスパーゼと近接するタンパク質を近接依存性標識法 TurboID (注 2) により網羅的に同定しました。同定した因子とカスパーゼとの遺伝生化学的な解析から、カスパーゼの活性化を細胞内の一部に区画化することが、「非」細胞死性の活性化を可能とする分子機構である可能性を示しました。本研究成果は、2025 年 6 月 17 日付で国際科学誌「eLife」誌に最終版 (Version of Record) として掲載されました。

発表内容

〈研究の背景〉

発生過程、および発生をおえた成体においても、神経系は細胞の入れ替わりに依存することなく機能的な変化を遂げることができます。この一端を担っているのが、多細胞生物に広く保存された細胞死実行因子として有名なシステインプロテアーゼであるカスパーゼです。カスパーゼは時に細胞死を誘導することなく、「非」細胞死性にも広範な細胞生理機能を発揮することができます。例えば神経においては、「非」細胞死性に活性化し、軸索ガイダンスの制御、軸索や樹状突起の刈り込み、長期抑圧の誘導など多様な機能を制御します。これらは、caspase-dependent non-lethal cellular processes (CDPs) と呼ばれています。幅広い生物種で多様な CDPs が同定されている一方で、なぜカスパーゼが細胞死を引き起こすことなく、特定の「非」細胞死性の機能を発揮することができるのか、その分子機構には未だ明らかではありませんでした。

〈研究の内容〉

本研究では、ショウジョウバエ成体の脳に着目し、カスパーゼの「非」細胞死性の活性化を可能とする分子機構の解明を目指しました。まず、ショウジョウバエ成体の脳におけるカスパーゼの発現を確認すると、実行カスパーゼである Drice が特に嗅覚神経に高発現していることを見出しました (図 1A)。そこで、実行カスパーゼ Drice の近接タンパク質を、近接依存性標識法 TurboID 及び質量分析を用いて網羅的に同定しました。その結果、実行カスパーゼ Drice は細胞質ゾルに存在するタンパク質であるにも関わらず、多数の形質膜タンパク質が同定されました。同定した形質膜タンパク質のうち、脳において実行カスパーゼ Drice と同様の発現パターンを示し、また軸索に多く存在する細胞接着因子 Fasciclin 3 (Fas3) に着目しました (図 1C)。Fas3 は選択的スプライシングにより細胞内領域のみ異なる 5 つのプロテインアイソフォームを有します (図 1D)。このうち、質量分析により同定されたのは isoform G のみでした。そこで、それぞれのアイソフォームを嗅覚神経に発現して近接を確認すると、たしかに実行カスパーゼ Drice は isoform G と近接して存在するものの、その他のアイソフォームとは近接を示しませんでした (図 1E)。つまり、実行カスパーゼ Drice と Fas3 の近接は、アイソフォーム特異性があることがわかりました。以上の結果は、実行カスパーゼ Drice が神経細胞において区画化されて存在する可能性を示します。

