

学位論文題名

Monitoring the caspase cascade in single apoptotic cells using multi-color fluorescent protein substrate

(多色蛍光蛋白質を用いた生細胞内アポトーシス過程における
カスパーゼカスケードの解析)

学位論文内容の要旨

アポトーシスは生体組織が一定の秩序を保ちながら形成、成長していく上で重要なイベントである。細胞内アポトーシス過程において重要な役割を果たしているのが、カスパーゼファミリーの活性化である。カスパーゼはアポトーシス初期に関わるイニシエーターカスパーゼと、アポトーシスの実行そのものに関わるエフェクターカスパーゼの2つのタイプに大別され、アポトーシスの過程はこの両者によって厳密に制御されている。殆どのアポトーシスはこのカスパーゼの活性化に依存して誘導されるものであり、カスパーゼに対する阻害剤で処理することでアポトーシスの進行が阻害される。アポトーシスは個体の発生段階における正常な器官形成に必須な細胞内反応であり、また、癌やアルツハイマー病などの疾病にも関係があることから治療のターゲットとして注目されている。これまでカスパーゼの活性化に関する研究は *in vitro* から *in vivo* まで幅広く行われており、現在では2色蛍光蛋白質を融合した基質を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法で観察することで、生細胞内におけるカスパーゼの活性をリアルタイムで追跡することが可能になった。しかし、FRET法は基質を構成するドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質の間の角度、距離、蛍光蛋白質の励起・発光波長の重なりという3つの満たすべき条件が厳密であるため、2種類以上のカスパーゼの活性を同時に解明するための基質を構築するのは容易ではない。

そこで、本研究では、近年細胞内での分子間相互作用解析に用いられている蛍光相互相関分光法 (FCCS) を利用することで、3種類の異なる発光波長をもつ蛍光蛋白質を利用して新たな基質を構築し、細胞内におけるカスパーゼ-9 からカスパーゼ-3 への活性化カスケードを測定することを目的として解析を行った。

第二章においては、カスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 の活性を同時に測定することを目的とした新たな基質 ECFP-DEVVD-mCherry-LEHD-Venus (Cyan-Red-Yellow 融合蛍光蛋白質: CRY) を構築し、*in vitro* での検証を行った。この基質は活性化カスパーゼ-3 あるいはカスパーゼ-9 によって切断され、その切断は FCCS 測定からそれぞれ、ECFP-mCherry 間の相互相関の減少、あるいは mCherry-Venus 間の相互相関の減少として検出されることが

期待される。実際、CRY を発現した HeLa 細胞のライセートの FCCS 測定を行ったところ、ECFP-mCherry 間の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関、共にネガティブコントロールに比べて高い振幅の相互相関が観察された。また、CRY 発現 HeLa 細胞ライセートに対し、リコンビナントカスパーゼ-3、カスパーゼ-9 を加えたところ、ECFP-mCherry 間の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関のいずれの相互相関の振幅も時間とともに減少した。このことから、新規に構築した基質 CRY はカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 の活性評価に利用可能であることが確認された。

次に、この新規基質 CRY が細胞内におけるカスパーゼ活性化の評価に適応可能かどうかの検証を行った。CRY を発現した HeLa 細胞をアポトーシス誘導直後、30 分、60 分後にそれぞれ溶解し FCCS 測定を行ったところ、アポトーシス誘導 60 分後においては ECFP-mCherry 間の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関、共に有意な減少が観察された。しかし、誘導 30 分後においては ECFP-mCherry 間の相互相関に有意な減少はみられず、mCherry-Venus 間の相互相関にのみ有意な減少が観察された。この結果はカスパーゼ-9 がカスパーゼ-3 により先に活性化されたことを示唆している。

