

キイロショウジョウバエ  
(*Drosophila melanogaster*)  
における BH3-only protein、*sayonara* の発見

池川 優子

## 目次

要旨 .....	3
1. 序論 .....	4
1.1. BCL-2 ファミリータンパク質依存的なアポトーシス経路 .....	4
1.2. BCL-2 ファミリータンパク質 .....	5
1.3. BH3-only タンパク質内の BH3 モチーフ .....	6
1.4. アポトーシス研究におけるショウジョウバエ.....	6
1.5. オートファジーとアポトーシスの相互作用 .....	7
2. 材料・方法 .....	9
2.1. ハエの飼育 .....	9
2.2. 免疫染色 .....	9
2.3. 翅の測定 .....	9
2.4. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色.....	10
2.5. GC3Ai シグナルの定量 .....	10
2.6. クローニング .....	10
2.7. タンパク質の発現 .....	13
2.8. BPA 挿入タンパク質の発現.....	13
2.9. sequential IP .....	13
2.10. ウェスタンブロットティング .....	14
2.11. ライトラッカー染色 .....	14
2.12. Propidium Iodide(PI)染色 .....	14
2.13. Mimic 挿入領域の確認.....	14
2.14. synr 変異体異系交配 .....	14
2.15. 飢餓応答 .....	15



2.16.	発生速度の測定 .....	15
2.17.	統計解析 .....	15
2.18.	使用したショウジョウバエ系統.....	16
3.	結果 .....	18
3.1.	CG14044 の発見 .....	18
3.2.	<i>synr</i> の機能と BH3 モチーフ .....	20
3.3.	<i>Synr</i> が誘導する細胞死の分子機構同定.....	23
3.4.	<i>Synr</i> と <i>Debcl</i> , <i>Buffy</i> の相互作用 .....	25
3.5.	<i>Synr</i> と <i>Debcl</i> , <i>Buffy</i> 間相互作用における BH3 モチーフ.....	26
3.6.	<i>Synr</i> , <i>Debcl</i> , <i>Buffy</i> 複合体の形成 .....	29
3.7.	<i>Synr</i> の細胞内局在.....	30
3.8.	<i>Synr</i> 下流においてのオートファジー活性.....	31
3.9.	<i>Synr</i> 下流におけるアポトーシス、オートファジー経路の相互作用.....	32
3.11.	<i>Rpr</i> 下流におけるオートファジー経路の活性化 .....	35
3.12.	<i>Synr</i> の生理的機能の解明.....	36
3.12.1.	<i>synr</i> 標的 RNAi の作成.....	36
3.12.2.	<i>synr</i> 変異体の利用 .....	36
3.12.3.	<i>Synr</i> の生理的機能 .....	37
4.	議論 .....	40
4.1.	<i>synr</i> の発見 .....	40
4.2.	<i>Synr</i> , <i>Debcl</i> , <i>Buffy</i> の複合体形成.....	40
4.3.	アポトーシス、オートファジー間相互作用 .....	41
	参考文献.....	43
	謝辞 .....	51

## 要旨

生物は常に環境からのストレスに晒されており、ストレスを感知した細胞はストレス応答を開始する必要がある。アポトーシスはストレス応答の代表例であり、その機構は海綿動物から哺乳類まで広く保存されている。

1986年の線虫におけるカスパーゼ CED-3 の発見を発端として、アポトーシスの分子機構に対する研究は目覚ましく進んだ。中でも 1995 年に同定された Bad を皮切りに、BH3-only タンパク質はアポトーシスを開始する必須のストレスセンサーとしてその重要性が広く認識されてきた。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) においても、アポトーシスの経路の大部分は進化的に保存されている。IAP (Inhibitor of apoptosis) 経路の発見など、ショウジョウバエを用いた研究は線虫、哺乳類と共にアポトーシス研究に大きく貢献してきた。その一方で、線虫や哺乳類でアポトーシス制御に必須である BH3-only タンパク質が、ショウジョウバエにおいては約 20 年以上も発見されていなかった。

そこで本研究では、ショウジョウバエにおける BH3-only タンパク質の探索を試みた。既知の BH3-only タンパク質を用いた *in silico* 解析を行なった結果、ヒト BIK と類似性を示すショウジョウバエの遺伝子 CG14044 を発見し、これを *sayonara* (*synr*) と名付けた。*Synr* は BH3-only タンパク質の機能に必須である BH3 モチーフをもち、BH3 モチーフ依存的にカスパーゼの活性化を伴うアポトーシスを誘導した。またショウジョウバエの BCL-2 ファミリータンパク質である Buffy や Debcl と遺伝学的、生化学的に相互作用していた。*Synr* は p53 の下流や、飢餓ストレスに対する腸上皮でのアポトーシス制御で機能しており、内在的にも細胞死を制御していることが示唆された。

さらに、*Synr* 下流においてアポトーシス経路に加え、オートファジー経路も活性化されていることを発見した。オートファジー経路は一般的にアポトーシス経路を抑制すると認識されているが、*Synr* の下流におけるオートファジー経路の抑制は、カスパーゼの活性化、それに伴う細胞死を抑制した。また *Synr* の下流において、アポトーシス経路、オートファジー経路は共依存的に互いに活性化し合い、両経路間に正のフィードバックループが存在することも明らかになった。アポトーシス経路、オートファジー経路が互いに促進的に作用する例も知られているが、この正のフィードバックループについては報告されておらず、両経路間の相互作用に関する新たな知見となる。

本研究は私達の知る限りショウジョウバエ初の BH3-only タンパク質同定の報告である。さらに、アポトーシス経路、オートファジー経路の相互作用についても新たな可能性を示した。

# 1. 序論

生物は環境からのストレスに常に晒されている。生物はこれらのストレスに対して示す防御機構、ストレス応答を有し、ストレス環境下において生命の維持を実現している。細胞死はストレス応答の代表例であり、ダメージを受けた細胞はストレス受容後直ちにプロセスを開始させ、取り除かれる必要がある。

細胞死の種類は二つに大別される。制御の元に行われるプログラム細胞死のアポトーシス、それに対し制御外で行われる細胞壊死、ネクロシスである。さらに最近では、細胞貪食のオートファジーも状況により細胞死を誘導することが明らかとなり、この二つと並べられることが多い。その中でもアポトーシスはストレス応答、また発生に必須な機構であり、その研究の歴史も古い。

## 1.1. BCL-2 ファミリータンパク質依存的なアポトーシス経路

1972年に初めてアポトーシスが観察され(J. F. R. Kerr *et al.*, 1972)、更に1986年に最初のアポトーシス関連分子が線虫において発見された(Hilary M. Ellis *et al.*, 1986)。これらの発見を皮切りにアポトーシス研究は目覚ましく発展してきた。

様々なアポトーシス制御機構がある中で、哺乳類におけるBCL-2ファミリータンパク質による制御は最も広く知られている(図1)。通常、アポトーシス経路はアポトーシス抑制系BCL-2タンパク質(BCL2-like protein)によるアポトーシス促進系BCL-2タンパク質(BAX、BAK)の抑制によって停止している(Antonsson B *et al.*, 1997; Yang J *et al.*, 1997; Vaux DL *et al.*, 1988)。しかしストレスの受容により、BH3-onlyタンパク質が活性化されると、アポトーシス抑制系BCL-2タンパク質の働きが抑制され、アポトーシス促進系BCL-2タンパク質が活性化される(Wang K *et al.*,

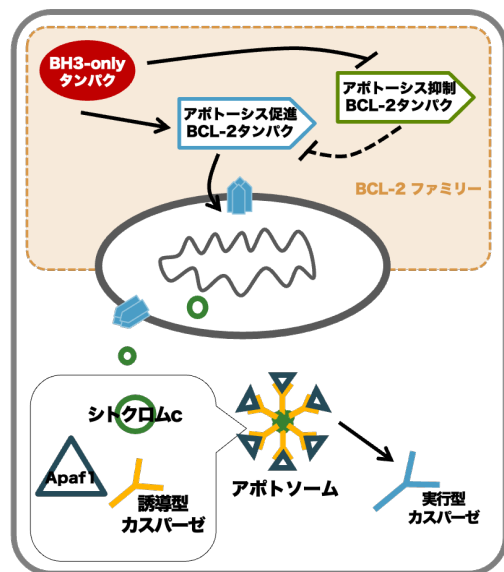


図1.哺乳類におけるアポトーシス経路

1996)。活性化されたアポトーシス促進系BCL-2タンパク質はミトコンドリア外膜上で複合体を形成し、チャンネルとして機能する(Antonsson B *et al.*, 1997; Yi-Te Hsu *et al.*, 1997)。するとミトコンドリア外膜の脱分極化(Mitochondrial outer membrane permilization; MOMP)がおき、ミトコンドリアタンパク質は細胞質に放出される(Kroemer G *et al.*, 1995)。ミトコンドリアタンパク質のシトクロムcは細胞質内のApaf1、誘導型カスパーゼと複合体を形成する。これがアポトソームと呼ばれるものであり、この複合体形成を通し、誘導型カスパーゼは活性化される(Liu X, Kim CN *et al.*, 1996; Liu

X, Kim CN *et al.*, 2002)。その後活性化した誘導型カスパーゼは実行型カスパーゼを分解、活性化し、細胞をアポトーシスへと向かわせる。

## 1.2. BCL-2 ファミリータンパク質

上記の様に、アポトーシスの上流では三つの分子、BH3-only タンパク質、アポトーシス抑制系 BCL-2 タンパク質、アポトーシス促進系 BCL-2 タンパク質が機能し、アポトーシス制御に重要な役割を持つ。これらは全て BCL-2 ファミリータンパク質群に属する。このタンパク質群のタンパク質は BH1、BH2、BH3、BH4 の BCL-2 ファミリーホモロジドメインという相同的ドメインを少なくとも一つ有しており、所有す

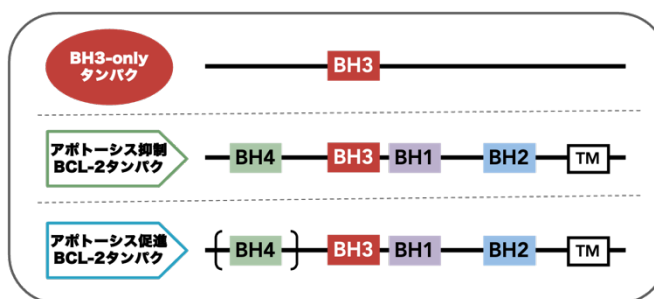


図2. BCL-2 ファミリータンパク群

るドメイン、また機能に従って三つのサブファミリーに分類される(図2)。アポトーシス抑制系 BCL-2 タンパク質は全てのドメインを持ち、アポトーシス促進系 BCL-2 タンパク質は全てのドメイン、もしくは BH4 以外のドメインを有する。BH3-only タンパク質はその名の通り、BH3 モチーフしかもたない(Delbridge AR *et al.*, 2016; Kelekar A *et al.*, 1998)。

非ストレス条件下では、アポトーシス抑制系 BCL-2 タンパク質がアポトーシス促進系 BCL-2 タンパク質に結合し、アポトーシス機構を停止させている(図3: ストレスなし)。

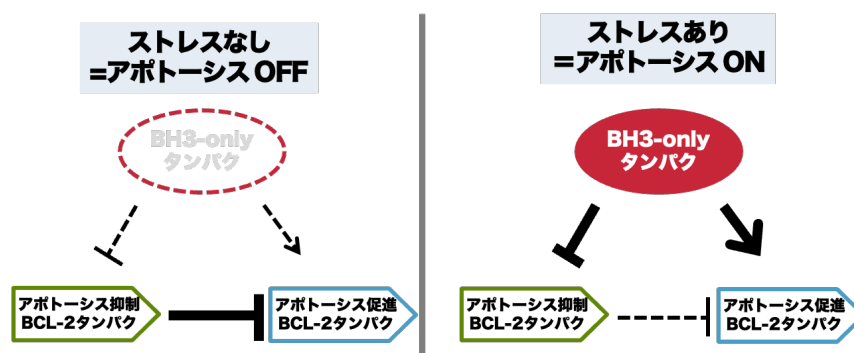


図3. BH3-only タンパクはアポトーシスを制御する

しかしストレス条件下において、BH3-only タンパク質がアポトーシス抑制系 BCL-2 タンパク質の機能を阻害し、またアポトーシス促進系 BCL-2 タンパク質の会合を促進する。この二種の機能により、アポトーシスが開始する(図3: ストレスあり)(J. C. Martinou *et al.*, 2011)。つまり、BH3-only タンパク質はアポトーシス制御においてストレスセンサーとなりうる必須の分子である(Bouillet & Strasser, 2002; Doerflinger *et al.*, 2015; Giam *et al.*, 2008; Happo *et al.*, 2012; Lomonosova & Chinnadurai, 2008)。

### 1.3. BH3-only タンパク質内の BH3 モチーフ

BH3 モチーフは BCL-2 ファミリータンパク質間の結合に重要であり、特に BH3-only タンパク質の機能には必須である (K Wang *et al.*, 1996; R Hegde *et al.*, 1998; Haiming Dai *et al.*, 2014)。BH3-only タンパク質は BCL-2 ファミリータンパク質との直接的結合を介し、アポトーシスの活性化を制御するが、この際、BH3-only タンパク質の BH3 モチーフが BCL-2 ファミリータンパク質の BH1、BH2、BH3 モチーフからなる BH3 ポケットに会合する (Xinqi Liu *et al.*, 2003; Catherine L Day *et al.*, 2008; Erinna F. Lee and W. Douglas Fairlie. 2019; Valentina Sora and Elena Papaleo, 2022)。

アポトーシス制御における BH3 モチーフの高い重要性の一方で、その 7~15 アミノ酸配列は定義内で多様性を示す (Abdel Aouacheria *et al.*, 2005; Abdel Aouacheria *et al.*, 2015, Lomonosova & Chinnadurai, 2008)。その多様性の高さ、さらに BH3 モチーフ外の配列が類似性を示さないことから、BH3-only タンパク質間は系統学的に関係性がない、つまり異なるタンパク質がそれぞれ BH3 モチーフを獲得し、BH3-only タンパク質として機能するようになったと考えられている (Aouacheria *et al.*, 2005; Aouacheria *et al.*, 2013)。

### 1.4. アポトーシス研究におけるショウジョウバエ

ショウジョウバエにおけるアポトーシス研究も線虫、哺乳類と同時期に盛んに行われた。哺乳類にも見られる IAP (Inhibitor of apoptosis) 経路はショウジョウバエを用いたアポトーシス研究のなかで発見された (Duckett CS *et al.*, 1996)。さらに、発生途中のエラー細胞の除去 (Koto A *et al.*, 2011)、代償性増殖 (Hyung Don Ryoo *et al.*, 2004; Jun R Huh *et al.*, 2004) など、アポトーシス経路の機能解明においてもショウジョウバエを用いた研究が大きく貢献してきた。

こういった功績からも窺えるように、ショウジョウバエにおいてもアポトーシス経路の保存性は高い (図 4)。線虫、哺乳類と同様に、アポトーシス抑制系 BCL-2 タンパク質、Apaf1 の相同遺伝子、誘導型カスパーゼ、実行型カスパーゼを持つ (Kumar S *et*