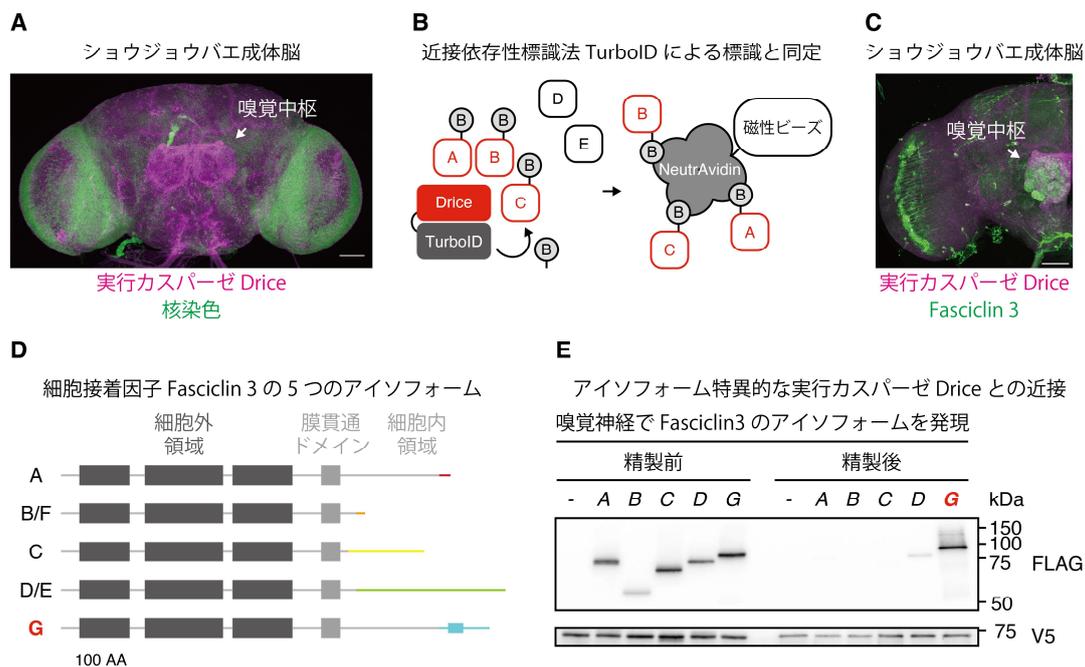


図 1 : 近接依存性標識法 TurboID により、実行カスパーゼ Drice と細胞接着因子 Fasciclin 3 がアイソフォーム特異的に近接することが明らかとなった

A. ショウジョウバエの成体の脳において、実行カスパーゼ Drice は嗅覚神経に高発現する。B. 近接依存性標識法 TurboID による標識と同定の模式図。C. ショウジョウバエの成体の脳において、実行カスパーゼ Drice は細胞接着因子 Fasciclin 3 と同様の発現パターンを示す。D. 細胞接着因子 Fasciclin 3 の 5 つのプロテインアイソフォームの模式図。E. 実行カスパーゼ Drice は細胞接着因子 Fasciclin 3 のアイソフォーム特異的に近接する。

次に、Fas3 isoform G (Fas3G) が実行カスパーゼ Drice の活性化を制御する可能性を検討しました。まず、Fas3G を嗅覚神経において過剰発現しても、嗅覚神経の数は減少しないことから細胞死は誘導しないことを確認しました。次に、Fas3G が「非」細胞死性の活性化を制御する可能性を検討しました。この目的のために、形質膜近傍でのカスパーゼの活性化を超高感度でモニタリングする Gal4-Manipulated Area Specific CaspaseTracker/CasExpress (MASCAT) システム (注 3) を作出しました (図 2A)。MASCAT システムでは、転写因子 QF2 を、カスパーゼ切断配列を挟んで膜貫通ドメインと融合したプローブを狙った細胞に特異的に発現します。ここでカスパーゼの活性化が形質膜近傍で生じると、プローブの切断後、転写因子 QF2 が核移行可能となり、レポーター蛍光タンパク質を発現します。すなわち、蛍光タンパク質の発現の有無を確認することで、標的細胞でカスパーゼの活性化が生じているかを判断可能です。ここで、Fas3G を嗅覚神経で過剰発現すると MASCAT 陽性となることが明らかとなりました (図 2B)。すなわち、Fas3G は過剰発現によって実行カスパーゼ Drice の「非」細胞死性の活性化を引き起こすことを発見しました。

