

氏 名 近 藤 周

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第764号

学位授与の日付 平成16年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Development of a novel fluorescent probe to
detect caspase activity in a living organism/
Characterization of Drosophila Spred, a negative
regulator of Ras signaling

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 桂 勲
教授 上田 龍
教授 廣瀬 進
助教授 平田 たつみ
名誉教授 嶋 昭紘 (東京大学)

論文内容の要旨

This thesis is divided into two parts. The first part deals with the development of a new probe to detect caspase activity in a living organism. The second part describes the characterization of the *Drosophila* homolog of Spred, a mammalian gene that negatively regulates Ras signaling.

Caspase, the main subject in the first part, is a sequence-specific protease that is the final executioner of apoptosis. During animal development, many unnecessary cells are removed by apoptosis to give space for other cells. This is especially important for constructing a fine structure such as the central nervous system. However, compared with the current knowledge of apoptosis *in vitro*, little is known about naturally occurring apoptosis during development. This is partly due to difficulty in detecting apoptotic cells, because they are rapidly cleared by macrophages. Therefore, in order to gain a spatio-temporal map of apoptosis during development, it is necessary to detect dying cells at an early phase of apoptosis in real time. To this end, a novel probe was developed that allows the imaging of caspase activity in a living organism. It is a fusion protein of two fluorescent proteins, RFP and Venus, linked by a caspase-cleavable linker and tagged with a different subcellular localization signal at each terminus, so that the probe changes its “color pattern” upon cleavage by caspase. This probe was successfully applied to time lapse analysis of cultured cells. Transgenic flies harboring this probe were generated and several cases of apoptosis were successfully visualized in live samples. In addition to the detection of apoptosis, some results suggesting local activation of caspase without cell death were obtained in the developmentally regulated degeneration of axons during metamorphosis.

In the second part, characterization of a molecule that regulates the Ras signaling pathway is described. Many intracellular events such as cell differentiation, cell division and cell survival are controlled by Ras signaling. Since improper activation of Ras signaling can result in misspecification of cell fates and cancer formation, cells are equipped with a number of negative regulators to prevent these unwanted consequences. Spred is an intracellular protein identified in mammalian cells as a suppressor of Ras signaling. The carboxyl terminal domain of Spred has homology to the well-known negative regulator of Ras signaling, Sprouty.

In this study, the ortholog of Spred in *Drosophila* was identified and its molecular function was investigated *in vivo* and *in vitro*. *Drosophila* Spred could suppress Ras signaling when overexpressed in the developing eye and in cultured cells. During development, Spred was expressed at sites of high

Ras activity. The expression of Spred could be induced by ectopic activation of Ras signaling, suggesting the presence of negative feedback. To investigate the requirement of Spred during development, mutants in Spred were isolated. Surprisingly, the Spred mutants were fully viable, showing no detectable anatomical abnormalities even in sensitive backgrounds where Ras signaling is either above or below the physiological level. The expression of Spred was also detected in neurons, and its overexpression in all neurons caused locomotion defects. Hence, it was speculated that Spred may be involved in an aspect of Ras signaling where the loss of negative regulation does not result in anatomical abnormalities, such as neuronal physiology.

論文の審査結果の要旨

近藤君の博士論文は2つの部分から成る。第1部は、カスパーゼの活性を生体内で検出するためのプローブの開発である。動物の発生では一部の細胞がアポトーシスにより死ぬことが重要で、この細胞死の実行にはカスパーゼが必須の役割を果たすことが知られている。しかし、個々の動物の発生過程における具体的な細胞死については、まだ未知のことが多い。その理由の1つは、細胞死を起こした細胞はマクロファージの貪食作用により速やかに除去されるために、細胞死の全体像の把握が困難なことである。そこで近藤君は、生きた生物個体でカスパーゼ活性を可視化できるプローブを作成し、これを使って発生を経時的に追跡すれば、困難が解決できると考えた。試行錯誤を重ね、数多く作成したプローブの中で、最も有用だったのは以下の2つである。(1)核移行シグナル(NLS)をつないだRFPと核外輸送シグナル(NES)をつないだGFPを、カスパーゼ切断配列を含むリンカーでつないだタンパク質。これを産生する遺伝子クローンを導入した細胞は、通常はNESがNLSより強いのでRFPとGFPは細胞質に局在し、両方が細胞質で光る。しかし、細胞死の起こる時にカスパーゼ活性が現われるとリンカーが切断され、RFPが核内に入るため、細胞質が緑に、核が赤く光るようになる。(2)細胞膜への局在を指令するミリスチル化配列をつないだRFPとNLSをつないだGFPをカスパーゼ切断配列でつないだタンパク質。これを産生する遺伝子クローンを導入した細胞は、細胞死がない時は細胞膜でGFPとRFPの両方が光り、細胞死が起こる時には細胞膜が赤く、核が緑に光る。このプローブは細胞膜中での拡散が遅いので、カスパーゼの局所的な活性化を検出できる可能性がある。近藤君はこれらのプローブをショウジョウバエの培養細胞や、羽化後の翅、蛹の唾腺などの組織で発現させ、期待された性能を持つことを示した。また、蛹のキノコ体で起こる樹状突起の局所的な分解で、(2)のプローブが変化し、細胞死以外の機能にカスパーゼが働く可能性が示唆された。

第2部は、Spred 遺伝子の機能に関するものである。Spred は、哺乳類培養細胞で過剰発現すると Ras 信号伝達を抑制するが、生体内の機能が不明である。近藤君はショウジョウバエを使って Spred の生体内機能の解明を試み、ショウジョウバエの Spred について以下の解析を行った。(a)ショウジョウバエの Spred 遺伝子の同定。(b)培養細胞で過剰発現した時の Ras 信号伝達の抑制。(c)発生途上の複眼で過剰発現させた時の効果。(d)エンハンサートラップによる発現場所と時期。(e)Ras の異所的発現による Spred 発現の誘導。(f)欠失変異体の発生に関する表現型。(g)神経細胞での過剰発現による幼虫の運動異常。これらの結果、過剰発現における効果は認められたが変異体の表現型が見つからず、通常の発生における Spred の明らかな生体機能は発見できなかった。

審査委員会は、近藤君が開発したカスパーゼ活性の可視化プローブが優れた性能を持ち、今後、細胞死の研究や、細胞死以外のカスパーゼ機能の研究で役に立つと予想できるので、これだけでも立派な業績と評価した。また、ショウジョウバエ Spred 遺伝子の解析は、不運な結果になったが、記録として残すに値するきちんとした解析と判断した。以上の理由で、審査委員会は、全員一致で、この論文が博士論文として十分であるとの結論に達した。

博士論文審査会では、論文の内容およびその基礎となる分野について、様々な質問が出たが、近藤君は適切な回答をし、普段から研究内容について良く考えていることがわかった。この質疑に対する応答、および公開発表と博士論文の内容から判断して、近藤君は専門分野および基礎分野で、博士号を得るのに十分な知識と理解力を持つと結論した。また、近藤君が独力で書いた博士論文がきちんとした英語で書かれており、公開の発表会での口答発表も流暢な英語で行われたので、非常に優れた英語能力を持つと判断した。