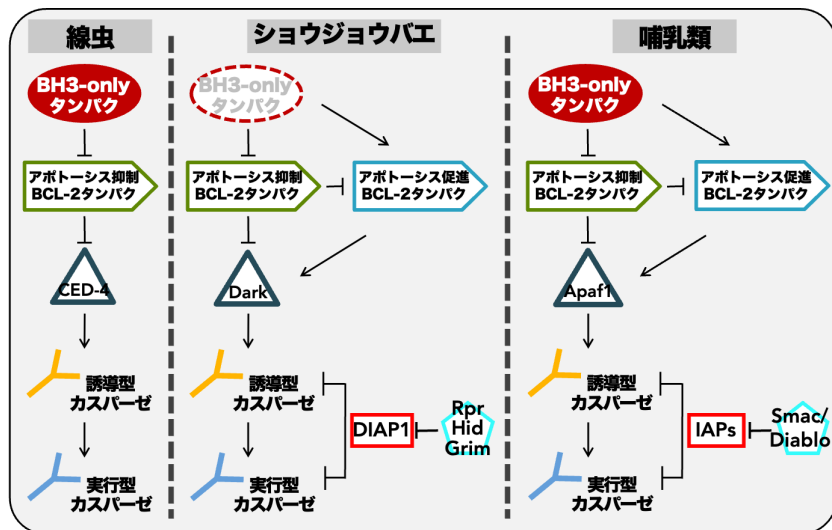


図 4. アポトーシス経路の進化的保存

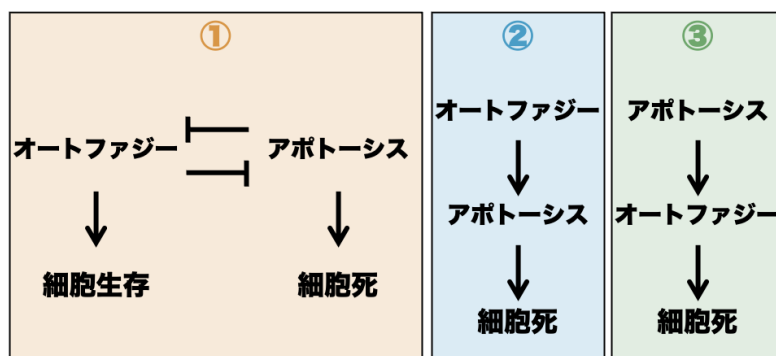
al., 2004)。更にショウジョウバエは線虫には存在しないアポトーシス促進系 BCL-2 タンパク質、DIAP1、Reaper、Hid、Grim からなる IAP 経路も有する (Goyal L *et al.*, 2000)。線虫、哺乳類の最上流には上述した通り BH3-only タンパク質が存在し、アポトーシスの調節に必須な役割を持つ。しかし驚くべきことに、ショウジョウバエにおける BH3-only タンパク質の存在は未解明なままであった (Banjara *et al.*, 2020; Denton *et al.* 2013; Kornbluth S *et al.*, 2005; Kumar & Cakouros, 2004; Quinn *et al.*, 2003; Kuranaga & Miura, 2002)。

ショウジョウバエにおける BH3-only タンパク質探索の歴史は古く、約 20 年以上も前から多くの研究者がその問題の解明に努めてきた。しかし、ショウジョウバエにおける BH3-only タンパク質の発見に関する報告は未だない。当初はショウジョウバエも他種と同様に BH3-only タンパク質を持っているはずであると信じられていたが、現在ではその存在自体が否定的に見られている (Denton D *et al.*, 2013; Nicolson S *et al.*, 2015)。

### 1.5. オートファジーとアポトーシスの相互作用

オートファジーも真核生物で幅広く保存され、細胞の恒常性維持に必須な機構である (Jason S. King. 2012)。オートファジーは飢餓ストレスや感染に反応して、細胞内の不要タンパク質、オルガネラ、病原体などを分解、時に再利用へ回し、細胞生存を促進する (Yoomi Chun and Joungmok Kim. 2018; Vojo Deretic *et al.*, 2013; Jin Li *et al.*, 2018)。その一方でオートファジーの一種マクロオートファジーは、過度な活性化により細胞内のタンパク質や細胞小器官を過剰に分解し、細胞死を誘導し得ることも知られている (G Kroemer *et al.*, 2009; Gautam Das *et al.*, 2012)。以後本研究におけるオートファジーはマクロオートファジーを指す。

細胞生存の制御においても、細胞死の制御においてもオートファジー機構はアポトーシス機構と相互作用することが知られている。オートファジーが生存促進的に機能する場合は、主にオートファジー関連遺伝子の *Atg* 遺伝子群と、アポトーシス機構の BCL-2 ファミリータンパク質、カスパーゼがそれぞれの機構を抑制し合うことで、細胞の生死を調節する(図 5 :



①)(Gump JM *et al.*, 2011; **図5.アポトーシスとオートファジーの相互作用**

Marino G *et al.*, 2014)。また近年、細胞死促進的なオートファジーにおけるアポトーシス経路の関与が知られてきている。一つはオートファジーがアポトーシス抑制因子の分

解などによって、アポトーシスの発生を援助し細胞死を引き起こす例である(図5:②)(Mohseni *et al*, 2009; Nagata *et al*, 2019; Scott *et al*, 2007)。一方、アポトーシス経路を介してオートファジーが活性化されオートファジー依存的な細胞死を引き起こし得ることも報告されている(図5:③)(Hou *et al*, 2008; Lindsay De Vorkin *et al.*, 2014)。

このようにオートファジー経路とアポトーシス経路の相互作用は状況、器官によって機構も生死の選択も様々であり、より多くの知見が必要とされている。

以上を踏まえ、本研究では、ショウジョウバエにおける BH3-only タンパク質の発見を目的とした。その結果、ショウジョウバエにおける最初の BH3-only タンパク質、*sayonara(synr)*を発見した。Synr は BH3 モチーフを持ち、BH3 モチーフ依存的に、カスパーゼの活性化を行う。また BCL-2 タンパク質の Debcl と Buffy、カスパーゼの Dcp-1 は Synr の下流で働き、Debcl と Buffy は Synr と結合する。Synr は p53 の下流で機能し、飢餓条件下の腸上皮細胞におけるカスパーゼの活性化も制御していたことから内在的にも細胞死を制御していることが示唆された。さらに *synr* の下流において、アポトーシス経路に加え、オートファジー経路も細胞死促進的に活性化しており、両経路が共依存的に活性化し合っていることも明らかになった。

本研究は我々の知る限りショウジョウバエにおける最初の BH3-only タンパク質の発見である。また、アポトーシスとオートファジーの共依存的関係についても新たな報告となる。



## 2. 材料・方法

### 2.1. ハエの飼育

ハエの飼育は 25°Cで行い、p53 発現実験(図 17-A,B)のみ 18 度で行った。餌は 0.8% アガー、10% グルコース、4.5% コーンフラワー、3.72% 乾燥酵母、0.4% プロピオン酸、0.3% パラオキシ安息香酸ブチルを含む。

### 2.2. 免疫染色

解剖は Phosphate-buffered saline(PBS)内で行った。固定には 4% Paraformaldehyde を利用し、幼虫は 20 分、成虫腸は 1 時間静置した。その後 PBSTx(PBS + 0.1% TritonX) で 3 回洗浄した。一次抗体を添加後は 4°Cで 12 時間以上放置し、その後 PBSTx で 3 回洗浄した。二次抗体添加後は同様に 4°Cで 12 時間、もしくは室温で 3 時間以上放置後、PBSTx で 5 回洗浄した。

使用した抗体、濃度は以下の通りである。

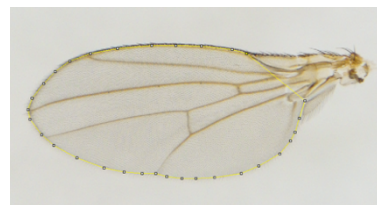
目的	抗体名	会社	商品番号	濃度
カスパーゼ活性	Cleaved Drosophila Dcp-1 (Asp216)	Cell Signaling Technology	9578	1/500
Synr 染色	Anti-HA.11, Mouse-Mono(16B12)	BAB	901513	1/500
核染色	DAPI	Sigma-Aldrich	D9542-1MG	2 $\mu$ g /ml
二次抗体	Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG	Thermo Fisher	A11008	1/500
	Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG	Thermo Fisher	A11036	1/500

蛍光画像は共焦点顕微鏡(Zeiss LSM 780, 880, 900)を用いて取得し、必要に応じて Fiji を用いて定量した。

### 2.3. 翅の測定

翅の測定には全て雌を用いた。目的遺伝子をヘテロで持つ個体を用いて交雑を行い、目的遺伝子を持たない個体をコントロールに用いた。

凍結サンプルの翅を撮影し(Nikon SMZ18)、Fiji で面積の測定を右図の黄色線範囲で行った。





## 2.4. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色

TUNEL 染色には ApopTag Red in situ apoptosis detection kit (Millipore) を使用し、商品の使用説明書に順じた。三齢幼虫を免疫染色と同様に解剖、固定、洗浄した後、キットの平衡化バッファーで 10 秒静置した。次に反応バッファーを加え 37°C で 1 時間インキュベーションした。その後バッファーを取り出し、反応停止バッファーを加え 10 分さらに室温でインキュベーションした。PBST<sub>x</sub> で 3 回洗浄をし、ジゴキシゲニン抗体溶液を加え 4°C で一晩静置した。最後に洗浄を 3 回行い、観察した。

## 2.5. GC3Ai シグナルの定量

GC3Ai シグナル領域の割合は GC3Ai 発現領域 (wing pouch) 面積に対する GC3Ai シグナル面積として算出した。一定の蛍光強度閾値以上を示す GC3Ai シグナルを有効シグナルとして定義し、その閾値を用いて蛍光画像を二値化した。バックグラウンドシグナルや翅原基の構造を用いて発現領域を決定し、その範囲内の GC3Ai シグナル領域の範囲割合を算出した。

## 2.6. クローニング

*synr* WT (FBpp0078629), *synr*  $\Delta$  BH3 (Synr のアミノ酸 122-131 を消去), *synr*  $\Delta$  ccd ( $\Delta$  ccd1 : 162-182,  $\Delta$  ccd2 : 199-219,  $\Delta$  ccd1-2 : 162 -219 を消去), *synr* BH3AA, *synr* ccdAA, HA-*synr* WT, HA-*synr*  $\Delta$  BH3, HA-*synr* BH3AA は全て pUASTattB ベクターに挿入した。*synr*  $\Delta$  BH3, *synr*  $\Delta$  ccd, *synr* BH3AA は *synr* WT をテンプレートに全てオーバーラップ PCR で作成した。*synr* ccdAA については GenScript 社にオリゴ合成を依頼した。HA-*synr* 系統については、一度 pCMV-HA-N vector (Takara #635690) へクローニングし、その後 HA タグ付きの *synr* を PCR で増幅し、再度 pUASTattB ベクターに挿入した。

*synr* の RNAi 系統は Trip protocol by Jian-Quan Ni and Norbert Perrimon (<https://fgr.hms.harvard.edu/files/fly/files/2ndngenprotocol.pdf>) を参考に設計し、pVALIUM20 ベクターに導入した。

以上のベクターは BestGene 社によって、ショウジョウバエの AttP2 サイトに導入され、トランスジェニック系統を作出した。

生化学実験において、N 末端に GST タグを付加した GST-*synr* 系統は pCold-GST DNA (Takara #3372) に *synr* を導入して作出した。また HEK-293T 細胞での発現には、*Buffy* (FBpp0087182) と *Debcl* (FBpp0085443) を Flag ベクター (西村隆先生より)、または pCMV-HA-N vector (Takara #635690) に導入した。また *Myc-synr* の作出には pCMV-Myc vector (Takara #635689) を使用した。

BPA 光架橋アッセイにおいて、BPA 挿入のため標的アミノ酸の塩基配列を終始コード

ンの一つである TAG に置き換えた。この置換は *GST-synr* のプラスミドをテンプレートに Primestar Mutagenesis Basal kit (Takara #R046A) を利用した PCR によって行った。

以上のクローニングに使用したプライマーは以下の通り。

	名前	配列
<i>synr</i> 全長	Not1-kozak-sayonarastartF	tacgcgccgccaataatgggctgtggctcctccat ggatac
	Kpn1-sayonarastopR	tacggtacctcacttgcgaccgtgtgaagacctc
<i>synr</i> $\Delta$ BH3	overlap-before BH3 domain R	gaagccttgcgggcctgggcccaggtccttgggtggg
	overlap-after BH3 domain F	aaggacctggcccaggccccgaaggcttccatgca c
<i>synr</i> $\Delta$ ccd	full length forward primer	gctgcgccgccaataatgggctgtggctcctccatg g
	full length reverse primer	gctggtacctcacttgcgaccgtgtgaagacc
	coiled-coiled domain 1 forward primer	tacggcgagatgtacgtaaagcaagacgggattata gcgtatataagcggg
	coiled-coiled domain 1 reverse primer	ttgctttacgtacatctcgccgtagtaacgaatgctaa gcaaatacatgg
	coiled-coiled domain 2 forward primer	gggggaacgtacctgggcagcgactggagcag
	coiled-coiled domain 2 reverse primer	tgcgctgccaggtacgttccccgcttatatacgt ataatcccg
	coiled-coiled domain 1, 2 forward primer	tacggcgagatgtgggcagcgactggagcag
	coiled-coiled domain 1, 2 reverse primer	tgcgctgccagcatctcgccgtagtaacgaatgcta agcaaatacatg
<i>synr</i> BH3 AA	BH3-forward	aacgagggcgtagaggcagcagccgagaaggcttc catgc
	BH3-reverse	tgctgcctctacgcctcgtttaggcctcctgggcc agg
<i>HA-synr</i> <i>Myc-synr</i>	Not1-kozak-HA	tacgcgccgccaataatgtaccatacagatgttcca gattacgctcttatggc
<i>GST-synr</i>	tac-Kpn-sayonara forward	tacggtaccatgggctgtggctcctccatg
	tac-sal1-sayonara reverse	tacgtcgactcacttgcgaccgtgtgaag

<i>Flag-Debcl</i>	tac-Not1-kozak-Debcl forward	tacgcgccgcgccgccaccatggctcccaccaccag gtcc
	tac-sal1-Debcl reverse	tacgtcgacgaacagcagcgaatacagttgacctcc
<i>Flag-Buffy</i>	tac-Not1-kozak-GGA(Gly)- Buffy forward	tacgcgccgcgccgccaccatgggacccggcacc tcgtatcccac
	tac-sal1-Buffy reverse	tacgtcgacggaattcgtaaactggtgtatattttg gtacaatc
<i>HA-Debcl</i>	tac-Kpn1-Debcl F	tacggtaccatggctcccaccaccagtcc
	tac-Not1-Debcl R	tacgcgccgcgccctagaacagcagcgaatacagttga cctc
BPA 124Y	Forward	cttgcttagaacctgggctgaattggc
	Reverse	caggttctaggcaagctgggcccaggtc
BPA 141F	Forward	gaggattagttcgccaacctgagcag
	Reverse	ggcgaactaatcctcgtgcatggaagc
BPA 340Y	Forward	tggctctaggaacctttaacagcagc
	Reverse	ggtttctagagccacgtgcaggttt

名前	標的配列	shRNAi(top/bottom)
<i>synr RNAi</i>	TTGGACTGTCG AAGTCTGTTA	ctagcagtTTGGACTGTCGAAGTCTGTTAtagttatatt caagcataTAACAGACTTCGACAGTCCAAgcg
		aattcgcTTGGACTGTCGAAGTCTGTTAatgcttgaat ataactaTAACAGACTTCGACAGTCCAAactg
<i>synr RNAi-2</i>	AACGAGCTGTA CGTAAAGCAA	ctagcagtAACGAGCTGTACGTAAAGCAAtagttatattca agcataTTGCTTTACGTACAGCTCGTTgcg
		aattcgcAACGAGCTGTACGTAAAGCAAatgcttgaatat aactaTTGCTTTACGTACAGCTCGTTactg