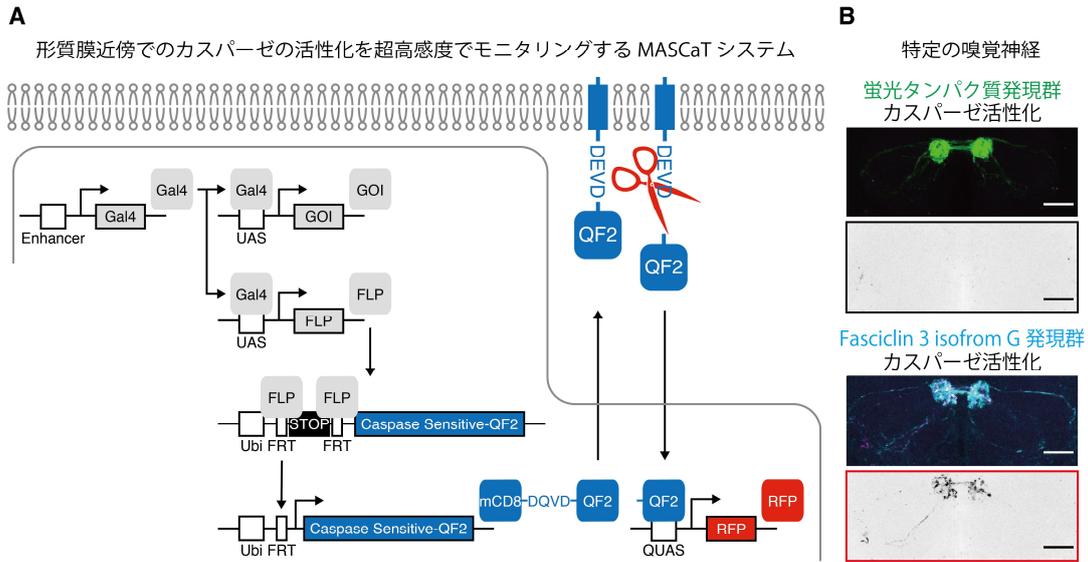


図 2 : カスパーゼの活性化を超高感度でモニタリングする MASCaT システムにより、細胞接着因子 Fasciclin 3 の過剰発現が「非」細胞死性の活性化を引き起こすことが明らかとなった

A. MASCaT システムによるカスパーゼ活性検出原理の模式図。B. ショウジョウバエの成体の嗅覚神経における細胞接着因子 Fasciclin 3 isoform G の過剰発現によって、「非」細胞死性の活性化が引き起こされる。

実行カスパーゼ Drice は通常、開始カスパーゼ Dronc による切断を受けて活性化します。興味深いことに、Fas3G の過剰発現は嗅覚神経において開始カスパーゼ Dronc の発現を誘導することを見出しました (図 3A)。また遺伝学的にその必要性を検討した結果、Fas3G の過剰発現による実行カスパーゼの活性化は、この開始カスパーゼ Dronc を必要とすることが明らかとなりました (図 3B)。さらに重要なことに、開始カスパーゼ Dronc は実行カスパーゼ Drice と同様に、嗅覚神経において Fas3G に近接することを見出しました (図 3C)。また、この近接は実行カスパーゼ Drice と同様にアイソフォーム特異性を示しました。以上の一連の結果から、カスパーゼの活性化を細胞内の一部に区画化することが、「非」細胞死性の活性化を可能とする分子機構である可能性を示しました。