第三章においては、単一生細胞内でのカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 活性化の経時変化を FCCS により追跡した。また、カスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 基質認識の特異性を確認するため、阻害剤を用いた実験を行った。カスパーゼ-3 阻害剤存在下ではアポトーシス誘導後の HeLa 細胞ライセートにおいて、カスパーゼ-3 の活性化が阻害されたものの、カスパーゼ-9 の活性化には影響がなかった。一方、カスパーゼ-9 阻害剤存在下ではカスパーゼ-9 の阻害だけでなく、カスパーゼ-3 も弱く阻害されていることがわかった。この結果からカスパーゼ-9 の阻害によりカスケードが一部遮断され、下流のカスパーゼ-3 の活性化が抑えられたと考えられる。

さらに、アポトーシス誘導後の単一生細胞内において経時的 FCCS 測定を行ったところ、ECFP-mCherry 間の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関、共に時間経過に従った減少が観察された。そして、この減少がアポトーシス特有な形態変化より前に観察されたことは特筆すべき点である。この結果はアポトーシス誘導開始から細胞死に至るまで一連の追跡が単一細胞において可能であることを示した。さらに、mCherry-Venus 間の相互相関の減少が ECFP-mCherry 間の相互相関の減少より、15 分早く始まることもわかった。この結果からも、カスパーゼ-9 がカスパーゼ-3 より先に活性化されたことが支持された。本研究において構築された 3 色蛍光蛋白質基質を FCCS を用いて追跡することで、生細胞内のカスパーゼ-3 とカスパーゼ-9 の活性をモニターできることを示した。さらに、アポトーシス誘導後の細胞においてカスパーゼ-9 がカスパーゼ-3 より先に活性化されたことを明らかにした。また、FCCS を用いたこの方法は形態変化より早くアポトーシスを検出できるため、これまで知られているアポトーシス検出法に比べ、より初期のアポトーシス過程の評価法として活用可能である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 城 政 孝

副 査 教 授 出 村 誠

副 査 准教授 相 沢 智 康

学 位 論 文 題 名

Monitoring the caspase cascade in single apoptotic cells using multi-color fluorescent protein substrate

(多色蛍光蛋白質を用いた生細胞内アポトーシス過程における
カスパーゼカスケードの解析)

アポトーシスは生体組織が一定の秩序を保ちながら形成、成長していく上で重要なイベントである。細胞内アポトーシス過程において重要な役割を果たしているのが、カスパーゼ蛋白質ファミリーの活性化である。カスパーゼはアポトーシス初期に関わるイニシエーターカスパーゼと、アポトーシスの実行そのものに関わるエフェクターカスパーゼの2つのタイプに大別され、アポトーシスの過程はこの両者によって厳密に制御されている。殆どのアポトーシスはこのカスパーゼの活性化に依存して誘導されるものであり、カスパーゼに対する阻害剤で処理することでアポトーシスの進行が阻害される。アポトーシスは個体の発生段階における正常な器官形成に必須な細胞内反応であり、また、癌やアルツハイマー病などの疾病にも関係があることから治療のターゲットとして注目されている。これまでカスパーゼの活性化に関する研究は *in vitro* から *in vivo* まで幅広く行われており、現在では2色蛍光蛋白質を融合した基質を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法で観察することで、生細胞内におけるカスパーゼの活性をリアルタイムで追跡することが可能になった。しかし、FRET法は基質を構成するドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質の間の角度、距離、蛍光蛋白質の励起・発光波長の重なりという3つの満たすべき条件が厳密であるため、2種類以上のカスパーゼの活性を同時に解明するための基質を構築するのは容易ではない。

そこで、本研究では、近年細胞内での分子間相互作用解析に用いられている蛍光相互相関分光法 (FCCS) を利用することで、3種類の異なる発光波長をもつ蛍光蛋白質を利用して新たな基質を構築し、細胞内におけるカスパーゼ-9 からカスパーゼ-3 への活性化カスケードを測定することを目的とした。