## 2.7. タンパク質の発現

GST タンパク質(GST only, GST-Synr, GST-Synr  $\Delta$ BH3 and GST-Synr  $\Delta$ ccd)は pG-Tf2/BL21 *E. coli* (Takara #9124)で発現し、グルタチオンセファロース(GE healthcare)への結合によって精製した。OD<sub>600</sub>=0.4~0.6 程度まで前培養を行い、コールドショックを製品の説明書通りに与えた。その後 0.1 mM IPTG を添加し、更に 15°Cで 20 時間以上培養した。遠心によって大腸菌を回収し、溶菌バッファー (PBS, 1% NP40, 250  $\mu$  M PMSF) を加え、さらに超音波処理を行った。グルタチオンセファロースへの結合によって GST タンパク質を精製し、ビーズの洗浄後 Flag タグタンパク質、HA タグタンパク質を添加した。Flag タグタンパク質、HA タグタンパク質は HEK293T 細胞で発現し、溶解バッファー (pH 7.4 50 mM Hepes, 2% NP40, 150 mM NaCl, 5% Glycerol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10  $\mu$  g/ml Leupeptin, 2  $\mu$  g/ml Pepstatin, 0.1% Aprotinin, 1% Protease inhibitor cocktail (Roche, cOmplete, EDTA free), 0.1% Phosphatase inhibitor cocktail 2 (P5726, Sigma), 0.1% Phosphate inhibitor cocktail 3 (P0044, Sigma), 250  $\mu$  M PMSF and 1 mM DTT) におけるインキュベーション後、遠心し上清を回収した。これらを GST タンパク質が結合したグルタチオンセファロースに添加し、更に 4°Cでインキュベーションした。ビーズ洗浄後、2x サンプルバッファーを加え、95°C 5 分の熱処理を行うことで結合タンパク質を抽出し、これらを 8%の SDS ゲルを用いた SDS-PAGE によって分離した。

## 2.8. BPA 挿入タンパク質の発現

BPA 挿入タンパク質の発現では、GST タンパク質のプラスミドに加え、BPA 挿入に必要な tRNA 合成酵素、tRNA 配列を含んだプラスミド pEVOL-pBpF (#31190) を同時に BL21 *E. coli* (Takara #9126) に形質転換した。1mM p-benzoyl-L-phenylalanine と、tRNA 合成酵素、tRNA 配列の発現のための 0.1% L-arabinose を加えた培養液で培養し、発現を上記と同様に行った。またその後の溶菌、グルタチオンセファロースによる精製、また Flag タグ質、HA タグタンパク質を含む細胞ライセートとのインキュベーションまでは前述の通り。インキュベーション後、ライセートを取り除き 15 分間 UV 照射を行った。その後ビーズ洗浄、タンパク質抽出をおこない、6%SDS ゲルで SDS-PAGE を行った。

## 2.9. sequential IP

Myc-Synr、HA-Debcl、Flag-Buffy は全て HEK293T 細胞で発現させた。この細胞ライセートとモノクローナルマウス FlagM2 抗体 (F1804, Sigma) と Protein A/G Magnetic Beads(#88802, Thermo Fisher)を 4°Cで 4 時間以上インキュベーションした。ビーズの洗浄後、200  $\mu$  g/ml の 3xFlag ペプチド (4046200.0005, 和光) で抗体結合タンパク質の溶出を行なった。その後、上清と Myc 抗体、新しい Protein A/G Magnetic Beads を加え (9B11, #2276, Cell Signaling Technology) 4°Cで一晩インキュベーションした。ビーズの洗浄後 2x サンプルバッファーを加え、熱処理でタンパク質を抽出し、8%SDS ゲルで SDS-PAGE を

した。

## 2.10. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE によって分離されたタンパク質をニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に転写した。5% BSA でブロッキングし、以下の抗体で染色した。GST 抗体 (1:1000; 2622S, Cell Signaling Technology または、1:1000; 10000-0-AP, Proteintech), Flag M2 抗体 (1:1000; F1804, Sigma), HA 抗体(ラビット) (1:1000; 3724, Cell Signaling Technology), HA 抗体(マウス) (1:1000; 901513, BioLegend), Myc 抗体 (1:1000, #2276, Cell Signaling Technology)。メンブレン洗浄後、以下の二次抗体で更に染色した。IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (1:10000; 925-68071, LI-COR)、IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (1:10000; 925-32210, LI-COR)。

シグナルの観察は Near-Infrared Fluorescence Imaging scanner (LI-COR, Odyssey CLx) を用いて、解析には Image Studio(LI-COR)を利用した。

## 2.11. ライソトラッカー染色

三齢幼虫を解剖し、50  $\mu$  M の LysoTracker™ Red DND-99 (Invitrogen, Cat# L7528) で染色した。その後4% PFA で20分間固定し、PBSTxでの置換後 DAPI 溶液 (4  $\mu$  g/ml) を加え5分静置した。PBSTxでの洗浄後、直ちに観察を行なった。

## 2.12. Propidium Iodide (PI) 染色

三齢幼虫を解剖し、Propidium Iodide (100 nM, 341-07881, Fujifilm) とインキュベーションした。その後サンプルの固定、洗浄、染色を行い観察した。

## 2.13. Mimic 挿入領域の確認

Mimic が正しく *synr* 遺伝子領域に挿入されているかを確認するため以下のプライマーを作成し PCR を行った。その後電気泳動によりバンドを確認した。

名前	配列
250bp upstream from Mimic insertion F	gcgaccaattgtggccaacacg
250bp downstream from Mimic insertion R	ggcgtgtaacagacttcgacagtccaacg

## 2.14. *synr* 変異体異系交配

*synr* 領域外の変異を取り除くため、異系交配を野生型系統のひとつである *OregonR* を用いて行った。異系交配は5世代にわたって行い、一世代毎に MiMIC の挿入が保持されているかの確認を行った。確認のため、個体からの DNA の抽出、その DNA を用いたジェノタイピングを行った。5世代の異系交配の後、7系統の *synr* 変異体が得られたが、更にその7系統を混ぜることで、遺伝的背景を一様にした。

MiMIC 挿入の確認では、確立した系統を squishing buffe (10mM Tris-Hcl pH8.2, 1mM EDTA, 25mM NaCl, 200  $\mu$ g/ml Proteinase K) 内でホモジェナイズし、37°C30 分で、95°C 5 分でインキュベーションをし、DNA を抽出した。その後 MiMIC の挿入位置を挟み、かつ野生型における認識部位を 500bp に設定した以下のプライマーを用いてジェノタイプピングを行なった。

Mimic 内認識部位	名前	配列
EGFP	EGFP start F	atggtgagcaagggcgaggag
	EGFP stop R	ttgaagttcgcttgatgccgttctctg
Minos-EGFP	Minos F	ccaatgcatttcgtctcaagagaattttattctcttcacg
	EGFP R	ccagctcgaccaggatgggc
EGFP-yellow	EGFP F	ccagtcgcctgagcaaagacc
	yellow R	gcgggctgcgttcgaaatttatgagtg

## 2.15. 飢餓応答

カスパーゼの活性化測定、飢餓ストレス耐性の測定において、羽化後 5-7 日齢の処女雌を用いた。飢餓餌は 1.5% アガーのみを含み、糖やアミノ酸は含まない。飢餓ストレス耐性の測定では、20 匹程度を 1 バイアルに入れ、毎日死んだ匹数を測定した。カスパーゼの測定では、腸上皮細胞における GC3Ai の発現を 5966-GS を用いて制御し、100  $\mu$ M RU486 (M1732, TCI)を餌に添加した。

## 2.16. 発生速度の測定

グレーププレート上に卵を 25°Cで 8 時間産ませ、翌日一齢幼虫を 1 バイアルにつき 50 匹集めた。新しく蛹化した個体数を 12 時間おきに数え、最終的に得た蛹の数に対する割合を求めてこれを蛹化率とした。

## 2.17. 統計解析

使用した統計検定は図の説明に記載した。サンプルサイズは、経験的に決定された。各実験は適切な対照を伴い、サンプルは同一の条件下で収集され、分析された。統計解析はすべて GraphPad Prism で行った。

## 2.18. 使用したショウジョウバエ系統

Genotype	Source or reference	#Stock
<i>UAS-CG14044</i>	FlyORF	F003800
<i>UAS-dcr2; actin-Gal4/CyO</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	25708
<i>Nubbin-gal4, UAS-GFP</i>	Iswar Hariharan	NA
<i>UAS-synr WT</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr BH3 motif mutant</i>	This paper	NA
<i>UAS-GC3Ai</i>	Magali Suzanne	NA
<i>Nubbin-gal4; UAS-GC3Ai</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr Δ ccd1</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr Δ ccd2</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr Δ ccd1-2</i>	This paper	NA
<i>UAS-HA-synr WT</i>	This paper	NA
<i>UAS-HA-synr Δ BH3 motif</i>	This paper	NA
<i>UAS-HA-synr Δ ccd</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr BH3 motif AA substitution mutant</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr ccd AA substitution mutant</i>	This paper	NA
<i>Nubbin-gal4, UAS-GFP; UAS-synr</i>	This paper	NA
<i>UAS-mCherry RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	35785
<i>UAS-Debc1 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	27083
<i>UAS-Debc1 RNAi-2</i>	Vienna Drosophila Resource Center	106669
<i>UAS-Buffy RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	29608
<i>UAS-Dcp1 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	28909
<i>UAS-Dcp1 RNAi-2</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	38315
<i>Nubbin-gal4; UAS-synr, UAS-GC3Ai</i>	This paper	NA
<i>UAS-luciferase RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	31603
<i>mcherry-mitochondria</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	665536
<i>act-Atg8a-mCherry</i>	Eric Baehrecke	NA
<i>UAS-Atg2 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	27706
<i>UAS-Atg8a RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	28989
<i>UAS-YFP-Rab27</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	24769
<i>UAS-Atg1 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	26731

<i>UAS-Atg5 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	27551
<i>UAS-Atg9 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	28055
<i>UAS-Atg12 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	27552
<i>UAS-Atg18 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	28061
<i>Nubbin-gal4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	25754
<i>UAS-rpr</i>	Fly ORF	2188
<i>Nub-gal4, UAS-GFP; UAS-rpr</i>	This paper	NA
<i>vg-gal4, UAS-GFP</i>	This paper	NA
<i>vg-gal4, UAS-GFP; UAS-rpr</i>	This paper	NA
<i>UAS-p53</i>	FlyORF	F000091
<i>Nub-gal4, UAS-GFP; UAS-p53</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr RNAi</i>	This paper	NA
<i>UAS-synr RNAi 2</i>	This paper	NA
<i>Nubbin-gal4; UAS-p53, UAS-GC3Ai</i>	This paper	NA
<i>5966GS-gal4</i>	Heinrich Jasper	NA
<i>5966GS-gal4; UAS-GC3Ai</i>	This paper	NA
<i>Myo1d-gal4</i>	DGRC	112001
<i>CG14044<sup>MI09290</sup></i>	Bloomington Drosophila Stock Center	50506
<i>synr-/-</i>	This paper(outcrossed 50506 with Or)	NA
<i>w<sup>1118</sup></i>	Erina Kuranaga	NA
<i>Oregon R</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	4269



### 3. 結果

#### 3.1. CG14044 の発見

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) には本当に BH3-only タンパク質が存在しないかを調べるために、既知の BH3-only タンパク質の配列を用いて UniProt 上での BLAST 解析を行なった。その結果、ヒト BIK と類似性を持つ遺伝子、CG14044 が発見された。CG14044 と BIK が類似性を示した領域は短く限定的ではあったが、その領域内に BIK の BH3 モチーフが含まれていた(図 6-A)。BH3 モチーフは 13 のアミノ酸配列からなり、その中のいくつかはアミノ酸の特徴によって定義付けられている(図 1-A) (Day CL *et al.*, 2008; Rubinstein AD *et al.*, 2011)。BIK の BH3 モチーフと類似性を示した CG14044 の配列とこの BH3 モチーフ定義配列を比較したところ、CG14044 の配列も BH3 モチーフの定義を満たすことが明らかになった。CG14044 に他の BH1,2,4 ドメインにあたる配列は見られなかったが、一方で 2 つの coiled-coil ドメインを持っていた(図 6-B)。

CG14044 がどの程度種間で保存されているのか検討するため、進化学的解析を行なった。その結果、CG14044 は既存の BH3-only タンパク質と相同性は示さなかった。また、当初アライメントをした BIK は脊椎動物にのみ見られることが知られているため(Rech de Laval *et al.*, 2014)、CG14044 と Bik のアライメントは偶発的な類似性であったことが示唆される。その一方で、CG14044 は 2 つの離れた coiled-coil ドメインによって定義される Panther family、PTHR21974 (<http://www.pantherdb.org/panther/family.do?clsAccession=PTHR21974>) に属することが明らかとなった(図 6-C)。また BH3 モチーフの配列はハエ下目(Muscomorpha)内で保存されていることから、BH3 モチーフの獲得は双翅目(Diptera)内で起こったと予測された。このような、BH3 モチーフの獲得方法は既知の BH3-only タンパク質の出現の方法と一致している(Aouacheria *et al.*, 2005; Aouacheria *et al.*, 2013; Aouacheria *et al.*, 2015)。

次に CG14044 の機能を調べるため過剰発現をした。全身に発現する *Actin* ドライバーによって GAL4 を誘導し、*UAS-synr* を過剰発現をすると、幼虫期での致死性を示した(図 6-D)。また *nubbin* ドライバーを用いた翅原基での過剰発現によって、カスパーゼの活性化、DNA の断片化を翅原基で、また蛹期で翅のメラニン化、成虫翅の構造異常が認められた(図 6-E)。以上の結果から、CG14044 は BH3 ドメインを持ち、且カスパーゼ活性を伴う細胞死を誘導することが明らかになり、この遺伝子を *sayonara(synr)* と名付けた。