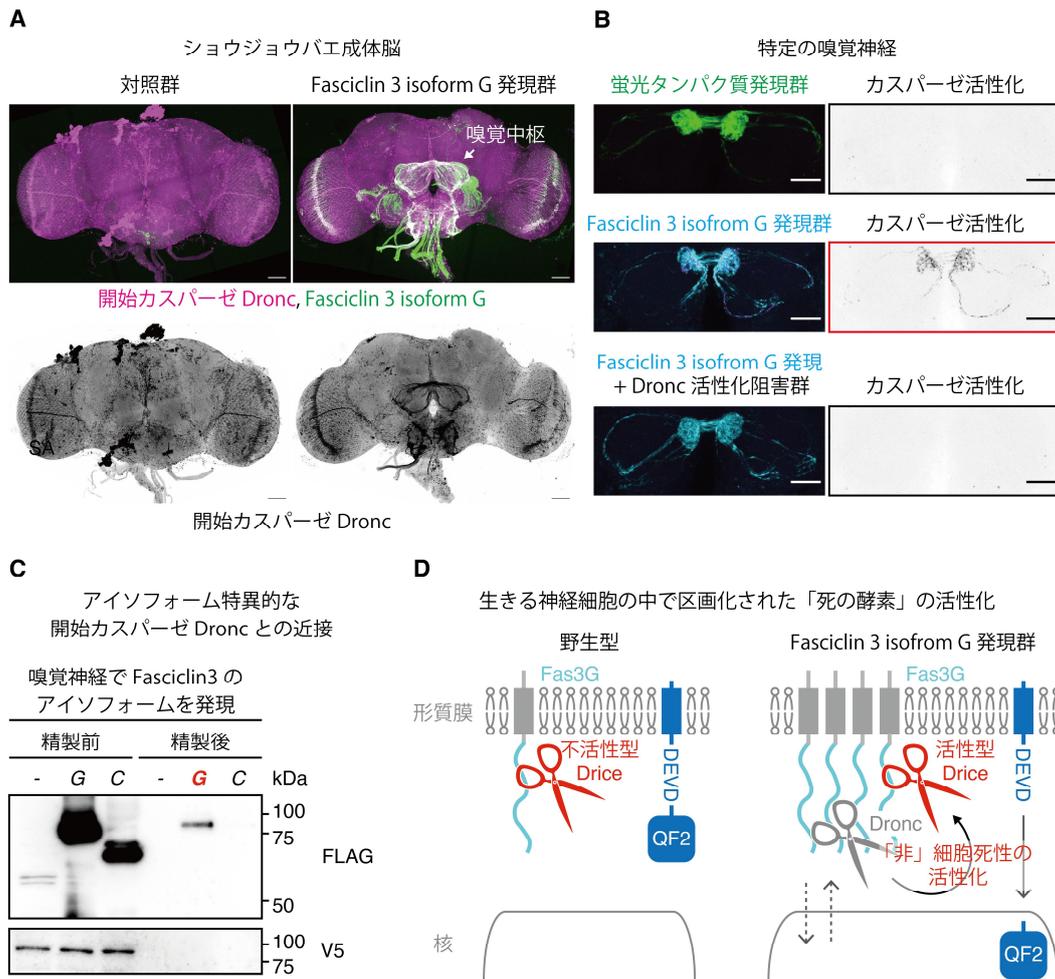


図 3 : 開始カスパーゼ Dronc と実行カスパーゼ Drice が生きる神経細胞の中で区画化されることで、「非」細胞死性の活性化を引き起こす

A. ショウジョウバエの成体の嗅覚神経における細胞接着因子 Fasciclin 3 isoform G の過剰発現によって、開始カスパーゼ Dronc の発現が誘導される。B. ショウジョウバエの成体の嗅覚神経における細胞接着因子 Fasciclin 3 isoform G の過剰発現によって、「非」細胞死性の活性化が引き起こされるが、開始カスパーゼ Dronc の活性化阻害によりその活性化は阻害される。C. 開始カスパーゼ Dronc は細胞接着因子 Fasciclin 3 に、アイソフォーム特異的に近接する。D. 本研究が提案する「非」細胞死性のカスパーゼの活性化を引き起こす分子機構の模式図。

嗅覚神経は匂い刺激を受容して嗅覚中枢を活性化し、ショウジョウバエ個体の嗅覚行動を促します。そこで、リンゴ酢の匂いを感知する嗅覚神経でカスパーゼの「非」細胞死性の活性化を誘導し、その影響を検討しました。その結果、Fas3G の過剰発現自体でもリンゴ酢の匂いへの誘引行動を促進しましたが、カスパーゼの活性化を阻害することでさらなる誘引行動の促進が観察されました。すなわち、このカスパーゼの「非」細胞死性の活性化は、嗅覚神経を殺すことなく、ショウジョウバエ個体の匂い刺激に対する誘引行動を抑制することが明らかとなりました。

〈今後の展望〉

カスパーゼの「非」細胞死性の機能は、線虫からマウス、ヒトまで様々な動物種で神経系を超えて報告があります。それら細胞機能へのカスパーゼの必要性が示される一方で、しかし、ほとんどの場合でその分子機構、特に何がカスパーゼの細胞死性と「非」細胞死性の活性化を区別しているのかは明らかとなっておりませんでした。本研究では、細胞内部でカスパーゼの活性化を一部に区画化することが「非」細胞死性の活性化に重要である可能性を示しました。この概念は、他の「非」細胞死性のカスパーゼの活性化が関与する現象の分子機構を考察する上での重要な土台をなします。また、カスパーゼを超えて、他の酵素の細胞内で区画化された活性化制御の存在と重要性を示唆するものです。また、今後細胞内部の一部でカスパーゼ活性を操作する手法の開発を通じて、カスパーゼの特異的な機能の操作も可能になることが考えられます。実際に本研究では、カスパーゼの「非」細胞死性の活性化を通じて、神経細胞を殺すことなくショウジョウバエ個体の嗅覚行動を制御できたことから、神経機能を可逆的に変容させる新たな方法論の開発にも繋がりをうる発見です。

発表者

東京大学大学院薬学系研究科

村本 雅哉（修士課程：研究当時）

花輪 望未（修士課程：研究当時）

三浦 正幸（教授：研究当時）

現：自然科学研究機構 基礎生物学研究所 所長

篠田 夏樹（助教）

論文情報

雑誌名：eLife

題名：Executioner caspase is proximal to Fasciclin 3 which facilitates non-lethal activation in *Drosophila* olfactory receptor neurons