第二章においては、カスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 の活性を同時に測定することを目的とした新たな基質 ECFP-DEVD-mCherry-LEHD-Venus (Cyan-Red-Yellow 融合蛍光蛋白質: CRY) を構築し、*in vitro* での検証を行った。この基質は活性化カスパーゼ-3 あるいはカスパーゼ-9 によって切断され、その切断は FCCS 測定からそれぞれ、ECFP-mCherry 間の相互相関の減少、あるいは mCherry-Venus 間の相互相関の減少として検出されることが期待される。実際、CRY を発現した HeLa 細胞のライセートの FCCS 測定を行ったところ、ECFP-mCherry 間の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関、共にネガティブコントロールに比べて高い振幅の相互相関が観察された。また、CRY 発現 HeLa 細胞ライセートに対し、リコンビナントカスパーゼ-3、カスパーゼ-9 を加えたところ、ECFP-mCherry 間

の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関のいずれの相互相関の振幅も時間とともに減少した。このことから、新規に構築した基質 CRY はカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 の活性評価に利用可能であることが確認された。

次に、この新規基質 CRY が細胞内におけるカスパーゼ活性化の評価に適応可能かどうかの検証を行った。CRY を発現した HeLa 細胞をアポトーシス誘導直後、30 分、60 分後にそれぞれ溶解し FCCS 測定を行ったところ、アポトーシス誘導 60 分後においては ECFP-mCherry 間の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関、共に有意な減少が観察された。しかし、誘導 30 分後においては ECFP-mCherry 間の相互相関に有意な減少はみられず、mCherry-Venus 間の相互相関にのみ有意な減少が観察された。この結果はカスパーゼ-9 がカスパーゼ-3 により先に活性化されたことを示唆している。

第三章においては、単一生細胞内でのカスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 活性化の経時変化を FCCS により追跡した。また、カスパーゼ-3 およびカスパーゼ-9 基質認識の特異性を確認するため、阻害剤を用いた実験を行った。カスパーゼ-3 阻害剤存在下ではアポトーシス誘導後の HeLa 細胞ライセートにおいて、カスパーゼ-3 の活性化が阻害されたものの、カスパーゼ-9 の活性化には影響がなかった。一方、カスパーゼ-9 阻害剤存在下ではカスパーゼ-9 の阻害だけでなく、カスパーゼ-3 も弱く阻害されていることがわかった。この結果からカスパーゼ-9 の阻害によりカスケードが一部遮断され、下流のカスパーゼ-3 の活性化が抑えられたと考えられる。

さらに、アポトーシス誘導後の単一生細胞内において経時的 FCCS 測定を行ったところ、ECFP-mCherry 間の相互相関、mCherry-Venus 間の相互相関、共に時間経過に従った減少が観察された。そして、この減少がアポトーシス特有な形態変化より前に観察されたことは特筆すべき点である。さらに、mCherry-Venus 間の相互相関の減少は ECFP-mCherry 間の相互相関の減少より、15 分早く始まることもわかった。この結果は、カスパーゼ-9 がカスパーゼ-3 より先に活性化されたことを支持するだけでなく、単一細胞を観察することにより、両者の活性化の時間差をも評価可能であることを示唆している。

本研究において構築された 3 色蛍光蛋白質基質を FCCS を用いて追跡することで、生細胞内のカスパーゼ-3 とカスパーゼ-9 の活性をモニターできることを示した。さらに、アポトーシス誘導後の細胞においてカスパーゼ-9 がカスパーゼ-3 より先に活性化されたことを明らかにし、その時間差についても評価可能であることを示した。また、FCCS を用いたこの方法は形態変化より早くアポトーシスを検出できるため、これまで知られているアポトーシス検出法に比べ、より初期のアポトーシス過程の評価法として活用可能である。

これを要するに、著者は、カスパーゼ 9 ならびにカスパーゼ 3 についてその評価法の新知見を得たものであり、アポトーシス研究に対して新規解析法として貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。