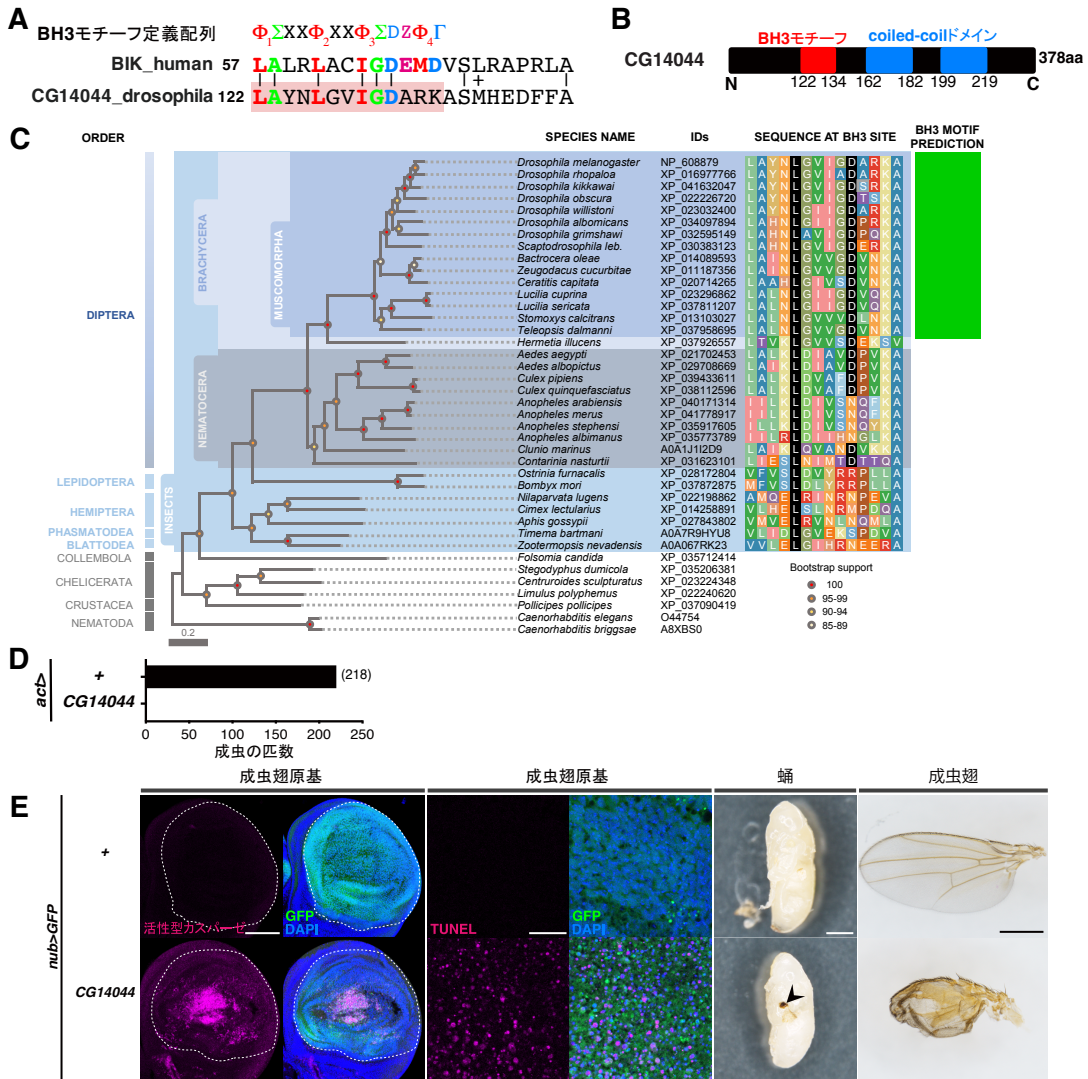


図6. CG14044 の発見

**A.** CG14044 はヒト BIK の一部とアライメントされる。BH3 モチーフ定義配列中の  $\Phi$ 、 $\Sigma$ 、 $Z$ 、 $\Gamma$  はそれぞれ疎水性アミノ酸、側鎖が小さいアミノ酸、酸性アミノ酸、親水性アミノ酸を指す。 **B.** CG14044 の模式図、BH3 モチーフと二つの coiled-coil ドメインを持つ。 **C.** 共同研究者である Abdel Aouacheria、Christophe Combet によって解析、作成された近隣結合法に基づく系統樹。分岐点の丸はブートストラップ値を示す (図右下参照)。この値が 100 に近い (赤色) ほど予測が確からしい。BH3 motif prediction 欄 (図右緑バー) では BH3 モチーフの有無がそのアミノ酸配列を元に BCL2DB データベース (Rech de Laval V *et al.*, 2014) を利用して検討されている。 **D.** *Actin* ドライバーを用いた CG14044 の全身性過剰発現は幼虫期での致死性を示す。 **E.** *nubbin* ドライバーによる成虫翅原基 wing pouch での CG14044 の過剰発現は、カスパーゼの活性化、DNA の断片化、蛹の翅でのメラニン化、成虫翅での構造異常を引き起こす。点線部は GFP ポジティブ領域であり、*nubbin* ド

ライバーの発現範囲を示す。

スケールバーの縮尺は以下の通り, 100  $\mu\text{m}$  (**E**:活性型カスパーゼ)、20  $\mu\text{m}$  (**E**:TUNEL)、500  $\mu\text{m}$ (**E**:蛹、成虫翅)。

### 3.2. *synr*の機能と BH3 モチーフ

BH3-only タンパク質によるカスパーゼの活性化には BH3 モチーフが必要である(序論: 1.3 BH3-only タンパク質内の BH3 モチーフ参照)。Synr における BH3 モチーフの重要性を確認するため、*synr* 過剰発現系を二種作成した。1 つは野生型 *synr*(*synr* WT) であり、もう一方は BH3 モチーフ欠損変異型 *synr*(*synr*  $\Delta$  BH3)である。欠損変異型では野生型から BH3 モチーフ領域の全てを取り除いた(図 7-A)。

翅原基で過剰発現し、成虫翅の大きさと、翅原基におけるカスパーゼの活性化を測定した。カスパーゼ活性はカスパーゼ活性レポーターである GC3Ai(Schott *et al*, 2017) を用いて観察した。野生型 *synr* の過剰発現では、コントロールに比べ成虫翅のサイズが有意に減少し(図 7-B,B')、カスパーゼの活性化が有意に増加した(図 7-C,D)。しかし、BH3 モチーフ欠損変異型の *synr* の過剰発現では、翅のサイズ、カスパーゼ活性について共に変化が見られなかった(図 7-B-D)。以上の結果は、*synr* が他の BH3-only タンパク質と同様に、BH3 モチーフを介してカスパーゼの活性化、アポトーシスを誘導していることを示唆している。

次に coiled-coil ドメインの必要性を検討するため、1 つ目の coiled-coil ドメインのみ(*dcc1*)、2 つ目の coiled-coil ドメインのみ(*dcc2*)、また両方の coiled-coil ドメイン(*dcc1-2*)を取り除いた欠損変異型 *synr* を作成した(図 2-E)。これらの変異体を翅原基で過剰発現すると、どの系統においても翅サイズの減少が見られず、coiled-coil ドメインの重要性も示唆された。(図 7-F)。

上記の欠損変異はタンパク質の構造に影響している可能性があるため、BH3 モチーフ、coiled-coil ドメインのアミノ酸置換変異体も作成した。BH3 モチーフについては先行研究に倣い、保存性の高い 4 つの疎水性アミノ酸をグルタミン酸に置換した(図 7-G)(Chen *et al*, 2005)。coiled-coil ドメインでは疎水性、親水性アミノ酸の繰り返し配列、また荷電性のアミノ酸が  $\alpha$  ヘリックスの構造を保つ上で重要だと言われている(Mason & Arndt, 2004)。構造への影響を最小限に留めつつも、タンパク質間の相互作用を抑制するため、全ての疎水性のアミノ酸と荷電性のアミノ酸をグリシンに置換した(図 2-H)。これらの変異体の過剰発現においても、野生型で見られる翅のサイズ減少が見られなかった(図 7-I)。以上の結果より BH3 モチーフ、coiled-coil ドメインが *synr* の機能に重要であることが示された。

さらに、BH3 モチーフの欠損変異体、アミノ酸置換変異体についてタンパク質の発現量が野生型に比べ減少していないかを確認した。野生型、またそれぞれの変異体に HA タグを付加した新たな過剰発現システムを作出し、免疫染色によって発現量を観察した。

その結果、野生型に比べ二つの変異体においてより高い *Synr* の発現が確認された(図 7-J)。したがって、変異体で見られる表現型の回復は、単に発現量の減少によるものではないことが明らかになった。

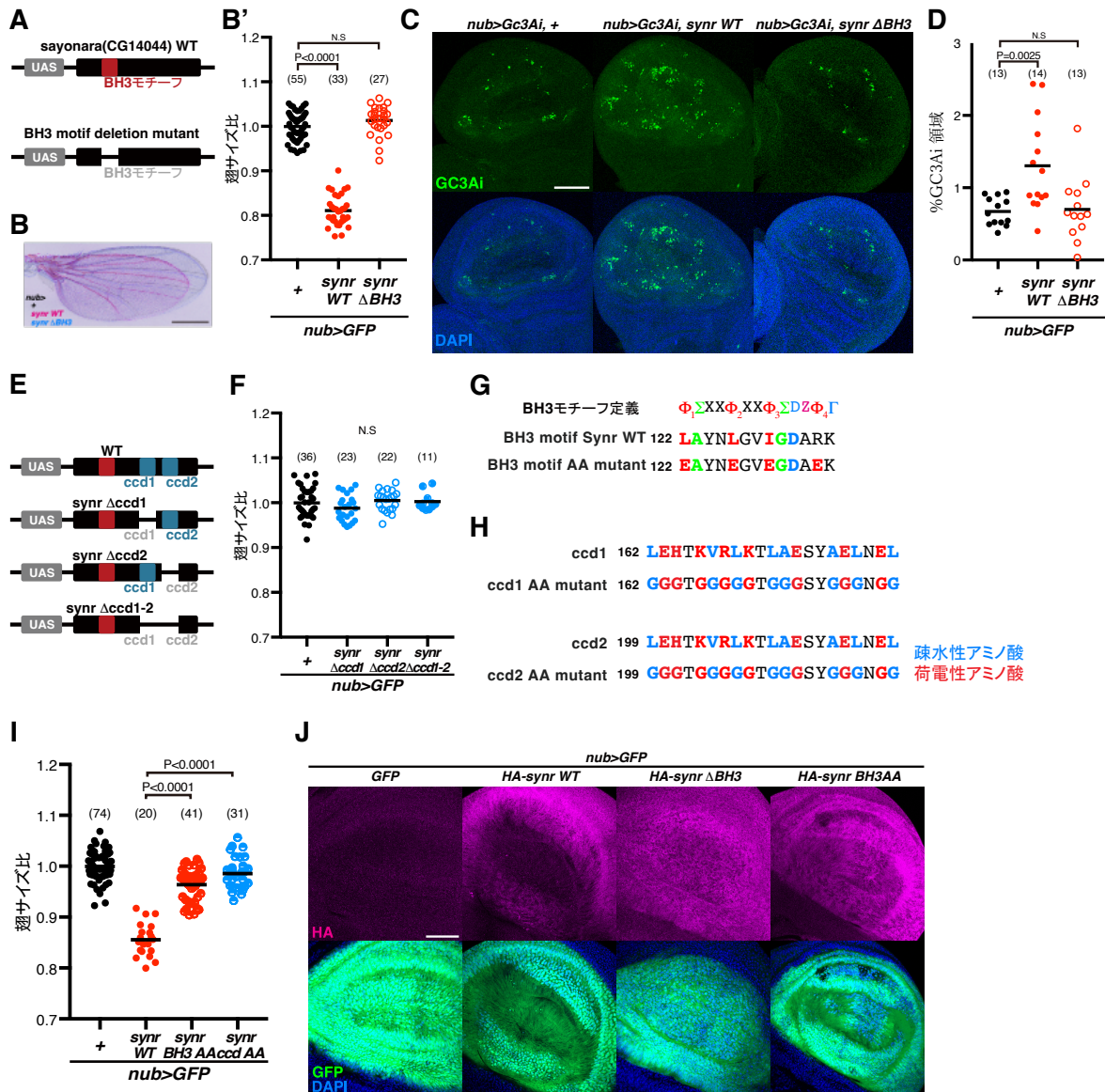


図7. *synr* は BH3 モチーフを介して細胞死を誘導する。

A. 野生型 *synr* (*synr* WT) と BH3 モチーフ欠損変異体 (*synr* motif deletion mutant, *synr*  $\Delta$  BH3) の模式図。欠損変異体では BH3 モチーフに該当するすべての領域を取り除いた。 B. wing pouch における *synr* WT、*synr*  $\Delta$  BH3 の過剰発現を誘導した成虫翅。黒はコントロール、マゼンダは *synr* WT の、青は *synr*  $\Delta$  BH3 を過剰発現した翅を示す。 B'. B の定量。BH3 モチーフの欠損により *synr* 過剰発現に伴う翅サイズの減少がみられない。 C. BH3 モチーフ欠損変異体 *synr* の過剰発現では、

カスパーゼ活性レポーター、GC3Ai のシグナル増加が見られない。 **D.** GC3Ai ポジティブ領域の定量。一定の閾値を超えるシグナルをポジティブと定義し、そのシグナル領域が wing pouch 領域内で占める割合を算出した。 **E.** coiled-coil ドメイン変異体の模式図。BH3 モチーフ同様、coiled-coil ドメイン 1,2 該当する領域を全て取り除いた。 **F.** coiled-coil の欠損によっても Synr による翅サイズの減少が抑制される。 **G.** BH3 モチーフアミノ酸置換変異 (Synr BH3 AA) のアミノ酸配列。4つの保存性の高い疎水性アミノ酸をグルタミン酸に置換した。 **H.** coiled-coil ドメインアミノ酸置換変異 (Synr ccd AA) のアミノ酸配列。 **I.** *synr BH3 AA*、*synr ccd AA* の過剰発現では *synr* 過剰発現による翅サイズの減少が抑制された。 **J.** HA タグが付加された *synr* を wing pouch で発現し、HA タグ抗体で免疫染色した。Synr  $\Delta$ BH3, Synr BH3AA の発現量は Synr WT に比べて減少していない。GFP シグナルは nubbin ドライバーの発現領域を示す。

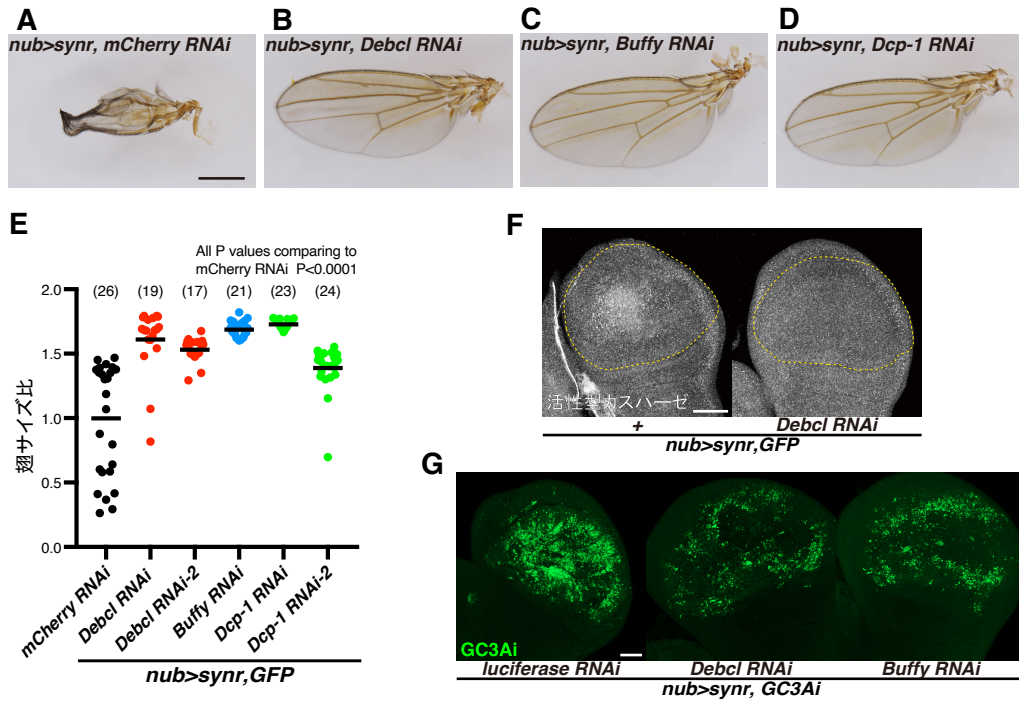
統計解析は one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test を利用して行なった。

スケールバーの縮尺は以下の通り, 100  $\mu$ m (**C**)、50  $\mu$ m (**J**)。

### 3.3. Synr が誘導する細胞死の分子機構同定

次に Synr 下流の分子機構を検討した。BH3-only タンパク質は、BCL-2 ファミリータンパク質を介してカスパーゼの活性化を制御することが広く知られている(序論:1.2. BCL2 ファミリータンパク質参照)。ショウジョウバエは、2 種類の BCL-2 ファミリータンパク質、*Drob-1/Debcl/dborg-1/dBok* (Igaki *et al.*, 2000; Colussi *et al.*, 2000; Brachmann *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; 以後 *Debcl*) と *Buffy/dborg-2*(Quinn *et al.*, 2003; Brachmann *et al.*, 2000; 以後 *Buffy*)を有している。*synr* 過剰発現下で *Debcl*、*Buffy* をノックダウンすると、成虫翅の構造異常が回復した(図 8-A-C,E)。本来 *Debcl* はアポトーシス促進系の BCL-2 タンパク質として(Brachmann *et al.*, 2000; Colussi *et al.*, 2000; Igaki *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000)、*Buffy* はアポトーシス抑制系の BCL-2 タンパク質として同定されたが(Quinn *et al.*, 2003)、両者とも細胞の種類や状況によって促進系、抑制系どちらの働きも示すことが知られている(Clavier *et al.*, 2015; Doumanis *et al.*, 2007; Igaki & Miura, 2004; Senoo-Matsuda *et al.*, 2005)。Synr の下流においては、*Debcl* も *Buffy* もアポトーシス促進系の機能を持つことが示された。また BCL-2 ファミリータンパク質に加え、ショウジョウバエの実行型カスパーゼである *Dcp-1* のノックダウンによっても翅の構造異常は回復した(図 8-D,E)。

次に成虫翅原基におけるカスパーゼ活性への影響を確認した。*Debcl*、*Buffy* をノックダウンすることで活性型 *Dcp-1* のシグナルが減少し(図 8-F)、また GC3Ai のシグナルも有意に減少した(図 8-G)。以上の結果から、Synr は既知の BH3-only タンパク質と同様に、カスパーゼ、BCL-2 ファミリータンパク質の上流で機能していることが示唆された。



**図8.** *Synr* は BCL-2 ファミリータンパク質、*Debcl*、*Buffy* さらに *Dcp-1* を介してアポトーシスを誘導する。

**A-D.** *synr* 過剰発現による翅の構造異常は、*Debcl*、*Buffy*、*Dcp-1* のノックダウンによって抑制される **E.** *synr* の過剰発現とアポトーシス因子のノックダウンによる翅サイズの定量 **F.** *Debcl* の阻害により、*Synr* によるカスパーゼの活性化が抑制される。 **G.** *Debcl*、*Buffy* のノックダウンにより、*synr* 過剰発現で上昇した GC3Ai シグナルが減少する。

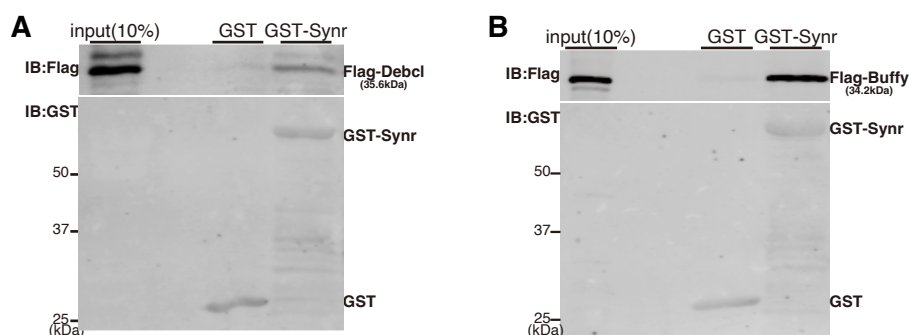
統計解析は one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test を利用して行なった。

スケールバーの縮尺は以下の通り、500  $\mu$ m in **A-D**、50  $\mu$ m (**F**、**G**)。



### 3.4. Synr と Debcl, Buffy の相互作用

BH3-only タンパク質は BCL-2 ファミリータンパク質との直接的な結合により、アポトーシスを制御している(序論：1.3. BH3-only タンパク質内の BH3 モチーフ参照)。上記の実験により *synr* と BCL-2 ファミリータンパク質、*Buffy*、*Debcl* の遺伝学的に関与が示唆されたため、次にタンパク質間の相互作用を検討するため生化学実験を行なった。GST タグを付与した Synr(GST-Synr)を大腸菌で、Flag タグを付与した Buffy、Debcl を HEK293T 細胞で発現し両者を用いて GST プルダウンアッセイを行なった。その結果 Synr と Debcl、Buffy それぞれの相互作用が認められた(図 9-A,B)。



**図9.** Synr は Debcl、Buffy と相互作用する。

**A-B.** Flag-Debcl、Flag-Buffy を HEK293T 細胞で発現させ、そのライセートをグルタチオンセファロースと結合させた GST、もしくは GST-Synr とインキュベーションし結合を評価した。Flag-Debcl、Flag-Buffy は GST 単体ではプルダウンされない一方で、GST-Synr ではプルダウンされた。



### 3.5. Synr と Debcl, Buffy 間相互作用における BH3 モチーフ

BH3-only タンパク質は BH3 モチーフを介して BCL-2 ファミリータンパク質と結合し、BH3 モチーフを除くことでその結合が抑制される。Synr と Debcl、Buffy 間相互作用における BH3 モチーフの重要性を検討するため、BH3 モチーフ欠損変異を用いてプルダウンアッセイを行なった。また遺伝学の実験において、coiled-coil ドメインも Synr の機能に必須であったため(図 7-F)、coiled-coil ドメインについても同様に検証した。すると BH3 モチーフの欠損によっても、coiled-coil ドメインの欠損によっても、プルダウンされた Debcl、Buffy 量に変化は見られず、どちらの領域についてもタンパク間相互作用における重要性が認められなかった(図 10-A-D)。

以上の結果は Debcl と Buffy は BH3 モチーフの有無に関わらず Synr と相互作用できることを示唆している。その一方で、遺伝学の実験では BH3 モチーフがカスパーゼの活性化に重要であることが示されている(図 7-C-D)。以上から、Debcl と Buffy は Synr の BH3 モチーフに結合しており、その位置での結合が機能においては重要であるものの、両者間の結合は BH3 モチーフ以外でも行われているため、欠損変異において相互作用が維持されたのではないかと仮定した。この仮説を検証するため、Synr の BH3 モチーフにおける Buffy、Debcl の結合を評価できるパラベンゾイルフェニルアラニン(BPA)光架橋アッセイを行なった(Chin *et al*, 2002; Shiota *et al*, 2011)。このアッセイでは結合を評価したい部位のアミノ酸を、光架橋側鎖を持つ非天然アミノ酸 BPA で置換し、UV 照射を行うことで近傍タンパク質との架橋を可能にする。この架橋は SDS 存在化においても維持されるため、近傍タンパクのシグナルが BPA 挿入タンパク質との複合体のシグナルとしてシフトアップし、標的部位における結合が評価できる(図 10-E)。

alphafold2(Jumper *et al*, 2021)を利用して Synr の構造を予測したところ BH3 モチーフが  $\alpha$  ヘリックスの中間に存在していた(図 10-F)。この構造予測をもとに、BH3 モチーフ内と構造的に BH3 モチーフに隣接する箇所のアミノ酸を標的に BPA 置換位置を設定した(図 10-G)。その結果 BH3 モチーフの内側に位置するチロシン(124Y)と構造的に近接するフェニルアラニン(141F)において Buffy、Debcl との結合が確認された。一方で、BH3 モチーフと構造的に離れたチロシン(340Y)においては結合が見られなかった。以上の結果より、Buffy と Debcl は Synr の BH3 モチーフに直接的に結合していることが明らかとなった(図 10-H,I)。

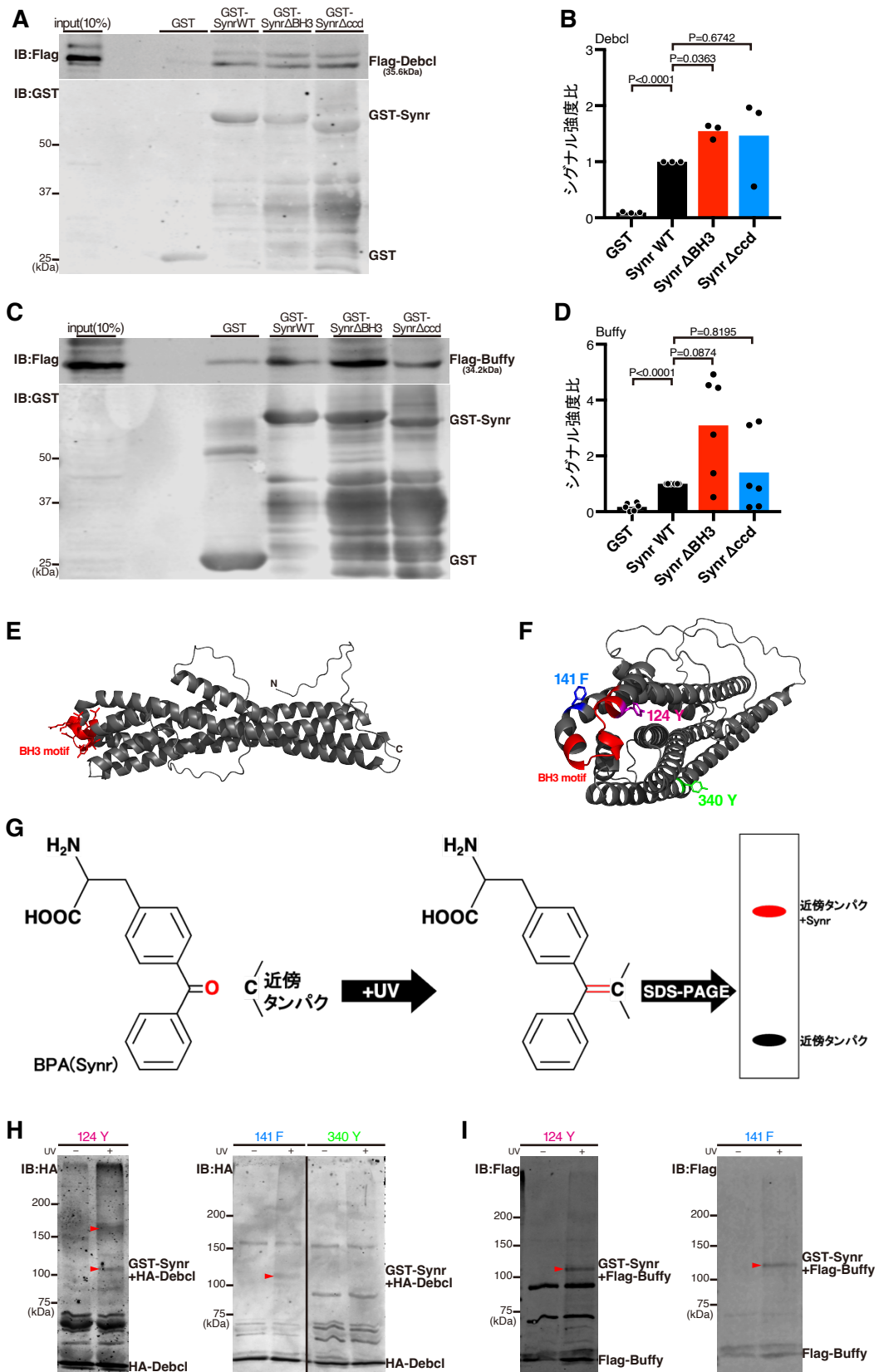


図10. Debcl、Buffy は Synr の BH3 モチーフにおいても直接結合している。

**A.** BH3 モチーフ、また coiled-coil ドメインの欠損変異体においても、Synr と Debcl 間の結合は維持される。 **B. A** の実験における Debcl シグナルの定量。SynrWT でプルダウンされた Debcl のシグナル強度を 1 としてシグナル比を試行毎に算出した。グラフ上の点はそれぞれの試行においての値を示す。試行は 3 回行った。 **C.** BH3 モチーフ、また coiled-coil ドメインの欠損では、Synr と Buffy の結合は抑制されない。 **D. C** の実験における Buffy シグナルの定量。SynrWT でプルダウンされた Buffy のシグナル強度を 1 としてシグナル比を試行毎に算出した。グラフ上の点はそれぞれの試行においての値を示す。試行は 6 回行った。 **E.** BPA 光架橋アッセイの模式図。BPA の光架橋側鎖が UV 照射依存的に近傍アミノ酸と脱水反応を経て共有結合を形成する。この結合は SDS 存在下でも保持されるため、複合体のシグナルが得られる。 **F.** alphafold 2 による Synr の構想予測。赤で示された範囲は BH3 モチーフの領域。 **G. F.** を反時計回りに回転させた図。BH3 モチーフ内の 124 チロシン(124 Y: マゼンタ)、BH3 モチーフ近傍の 141 フェニルアラニン(141 F: 青)、ネガティブコントロールとして BH3 モチーフに配列的にも、構造的にも遠い 340 チロシン(340 Y: 緑)をそれぞれ BPA で置換した。 **H.** Debcl は Synr の 124 Y、141 F において結合するため、UV 依存的なシフトアップシグナルが見られる。一方で 340 Y では相互作用を示さず、UV 依存的なシグナルは見られない。 **I.** Buffy も Synr の 124 Y、141 F において結合する。

統計解析は one-way Repeated measures ANOVA with Dunnett's post hoc test を利用して行なった。

### 3.6. Synr, Debcl, Buffy 複合体の形成

哺乳類におけるアポトーシス促進系 BCL-2 ファミリータンパク質である BAX と BAK は主に冗長的な機能を持つ(T Lindsten *et al.*, 2000; W X Zong *et al.*, 2001)。その一方で *synr* の下流において、*Buffy*、*Debcl* はどちらも細胞死の誘導において不可欠である。また、本研究において *Synr* と *Buffy*、*Debcl* 間の結合が認められたが、先行研究において *Buffy* と *Debcl* が結合することも知られている(Quinn *et al.*, 2003)。以上から、*Synr*、*Debcl*、*Buffy* が複合体を形成しているのではないかと考えた。本仮説を検証するため、*Synr*、*Debcl*、*Buffy* 三種の存在化において GST プルダウンアッセイを行なった。すると *Debcl*、*Buffy* のバンドがどちらも得られ、複合体形成の可能性が示された(図 11-A)。この可能性をさらに検証するため、二段階の免疫沈降(sequential IP)を行なった。Myc-*Synr*、HA-*Debcl*、Flag-*Buffy* を HEK293T 細胞に共発現させ、ライセートを一段階目は Flag 抗体で免疫沈降し、*Buffy* 結合タンパク質を Flag ペプチドによる溶出をし、さらに Myc 抗体による免疫沈降を行なった(図 11-B)。その結果、二段階の免疫沈降後の *Debcl* のシグナルが得られ、*Synr*、*Debcl*、*Buffy* 三者間の複合体の存在が示唆された(図 11-C)。

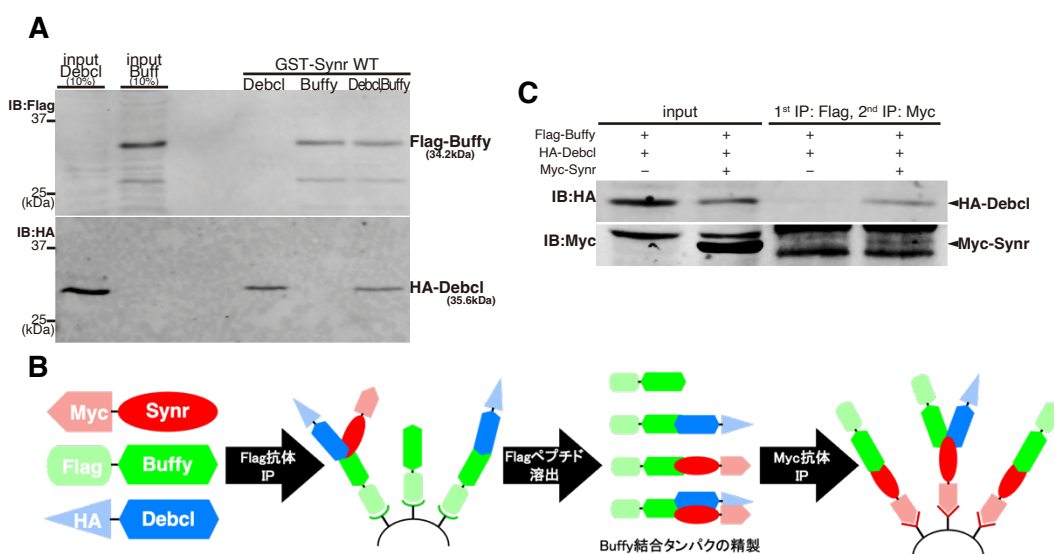


図11. Synr、Debcl、Buffy は複合体を形成し得る。

**A.** Flag-Buffy、HA-Debcl の両方を用いた GST-Synr プルダウンにおいて、両方のシグナルが一挙に得られた。 **B.** sequential IP の模式図。一段階目は Flag 抗体を用いて免疫沈降し、Flag ペプチドを用いて Flag-Buffy 結合タンパク質を抽出し、得られたタンパクを用いて二段階目の Myc 抗体による免疫沈降を行った。この解析を通して、Flag タグタンパク質、Myc タグタンパク質両方に結合しているタンパク質のみが得られる。 **C.** HA-Debcl のシグナルが Flag 抗体、Myc 抗体の二段階免疫沈降の後に観察された。

### 3.7. Synr の細胞内局在

次に Synr の細胞内局在を検討した。本実験ではこれまで着目した翅原基に加え、細胞のサイズが大きく観察に最適な唾液腺も併せて使用した。

BH3-only タンパク質の多くはミトコンドリア に局在することが知られている (Popgeorgiev N *et al.*, 2018) ため、まずミトコンドリアに着目した。翅原基において、一部のシグナルはミトコンドリアへの局在を示したものの、唾液腺において共局在は観察されなかった(図 12-A)。

一方で興味深いことにオートファゴソームのマーカである Atg8a シグナルと Synr が強い共局在を示した(図 12-B)。さらにオートファゴソームに局在することが知られる Rab27 (Nagy *et al.*, 2015; Underwood *et al.*, 2020) ともシグナルが一致し(図 12-C)、Synr のオートファゴソームへの局在が示唆された。

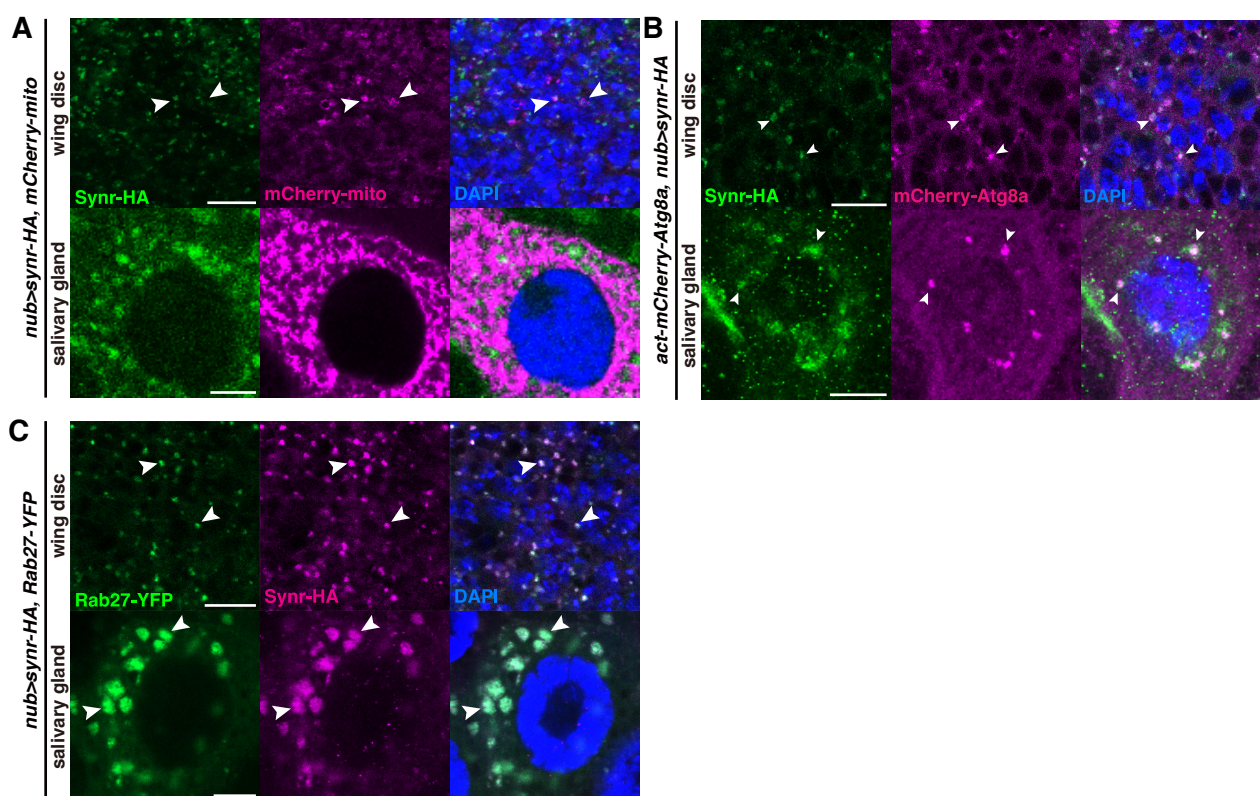


図12.Synr はオートファゴソームに局在する。

**A.** Synr のミトコンドリアへの局在。Synr の過剰発現系 (FlyORF, #F003800) には C 末端に HA タグが付加されているため、HA 抗体を用いた免疫染色を Synr に対し行った。翅原基では一部の Synr が局在を示すものの、唾液腺では見られない。 **B.** Synr と Atg8a シグナルは強い共局在を示す。 **C.** Synr と Rab27 も共局在する。矢尻は共局在するシグナルを指す。

スケールバーの縮尺は 10  $\mu$  m



### 3.8. Synr 下流におけるオートファジー活性

Synr の局在の結果を元に、Synr の機能とオートファジーが関係している可能性が浮上した。そこで、Synr 下流におけるオートファジーの活性化を調べるため、Lysotracker 染色を行なった。すると *synr* を過剰発現している翅原基においてシグナルの蓄積が見られた(図 13-A)。同様に Atg8a のシグナルも上昇していた(図 13-B)。したがって、*synr* はアポトーシス経路のみではなく、オートファジー経路も活性化していることが明らかになった。

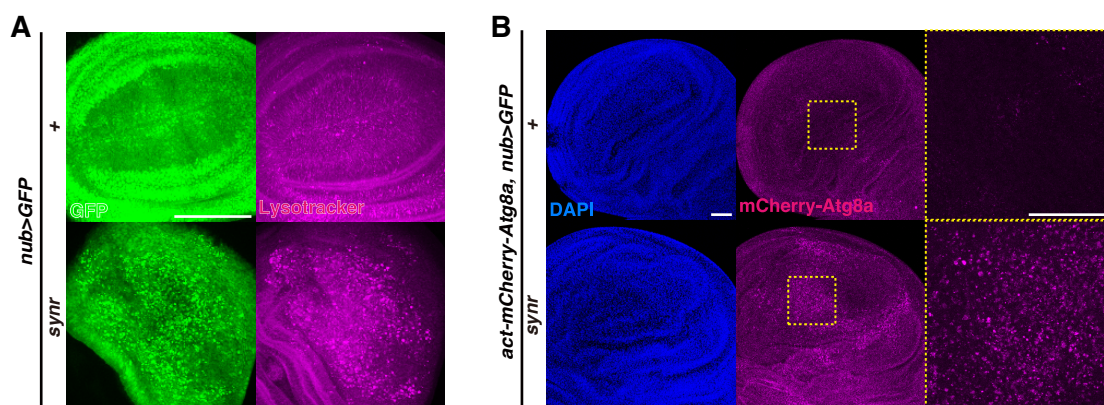


図13.Synr 下流でオートファジー経路も活性化される。

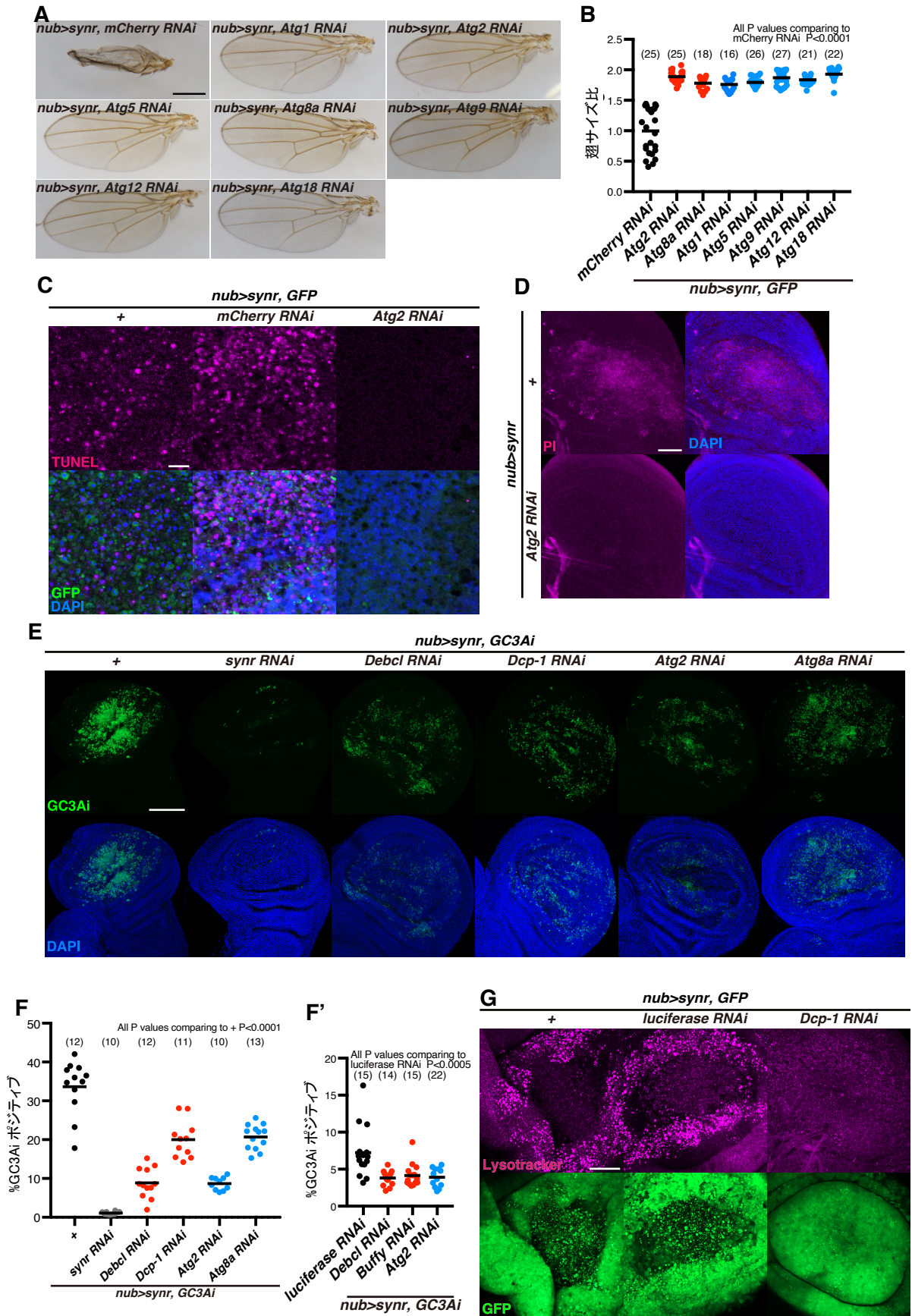
**A.** *synr* の過剰発現はオートライソソームを示す Lysotracker のシグナルを増加させる。GFP は *synr* の発現領域を示す。 **B.** *synr* 過剰発現は Atg8a のシグナルも増加させる。

スケールバーの縮尺は以下の通り, 100  $\mu$  m (**A**)、50  $\mu$  m (**B**)。

### 3.9. Synr 下流におけるアポトーシス、オートファジー経路の相互作用

オートファジー経路とアポトーシス経路は互いに相互作用することが広く知られているが、その関係性は複雑である(序論：1.5. オートファジーとアポトーシスの相互作用参照)。一般的にはオートファジーは生存促進機関として、ストレス状況下においてアポトーシスによる細胞死を抑制する(Gump JM *et al.*, 2011; Marino G *et al.*, 2014)。その一方で、細胞死促進的にオートファジーがアポトーシスの開始を促進する例や(Mohseni *et al.*, 2009; Nagata *et al.*, 2019; Scott *et al.*, 2007)、アポトーシス経路がオートファジーによる細胞死の上流で機能する報告もある(Hou *et al.*, 2008; Lindsay De Vorkin *et al.*, 2014)。このようにオートファジーの機能は状況や器官によって様々である。Synr 下流におけるオートファジーの機能を検討するため、*synr* 過剰発現下において *Atg* 遺伝子のノックダウンを行なった。興味深いことに、*Atg* 遺伝子のノックダウンは、Synr 過剰発現による成虫翅の構造異常を回復し(図 14-A,B)、さらには翅原基における DNA の断片化(図 14-C)、また細胞死を抑制した(図 14-D)。以上の結果は、Synr 下流におけるオートファジーが単に細胞死を抑制する生存機構としてではなく、細胞死促進的に機能していることを示している。

Synr 下流におけるオートファジー経路とアポトーシス経路の関係性の更なる解明を試みた。上記のように先行研究では、オートファジーの上流でアポトーシス経路が機能する例と、逆にアポトーシス経路の上流でオートファジー経路が機能する例が報告されていたため、どちらの経路が上流で働いているのかを検討した。まずオートファジー経路の抑制によるアポトーシス経路の活性化への影響を検証した。*Atg2* と *Atg8a* のノックダウンは *Dcp-1*、*Debcl* のノックダウンと同程度にカスパーゼの活性化を抑制した(図 14-E,F,F')。反対に、アポトーシス経路を *Dcp-1* のノックダウンで阻害したところ、*synr* 過剰発現による Lysotracker シグナルの上昇が抑制された(図 14-G)。以上の結果は、両経路が互いに依存的に活性化し細胞死を誘導していることを示し、Synr 下流におけるアポトーシス経路、オートファジー経路間の正のフィードバックループの存在を示唆している。





**図14. Synr 下流においてアポトーシス経路、オートファジー経路は共依存的に活性化し合い細胞死を引き起こす。**

**A.** *synr* 過剰発現下で *Atg* 遺伝子群のノックダウンによりオートファジー経路を抑制すると成虫翅の構造異常が回復する。 **B. A.** の定量。 **C.** *Atg2* のノックダウンによって *synr* 過剰発現による DNA の断片化が阻害される。GFP のシグナルは *nubbin* ドライバーの発現領域を示す。 **D.** PI 染色によって死細胞を観察した。*Atg2* のノックダウンは Synr が誘導する細胞死も抑制する。 **E.** *Atg2*, *Atg8a* のオートファジー関連遺伝子のノックダウンは、*Debcl* や *Dcp-1* などのアポトーシス因子のノックダウンと同程度に *synr* 過剰発現によるカスパーゼの活性化を抑制する。 **F. E** の定量。 **F'**. コントロール RNAi に比べても、*Atg2* のノックダウンは *Debcl*, *Buffy* のノックダウンと同程度カスパーゼ活性化の抑制を示す。 **G.** *Dcp-1* のノックダウンは *synr* 過剰発現下の Lysotracker シグナルの蓄積を抑制する。統計解析は one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test を利用して行なった。スケールバーの縮尺は以下の通り、500  $\mu\text{m}$  (**A**)、10  $\mu\text{m}$  (**C**)、50  $\mu\text{m}$  (**D**, **G**)、100  $\mu\text{m}$  (**E**)。

### 3.11. Rpr 下流におけるオートファジー経路の活性化

このアポトーシス経路、オートファジー経路間の正のフィードバックループの一般性を検討するため *rpr* に着目した。*rpr* はショウジョウバエにおける細胞死誘導因子のひとつであり、発生からストレス応答における細胞死制御で重要な役割をもつ(Goyal *et al.*, 2000)。成虫翅原基における *rpr* の過剰発現によって、Lysotracker シグナルの蓄積(図 15-A)と *Atg8a* シグナルの上昇が確認された(図 15-B)。更に、*rpr* の過剰発現による成虫翅の構造異常をその重症度によってクラス分けをし定量した。すると *Atg2*、*Atg8a* ノックダウンによって、*Dcp-1* ノックダウンと同程度の表現型の回復が見られた(図 15-C)。以上により、アポトーシス経路、オートファジー経路間の正のフィードバックループが *Synr* の下流以外においても機能している可能性が示された。

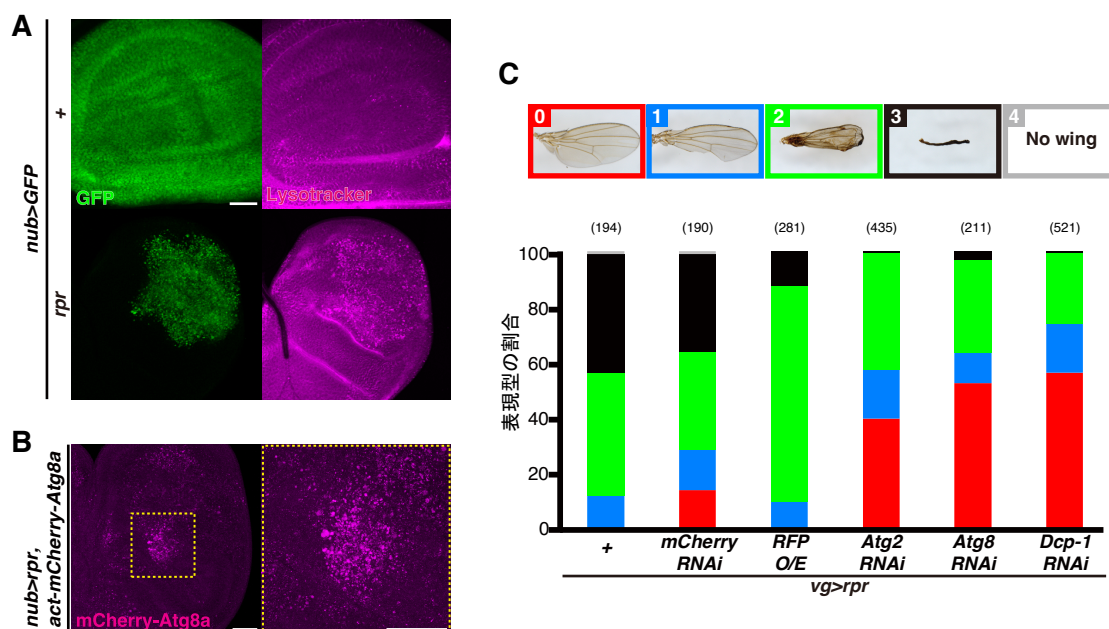


図15. Rpr 下流でも細胞死促進的なオートファジーが誘導される。

**A.** *rpr* の過剰発現により Lysotracker シグナルが上昇する。GFP は *nubbin* ドライバーの発現領域を示す。 **B.** *rpr* の過剰発現に伴い、*Atg8a* のシグナルも蓄積する。 **C.** *rpr* 過剰発現下の翅の表現型を 5 段階に分類し定量した。クラス 0 が最も軽い表現型で、クラス 4 は最も顕著であり翅が見られない。*Atg2*、*Atg8a* のノックダウンは *Dcp-1* のノックダウンと同程度最も軽い表現型であるクラス 0 を示す翅の割合を増やし、一方でクラス 3 の割合を減少させた。

スケールバーの縮尺は 50  $\mu$  m。

### 3.12. Synr の生理的機能の解明

最後に *synr* のノックダウン、機能欠損型変異体を用いて、Synr の生理的機能を探求した。

#### 3.12.1. *synr* 標的 RNAi の作成

*synr* 標的 RNAi の作成を試みた。shRNAi の作出は先行研究をもとに行なった (Ni JQ *et al.*, 2011)。作成した RNAi は *synr* 過剰発現による成虫翅の構造異常を抑制したことで効率を確認した(図 16-A)。

#### 3.12.2. *synr* 変異体の利用

更なる Synr の生理的機能解明のため *synr* の機能欠損型変異体、CG14044<sup>MI09290</sup> を用いて解析を行った。この変異体は *synr* のエキソン領域に 7000bp 余りの巨大なトランスポゾン、MiMIC が挿入されているため、Synr の機能が失われた変異体である(図 16-B)。

この変異体を使用するにあたり、初めに MiMIC がデータベース通りの位置に挿入されているか確認を行った。データベース上の挿入位置からそれぞれ上下 250bp の位置に対応したプライマーを作成し、PCR を行った(図 16-C)。野生型 *synr* を含む個体から得た DNA を元に、このプライマーを用いて PCR を行うと 500bp の DNA 断片が増幅された(図 16-D: OregonR)。一方で、CG14044<sup>MI09290</sup> から得た DNA を元に、PCR を行うと、MiMIC の挿入によって増幅領域が 7kbp 伸びるため、DNA が増幅されず正しい位置にバンドが見られない(図 16-D: CG14044<sup>MI09290</sup>)。したがって、CG14044<sup>MI09290</sup> は正しい位置に MiMIC が挿入されており、*synr* の変異体として利用可能であった。

また、*synr* 領域以外の遺伝的差異を小さくするため、野生型系統の 1 つである OregonR を用いて、5 世代にわたる異形交配を行った。本研究ではこちらの異形交配後の変異体を使用した。

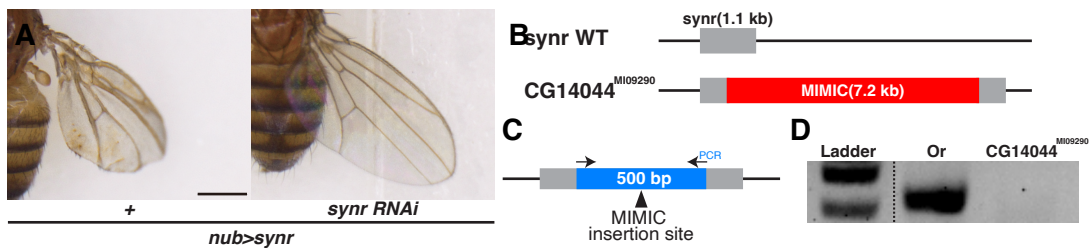


図16. *synr* RNAi の作成と変異体の異系交配

**A.** 作成した *synr* RNAi の発現により、*synr* 過剰発現による翅の構造異常が回復する。**B.** CG14044<sup>MI09290</sup> の模式図。**C.** MiMIC の挿入を確認できるプライマーの設計。**D.** **C** のプライマーを使用したジェノタイプング。OregonR では PCR による増幅がかかるが、CG14044<sup>MI09290</sup> では 7 kb を超える挿入により、増幅がかからない。

スケールバーの縮尺は 500  $\mu$ m。

### 3.12.3. Synr の生理的機能

p53 は哺乳類において BH3-only タンパク質の上流因子として知られている (Nakano *et al.*, 2001; Mathai JP *et al.*, 2002; Happo *et al.*, 2012)。Synr も p53 の下流において機能しているのか検討するため、p53 過剰発現下における *synr* のノックダウンを行った。翅原基における p53 の過剰発現によって成虫翅が失われるが、*synr* ノックダウンによってこの表現型は抑制される (図 17-A)。更に、翅原基におけるカスパーゼ活性も *synr* RNAi の発現によって有意に減少した (図 17-B)。以上の結果により、Synr が p53 の下流で内在的に機能していることが明らかとなった。

次に飢餓によるカスパーゼの活性化に着目した。飢餓ストレスにตอบสนองして腸上皮細胞ではカスパーゼが活性化することが報告されている (O'Brien *et al.*, 2011)。この飢餓ストレスに対するカスパーゼの活性化が *synr* のノックダウンによって抑制された (図 17-C)。また興味深いことに、腸上皮細胞における *synr* のノックダウンは飢餓耐性を増加させた (図 17-D)。この飢餓耐性の上昇は *synr* 変異体でも確認された (図 17-E)。

以上のように *synr* 変異体は生存可能であるため、発生には不可欠ではないことが分かる。しかし、この特徴は *Debcl*、*Buffy* の変異体と一致しており、ショウジョウバエにおいて BCL-2 経路が IAP 経路に比べ重要度が低いことが窺える (Sevrioukov *et al.*, 2007)。その一方で、*synr* 変異体は僅かに、しかし野生型に比べ有意に発生速度が早かった (図 17-F)。この結果は、*synr* が発生において必要ではないにしても、何らかの機能を持ち合わせていることを示唆している。

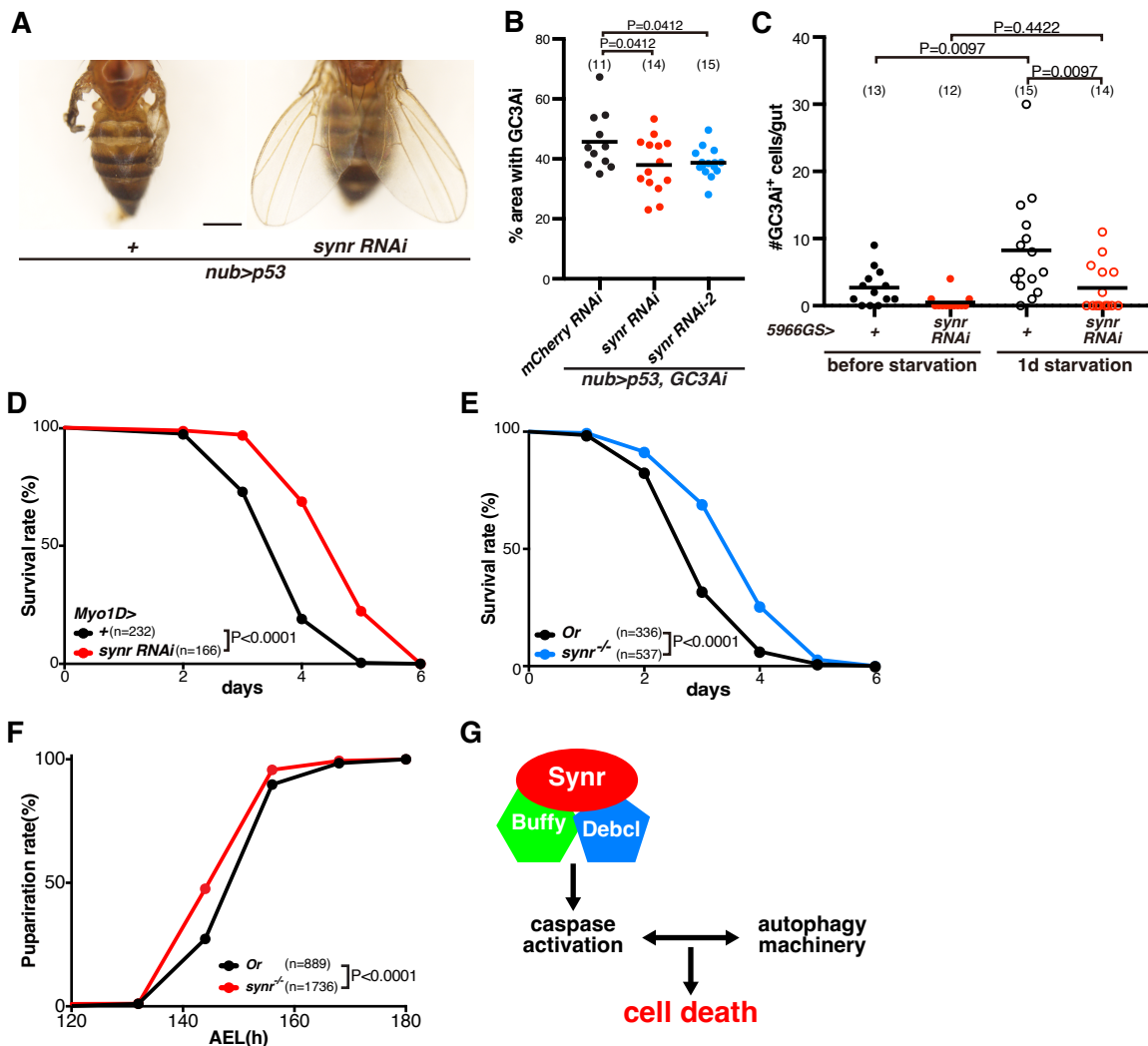


図17. *Synr* は内在的に細胞死を制御する。

**A.** *p53* の過剰発現により成虫翅に顕著な構造異常が見られるが、*synr* のノックダウンによってこの表原型は抑制される。 **B.** *p53* 過剰発現によるカスパーゼの活性化は、*synr* のノックダウンによって抑制される。 **C.** 飢餓条件 1 日後コントロール群ではカスパーゼの活性化が見られる。一方で腸上皮細胞において *synr* をノックダウンすると、このカスパーゼの活性化が見られない。 **D.** 腸上皮細胞における *synr* のノックダウンは飢餓ストレス耐性を増加させる。 **E.** *synr* 変異体においても飢餓ストレス耐性の向上が見られる。 **F.** *synr* 変異体では僅かではあるが、再現性高く野生型に比べ発生速度の増加が見られる。 **G.** *Synr* 誘導型細胞死の仮説モデル。*Synr* は *Buffy*、*Debcl* と複合体を形成し、僅かなカスパーゼの活性化を引き起こす。このカスパーゼの活性化はオートファジー経路との正のフィードバックループ介して増幅され、細胞死に至る。

統計解析は one-way Repeated measures ANOVA with with Holm-Sidak's multiple comparisons test (**B**、**C**)、and a log-rank (Mantel-Cox) test (**D**、**E**、**F**) を利用して行

なった。

スケールバーの縮尺は  $500 \mu\text{m}$ 。

## 4. 議論

本研究において、ショウジョウバエにおいて初めての BH3-only タンパク質、*sayonara* が発見された。Synr は既知の BH3-only タンパク質と同様に BCL-2 ファミリータンパク質に結合する。一方で既知の BH3-only タンパク質とは異なり、Synr、Debcl、Buffy で複合体を作り機能する可能性がある。また *synr* の下流ではアポトーシスとオートファジーが協調的に働き、両経路は共依存的に互いを活性化していた(図 17-G)。

### 4.1. *synr* の発見

まず一つ明らかな疑問は、なぜ *synr* がこの 20 年もの間発見されていなかったかという点である。これには三つの要因があると考えている。まず一つは BLAST 解析の精度の向上である。BH3 モチーフはとても短い配列で、BH3 モチーフのみの解析は不可能である。また本研究で発見された *synr* と *BIK* の類似性についても一致度は低く、アライメント範囲もとても狭かった。したがって元来の精度では *synr* が発見されなかった可能性がある。もう一つが、*synr* の細胞死誘導の弱さである。本研究において翅原基の wing pouch において *synr* の過剰発現がアポトーシスを誘導したが、神経や幹細胞などアポトーシス耐性の高い器官において *synr* の過剰発現は構造異常を起こす程の細胞死は誘導できない。また、ショウジョウバエにおけるアポトーシスは、DIAP1、Rpr、Hid、Grim からなる IAP 経路からの制御が大きく、哺乳類、線虫とは異なり、BCL-2 ファミリータンパク質依存経路に比べ、IAP 経路がショウジョウバエにおける細胞死制御の中心であると考えられてきた(Kornbluth S *et al.*, 2005)。IAP 経路因子の喪失は発生不全につながる一方で、Synr、Buffy、Debcl の変異体は通常発生が可能であり、BCL-2 ファミリータンパク質による制御の弱さが窺える。この IAP 経路と BCL-2 ファミリータンパク質依存経路による制御のバランスが、表原型の発見をより難しくしていた可能性もある。以上のことが原因で *synr* の同定が遅れ、今に至った可能性がある。

### 4.2. Synr、Debcl、Buffy の複合体形成

哺乳類の多くの BH3-only タンパク質にとって、BH3 モチーフは BCL-2 タンパク質との結合の場であり、BH3 モチーフの変異は結合も阻害する(K Wang *et al.*, 1996; R Hegde *et al.*, 1998; Haiming Dai *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2005)。哺乳類の BH3-only タンパク質同様に、Synr の BH3 モチーフの除去、アミノ酸の置換は Synr によるカスパーゼの活性化を抑制した。Debcl、Buffy は BH3 モチーフに結合しているが、一方でその結合は BH3 モチーフ欠損変異体においても維持されたままであった。その後の解析によって、BH3 モチーフは Synr、Debcl、Buffy 間複合体の機能に重要である可能性が示されたが、その実証には複合体の構造解析など更なる研究が必要とされる。

また複合体の形成という点でも哺乳類の系と差異が窺える。哺乳類で見られる BH3-only タンパク質とアポトーシス促進系 BCL-2 タンパク質の結合は、ミトコンドリア外膜におけるアポトーシス促進系 BCL-2 タンパクの重合を助け、MOMP を引き起こす。先行研究において *Debcl* のミトコンドリアへの局在が、細胞死促進的機能において重要だと示されているが(Igaki *et al.*, 2000; Igaki & Miura, 2004)、今回 *Synr* の下流ではミトコンドリアの関与は明らかになっていない。ミトコンドリアの関与も含め、*Synr*、*Debcl*、*Buffy* の複合体がどのように *Dcp-1*、オートファジー経路の活性化につながるかもさらなる解析が必要とされる。

#### 4.3. アポトーシス、オートファジー間相互作用

*Synr* の下流において、カスパーゼの活性化にはオートファジー経路の活性化が重要であった。先行研究によって、オートファジーを介したカスパーゼ依存的なアポトーシス誘導が起こること、さらにカスパーゼの活性化がオートファジーを活性化することが報告されている。さらに本研究の結果は、アポトーシス、オートファジー間のポジティブフィードバックの存在を強く示唆した。一般的に BH3-only タンパク質は BCL-2 ファミリータンパク質を介しカスパーゼの活性化を行うので、*Synr* 下流では初めに緩やかな *Dcp-1* の活性化がおこり、それがオートファジーの活性化を誘導し、カスパーゼのシグナルの増幅を起こすと考えている。一方で、この両経路の相互作用を可能にする分子機構の解明は難航している。

特にカスパーゼによるオートファジーの誘導に関する知見は少ない。先行研究で報告されている、*Dcp-1* のミトコンドリアタンパク質 *SesB* を介したオートファジー活性化機構(Hou *et al.*, 2008; Lindsay De Vorkin *et al.*, 2014)を *Synr* においても検証したが、細胞死への影響はなく異なる機構の存在が示された。また、本研究で得られたオートファジー経路の最上流因子は *Atg1(ULK1)*であり、この分子は mTOR 経路からの制御を大きく受けていることが知られている(Joungmok Kim *et al.*, 2011; Irina I Suvorova and Valery A pospelov, 2019)。mTOR 経路の分子を筆頭に、*Atg1* 上流で働く因子を検討したが、どれも関与が認められなかった。アポトーシス経路とオートファジー経路相互作用の分子機構解明は今後の大きな課題である。

本研究は長年不明であったショウジョウバエの BH3-only タンパク質、*Synr* を同定した。*synr* の下流におけるアポトーシスの分子機構、また BCL-2 タンパク質との結合様式は、これまで考えられてきたものとは大きく異なり、ショウジョウバエのアポトーシス機構に関する新たな知見となった。さらにアポトーシス経路、オートファジー経路が依存的に活性化し細胞死を引き起こす、新たな相互作用を提唱した。両経路間の相互作用の分子機構は非常に複雑であり、その解明が急務であるが、*synr* の発見によりショ



ウジヨウバエを用いたアプローチが可能になった。遺伝学操作に強みをもったショウジヨウバエを用いることで、相互作用の分子機構の解明が進むことが期待される。

## 参考文献

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2 *Science* 18;277(5324):370-2.

Aouacheria A, Brunet F, Gouy M (2005) Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 22: 2395-2416

Aouacheria A, Rech de Laval V, Combet C, Hardwick JM (2013) Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends Cell Biol* 23: 103-111

Aouacheria A, Christophe Combet, Peter Tompa, J Marie Hardwick(2015) Redefining the BH3 Death Domain as a ‘Short Linear Motif’. *Trends Biochem Sci*40(12):736-748.

Banjara S, Suraweera CD, Hinds MG, Kvensakul M (2020) The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. *Biomolecules* 10

Bouillet P, Strasser A (2002) BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115: 1567-1574

Brachmann CB, Jassim OW, Wachsmuth BD, Cagan RL (2000) The Drosophila bcl-2 family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation. *Curr Biol* 10: 547-550

Catherine L Day, Callum Smits, F Cindy Fan, Erinna F Lee, W Douglas Fairlie, Mark G Hinds. (2008) Structure of the BH3 Domains from the p53-Inducible BH3-Only Proteins Noxa and Puma in Complex with Mcl-1. *J Mol Biol* 25;380(5):958-71.

Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG (2002) Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of Escherichiacoli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11020-11024

Clavier A, Ruby V, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, Guenal I (2015) The Drosophila retinoblastoma protein, Rbf1, induces a Debcl- and Drp1-dependent mitochondrial apoptosis. *J Cell Sci* 128: 3239-3249

Colussi PA, Quinn LM, Huang DC, Coombe M, Read SH, Richardson H, Kumar S (2000) Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the Drosophila melanogaster cell death machinery. *J Cell Biol* 148: 703-714

Day CL, Smits C, Fan FC, Lee EF, Fairlie WD, Hinds MG. (2008) Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J Mol Biol.* 25;380(5):958-71.

Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. (2016) Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 16(2):99-109.

Denton D, Aung-Htut MT, Kumar S. (2013) Developmentally programmed cell death in Drosophila. *Biochim Biophys Acta.* 1833(12):3499-3506.

Doerflinger M, Glab JA, Puthalakath H (2015) BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *FEBS J* 282: 1006-1016

Doumanis J, Dorstyn L, Kumar S (2007) Molecular determinants of the subcellular localization of the Drosophila Bcl-2 homologues DEBCL and BUFFY. *Cell Death Differ* 14: 907-915

Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. (1996) A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15(11):2685-94.

Erinna F. Lee and W. Douglas Fairlie. (2019) The Structural Biology of Bcl-xL *Int J Mol Sci.* 20(9): 2234.

G Kroemer, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, W S El-Deiry, P Golstein, D R Green, M Hengartner, R A Knight, S Kumar, S A Lipton, W Malorni, G Nuñez, M E Peter, J Tschopp, J Yuan, M Piacentini, B Zhivotovsky, G Melino. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16(1):3-11.

Gautam Das, Bhupendra V. Shrivage, and Eric H. Baehrecke. (2012) Regulation and Function of Autophagy during Cell Survival and Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(6): a008813.

Giam M, Huang DC, Bouillet P (2008) BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 27 Suppl 1: S128-136

Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartwig E, Steller H (2000) Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J* 19: 589-597

Gump JM, Thorburn A (2011) Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol* 21: 387-392

Haiming Dai, Yuan-Ping Pang, Marina Ramirez-Alvarado, Scott H Kaufmann. (2014) Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. *J Biol Chem.* 289(1):89-99.

Happo L, Strasser A, Cory S (2012) BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci* 125: 1081-1087

Hilary M. Ellis, H. Robert Horvitz. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 44(6):817-29.

Hou YC, Chittaranjan S, Barbosa SG, McCall K, Gorski SM (2008) Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J Cell Biol* 182: 1127-1139

Hyung Don Ryoo, Travis Gorenc, Hermann Steller (2004) Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell. (4):491-501.*

Igaki T, Kanuka H, Inohara N, Sawamoto K, Nunez G, Okano H, Miura M (2000) Drob-1, a Drosophila member of the Bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A 97: 662-667*

Igaki T, Miura M (2004) Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochim Biophys Acta 1644: 73-81*

Irina I Suvorova, Valery A Pospelov. (2019) AMPK/Ulk1-dependent autophagy as a key mTOR regulator in the context of cell pluripotency. *Cell Death Dis. 10(4):260.*

J. C. Martinou, Richard J. Youle. (2011) Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev Cell. 21(1): 92–101.*

J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie and A. R. Currie. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer. 26(4):239-57.*

Jason S. King. (2012) Autophagy across the eukaryotes. *Autophagy. 8(7): 1159–1162.*

Jin Li, Deli Zhang, Marit Wiersma, and Bianca J. J. M. Brundel. (2018) Role of Autophagy in Proteostasis: Friend and Foe in Cardiac Diseases. *Cells. 7(12): 279.*

Joungmok Kim, Mondira Kundu, Benoit Viollet, Kun-Liang Guan. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol. 13(2):132-41*

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Zidek A, Potapenko A *et al* (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature 596: 583-589*

Jun R Huh, Ming Guo, Bruce A Hay (2004) Compensatory proliferation induced by cell death in the Drosophila wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol* 14(14):1262-6.

K Wang, X M Yin, D T Chao, C L Milliman, S J Korsmeyer. (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10(22):2859-69.

Kelekar A, Thompson CB. (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8(8):324-30.

Kornbluth S, White K. (2005) Apoptosis in Drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm). *J Cell Sci.* 118(Pt 9):1779-87.

Koto A, Kuranaga E, Miura M. (2011) Apoptosis Ensures Spacing Pattern Formation of Drosophila Sensory. *OrgansCurr Biol.* 21(4):278-87.

Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9(13):1277-87.

Kumar S, Cakouros D (2004) Transcriptional control of the core cell-death machinery. *Trends Biochem Sci* 29: 193-199

Kumar S, Cakouros D. (2004) Transcriptional control of the core cell-death machinery. *Trends Biochem Sci.* 29(4):193-9.

Kuranaga E, Miura M. (2002) Molecular genetic control of caspases and JNK-mediated neural cell death. *Arch Histol Cytol.* 65(4):291-300.

Lindsay DeVorkin, Nancy Erro Go, Ying-Chen Claire Hou, Annie Moradian, Gregg B Morin, Sharon M Gorski. (2014) The Drosophila effector caspase Dcp-1 regulates mitochondrial dynamics and autophagic flux via SesB. *J Cell Biol.* 205(4):477-92.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86(1):147-57.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature.* 419(6907):634-7.

Lomonosova E, Chinnadurai G (2008) BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene 27 Suppl 1: S2-19*

Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol 15: 81-94*

Mathai JP, Germain M, Marcellus RC, Shore GC. (2002) Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene. 21(16):2534-44.*

Mohseni N, McMillan SC, Chaudhary R, Mok J, Reed BH (2009) Autophagy promotes caspase-dependent cell death during *Drosophila* development. *Autophagy 5: 329-338*

Nagata R, Nakamura M, Sanaki Y, Igaki T (2019) Cell Competition Is Driven by Autophagy. *Dev Cell 51: 99-112 e114*

Nakano K, Vousden KH. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell. 7(3):683-94.*

Ni JQ, Zhou R, Czech B, Liu LP, Holderbaum L, Yang-Zhou D, Shim HS, Tao R, Handler D, Karpowicz P, Binari R, Booker M, Brennecke J, Perkins LA, Hannon GJ, Perrimon N. (2011) A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat Methods. 8(5):405-7.*

Nicolson S, Denton D, Kumar S. (2015) Ecdysone-mediated programmed cell death in *Drosophila*. *Int J Dev Biol. 59(1-3):23-32.*

O'Brien LE, Soliman SS, Li X, Bilder D. (2011) Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell. 147(3):603-14.*

Popgeorgiev N, Jabbour L, Gillet G. (2018) Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Front Cell Dev Biol. 6:13.*

Quinn L, Coombe M, Mills K, Daish T, Colussi P, Kumar S, Richardson H (2003) Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. *EMBO J 22: 3568-3579*

R Hegde, S M Srinivasula, M Ahmad, T Fernandes-Alnemri, E S Alnemri. (1998) Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* 273(14):7783-6.

Rech de Laval V, Deleage G, Aouacheria A, Combet C (2014) BCL2DB: database of BCL-2 family members and BH3-only proteins. *Database (Oxford) 2014: bau013*

Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. (2011) The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol Cell. 44(5):698-709.*

Schott S, Ambrosini A, Barbaste A, Benassayag C, Gracia M, Proag A, Rayer M, Monier B, Suzanne M. (2017) A fluorescent toolkit for spatiotemporal tracking of apoptotic cells in living Drosophila tissues. *Development. 144(20):3840-3846.*

Scott RC, Juhasz G, Neufeld TP (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol 17: 1-11*

Senoo-Matsuda N, Igaki T, Miura M (2005) Bax-like protein Drob-1 protects neurons from expanded polyglutamine-induced toxicity in Drosophila. *EMBO J 24: 2700-2713*

Sevrioukov EA, Burr J, Huang EW, Assi HH, Monserrate JP, Purves DC, Wu JN, Song EJ, Brachmann CB (2007) Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. *Genesis 45: 184-193*

Shiota T, Mabuchi H, Tanaka-Yamano S, Yamano K, Endo T (2011) In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proc Natl Acad Sci U S A 108: 15179-15183*

T Lindsten, A J Ross, A King, W X Zong, J C Rathmell, H A Shiels, E Ulrich, K G Waymire, P Mahar, K Frauwirth, Y Chen, M Wei, V M Eng, D M Adelman, M C Simon, A Ma, J A Golden, G Evan, S J Korsmeyer, G R MacGregor, C B Thompson. (2000) The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. *Mol Cell. 6(6):1389-99.*



Valentina Sora, Elena Papaleo. (2022) Structural Details of BH3 Motifs and BH3-Mediated Interactions: an Updated Perspective. *Front Mol Biosci.* 9:864874.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 335(6189):440-2.

Vojo Deretic, Tatsuya Saitoh, and Shizuo Akira. (2013) Autophagy in infection, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13(10): 722–737.

W X Zong, T Lindsten, A J Ross, G R MacGregor, C B Thompson. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 15(12):1481-6.

Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* 10(22):2859-69.

Xinqi Liu, Shaodong Dai, Yanan Zhu, Philippa Marrack, John W Kappler. (2003) The Structure of a Bcl-xL/Bim Fragment Complex: Implications for Bim. *FunctionImmunity.* 19(3):341-52.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275(5303):1129-32.

Yi-Te Hsu, Keith G. Wolter, and Richard J. Youle. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(8): 3668–3672.

Yoomi Chun and Joungmok Kim. (2018) Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. *Cells.* 7(12): 278.

Zhang H, Huang Q, Ke N, Matsuyama S, Hammock B, Godzik A, Reed JC (2000) Drosophila pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms. *J Biol Chem* 275: 27303-27306

## 謝辞

本研究は理化学研究所生命機能科学研究センター神戸キャンパス、Yoo 生理遺伝学研究室において行いました。終始熱心なご指導頂いた Sa Kan Yoo 先生には心より感謝申し上げます。また研究室の皆様にも研究面でご指導、生活面ではご支援頂き、大変お世話になり、誠にありがとうございました。

そして、同センターの染色体分配研究チームの北島 智也教授は学生として受け入れて頂きありがとうございました。北島先生、並びに染色体分配研究チームの方々には日々お心遣い頂き、お陰様で京都大学での生活を無事送ることができました。心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、本研究に携わっていただいたすべての方々に心より感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yuko Ikegawa, Christophe Combet, Mathieu Groussin, Vincent Navratil, Sabrina Safar-Remali, Takuya Shiota, Abdel Aouacheria and Sa Kan Yoo

Evidence for existence of an apoptosis-inducing BH3-only protein, *sayonara*, in *Drosophila*

The EMBO journal, in press, 2023

キイロシヨウジヨウバエ (*Drosophila melanogaster*)

における BH3-only protein、*sayonara* の発見

池川 優子