著者名：Masaya Muramoto[†], Nozomi Hanawa[†], Misako Okumura, Takahiro Chihara, Masayuki Miura*, and Natsuki Shinoda*（[†]：同等貢献、*：責任著者）

D O I: <https://doi.org/10.7554/eLife.99650>

U R L: <https://elifesciences.org/articles/99650>

研究助成

本研究は、文部科学省・科学研究費若手研究「近接依存性標識法 Turb1D による、細胞を殺さないカスパーゼ活性の解析（研究代表者：篠田 夏樹、課題番号：19K16137）」、「カスパーゼ反応場から読み解く、その非細胞死性の機能（研究代表者：篠田 夏樹、課題番号：21K15080）」、基盤研究(C)「カスパーゼ反応場に選択的な非細胞死性の基質の包括的探索（研究代表者：篠田 夏樹、課題番号：23K05747）」、学術変革領域研究(A)非ドメイン型バイオポリマーの生物学：生物の柔軟な機能獲得戦略における公募研究「非ドメイン領域が組み替えるカスパーゼ反応場と、その非細胞死性の機能（研究代表者：篠田 夏樹、課題番号：22H05586）」、基盤研究(A)「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（研究代表者：三浦 正幸、課題番号：21H04774）」、「個体差を生み出す表現度制御の分子基盤解明（研究代表者：三浦 正幸、課題番号：24H00567）」、学術変革領域研究(A)生体防御における自己認識の「功」と「罪」「無脊椎動物免疫センサーTo11による自己免疫応答の分子機構と生理機能における公募研究「無脊

椎動物免疫センサーTo11による自己免疫応答の分子機構と生理機能(研究代表者:三浦 正幸、課題番号:23H04766)、「To11による免疫応答の制御と個体差発現の分子機構(研究代表者:三浦 正幸、課題番号:25H01842)」、日本医療研究開発機構(AMED)「老化メカニズムの解明・制御プロジェクト」における研究課題「老化臨界期を決める体内機構(研究代表者:三浦 正幸、課題番号:JP21gm5010001)」、武田科学振興財団2021年度薬学系研究助成「カスパーゼ反応場から読み解く非細胞死性の作用と分子機構(研究代表者:篠田 夏樹)」、住友財団2021年度基礎科学研究助成「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生理機能の解析(研究代表者:篠田 夏樹)」の支援により実施されました。

用語解説

(注1) カスパーゼ:

動物に広く保存された、細胞死を実行する一群のエンドペプチダーゼ(システインプロテアーゼ)のこと。活性中心にシステイン残基をもち、基質となるタンパク質のアスパラギン酸残基のカルボキシ基側のペプチド結合を加水分解する。基質の切断を介して、細胞死のみならず広範な「非」細胞死性の機能も発揮する。

(注2) 近接依存性標識法 TurboID:

生きた細胞または個体において、ビオチン添加依存的に、標的タンパク質に近接して存在するタンパク質を無差別にビオチン化標識する手法のひとつ。目的のタンパク質に融合することで、周囲およそ10 nmに存在するタンパク質を標識する。標識されたタンパク質は、その後ストレプトアビジンを用いて精製し、同定することができる。

(注3) MASCaT システム:

本研究で作出された、形質膜近傍でのカスパーゼの活性化を超高感度でモニタリングする遺伝学的システムのこと。転写因子 QF2 を、カスパーゼ切断配列を挟んで膜貫通ドメインと融合したプローブを狙った細胞に Gal4/UAS システムを用いて特異的に発現する。カスパーゼの活性化依存的なプローブの切断後、転写因子 QF2 が核移行可能となり、レポーター蛍光タンパク質を発現する。

問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学大学院薬学系研究科

助教 篠田 夏樹(しのだ なつき)

Tel: 03-5841-4863 E-mail: f-shinoda.natsuki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

自然科学研究機構 基礎生物学研究所

所長 三浦 正幸(みうら まさゆき)

Tel: 0564-55-7650 E-mail: miura@nibb.ac.jp

〈報道に関する問合せ〉

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム

Tel: 03-5841-4702 E-mail: shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp