

博士論文

ショウジョウバエ視葉発生中の細胞死に働く
実行カスパーゼの同定と機能の研究

The functional analysis of effector caspases in the cell death in the
developing *Drosophila* optic lobe

連合農学研究科 生物制御科学大講座

生物生産科学専攻

赤川 裕美

目 次

	頁
はじめに	1
第 1 章 ショウジョウバエ視葉細胞死における実行カスパーゼの役割.....	6
1. 背景と目的	6
2. 材料と方法	6
2-1. 遺伝子の強制発現方法	6
2-1-1. GAL4-UAS システムの概要	6
2-1-2. 実験に用いた系統と実験用個体の作製	6
2-2 死細胞の検出、計数、分布の解析	10
3. 結果	13
3-1. 神経特異的、グリア細胞特異的に、細胞死を阻害した時の全死細胞数の変化...	13
3-2. 野生型に見られる死細胞の種類	13
4. 考察	14
第 2 章 細胞死における実行カスパーゼの機能解析	18
1. 背景と目的	18
2. 材料と方法	18
2-1. <i>drICE</i> 変異体と <i>dcp-1</i> 変異体の説明	18
2-1-1. <i>drICE</i> ^{Δ1} 変異体の説明	18
2-1-2. <i>dcp-1</i> 変異体の説明	18
2-1-3. <i>drICE</i> ¹⁷ 変異体の説明	19
2-2. 実験用系統の作製	22
2-2-1. 二重変異系統 <i>dcp-1</i> ^{prev1} / <i>dcp-1</i> ^{prev1} ; <i>drICE</i> ^{Δ1} /TM3-Ser-GFP の作製	22
2-2-2. 二重変異系統 <i>dcp-1</i> ^{prev1} / <i>dcp-1</i> ^{prev1} ; <i>drICE</i> ¹⁷ /TM3-Ser-GFP の作製	22
2-2-3. <i>elav</i> -GAL4; <i>drICE</i> ^{Δ1} /TM3-Ser-GFP の作製	22
2-2-4. <i>drICE</i> ^{Δ1} <i>repo</i> -GAL4/ TM3-Ser- GFP or TM6-Tb-Hu の作製.....	23
2-2-5. UAS- <i>p35</i> ; <i>drICE</i> ^{Δ1} の作製	23
2-2-6. <i>elav</i> -GAL4; <i>dcp-1</i> ^{prev1} の作製	23
2-2-7. <i>dcp-1</i> ^{prev1} ; TM3-Ser-GFP/ <i>repo</i> -GAL4 の作製	24
2-2-8. <i>dcp-1</i> ^{prev1} ; UAS- <i>p35</i> の作製	24
2-3. 実験用個体の作製	24
2-3-1. <i>drICE</i> ^{Δ1} と <i>dcp-1</i> ^{prev1} のホモ及びヘテロの実験用個体作製の掛け合わせ ...	24
2-3-2. <i>drICE</i> ¹⁷ 変異体と <i>dcp-1</i> ^{prev1} のホモの実験用個体作製の掛け合わせ	25
2-3-3. <i>drICE</i> ^{Δ1} 変異体と <i>dcp-1</i> ^{prev1} 変異体における <i>p35</i> 強制発現実験用個体の作製	25
3. 結果	36
3-1. 変異体における視葉全体の死細胞数の変化	36

3-1-1. <i>drICE</i> ^{Δ1} 変異体、 <i>dcp-1</i> ^{prev1} 変異体、二重変異体における死細胞数の変化…	36
3-1-2. <i>drICE</i> ¹⁷ 変異体、 <i>dcp-1</i> ^{prev1} ; <i>drICE</i> ¹⁷ 変異体における死細胞数の変化……	37
3-2. 実行カスパーゼ変異体の死細胞クラスターの解析 ……………	41
3-2-1. <i>drICE</i> ^{Δ1} 変異体の死細胞クラスターの解析 ……………	41
3-2-2. <i>dcp-1</i> ^{prev1} 変異体の死細胞クラスターの解析 ……………	42
3-2-3. <i>dcp-1</i> ^{prev1} ; <i>drICE</i> ^{Δ1} 変異体の死細胞クラスターの解析 ……………	42
3-2-4. <i>drICE</i> ¹⁷ 変異体、 <i>dcp-1</i> ^{prev1} ; <i>drICE</i> ¹⁷ 変異体の死細胞クラスターの解析……	42
3-3. 変異体における死細胞クラスターを構成する死細胞の種類の同定 ……………	51
3-3-1. <i>drICE</i> ^{Δ1} 変異体の死細胞クラスターに見られる死細胞の種類 ……………	51
3-3-2. <i>dcp-1</i> ^{prev1} 変異体の死細胞クラスターに見られる死細胞の種類 ……………	52
4. 考察 ……………	53
 第3章 死細胞除去における実行カスパーゼの機能解析 ……………	57
1. 背景と目的 ……………	57
2. 材料と方法 ……………	57
2-1. ライソトラッカー染色および抗体染色 ……………	57
2-2. 実験用個体の作製 ……………	58
2-3. qPCR を用いた <i>drICE</i> mRNA 量の測定 ……………	58
3. 結果 ……………	60
3-1. 野生型における死細胞除去活性 ……………	60
3-2. <i>drICE</i> における死細胞除去活性 ……………	60
3-2-1. <i>drICE</i> ^{Δ1} 変異体における死細胞除去活性 ……………	60
3-2-2. <i>drICE</i> ノックダウンによる死細胞除去の解析 ……………	61
3-3. <i>dcp-1</i> ^{prev1} 変異体における死細胞除去活性 ……………	61
3-4. <i>drICE</i> ¹⁷ 変異体における死細胞除去活性 ……………	61
4. 考察 ……………	62
 総合考察 ……………	68
謝辞 ……………	74
引用文献 ……………	75

はじめに

発生中の中枢神経系では、初期に過剰なニューロンが作られ、その後過剰なニューロンが細胞死により除去され、生存したニューロンが成熟した神経回路を形成する(図1(A))。この細胞死の機構を明らかにすることは、神経発生を理解する上で重要な課題である。ショウジョウバエの視覚中枢である視葉は、発生中に多数の細胞死が起こる(Togane *et al.*, 2012; Hofbauer and Campos-Ortega, 1990; Fischbach and Technau, 1984)。本研究では、この細胞死における実行カスパーゼの役割について解析を行った。

視葉はラミナ、メダラ、ロビュラ、ロビュラプレートの中の神経網塊とそれらを取り囲む皮質から成り、網膜光受容体からの情報を処理し中脳に伝達する役割を担う(図1(B)、(C))。変態中、視葉細胞は視葉原基に存在する二種の細胞増殖領域、outer optic anlage (OOA)とinner optic anlage (IOA)から産生され分化する(Meinertzhagen and Hanson, 1993; Fischbach and Hiesinger, 2008)。ラミナニューロンは光受容体軸索からのシグナルを受けたOOAの側方部の前駆細胞から分化する(Selleck and Steller, 1991; Selleck *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1998; Huang and Kunes, 1998, 1996; Umetsu *et al.*, 2006)。メダラニューロンは複数のシグナル伝達系の調節を受けて、OOAの脳側に生じるニューロブラストから分化する(Yasugi *et al.*, 2008, 2010; Egger *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a, 2011b, Hasegawa *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2013)。T2/T3/CニューロンとロビュラプレートニューロンはIOAに由来するが、詳細な発生過程の記述はない。視葉のグリア細胞は視葉の発生中に生成し、神経回路と神経網塊の境界形成、ニューロンの増殖と生存維持、シナプス機能に重要な役割を果たす(reviewed by Chotard and Salecker, 2007; reviewed by Edwards and Meinertzhagen, 2010)。

視葉細胞死は特異的な時間的空間的パターンで起こる(Togane *et al.*, 2012)。視葉細胞死は変態の開始後に始まり、囲蛹殻形成後24時間(24 hours after puparium formation, 24h APF)のピークを迎えるまで増加し、その後減少して48h APFにはほぼ消失する。死細胞は視葉中でランダムに分布するのではなく、クラスターを成して視葉皮質の特定の領域に一定のパターンを以って分布し、そのパターンは発生に伴って変化する。この細胞死はエクジソン非依存性のものと、それに続くエクジソン依存性のものから成る(Hara *et al.*, 2013)。視葉細胞死はカスパーゼ依存性のアポトーシスであることがわかっているが(Togane *et al.*, 2012)、細胞死の分子機構の詳細はまだ明らかではない。

ショウジョウバエでこれまで明らかにされてきた細胞死カスケードは、細胞死誘導タンパク質 Rpr, Grim, Hid、抑制タンパク質 Diap1、開始カスパーゼ Dronc、開始カスパーゼのアダプターDARK、実行カスパーゼ DrICE より成る(Yoo *et al.*, 2002)(図2)。細胞死シグナルにより細胞死誘導遺伝子である *rpr*, *grim*, *hid* が発現すると、それらは Diap1 の働きを抑制する。Diap1 は通常では開始カスパーゼおよび実行カスパーゼに直接結合して、その活性化を阻害している(Kaiser and Miller *et al.*, 1998; Hawkins and Hay *et al.*, 1999; Goyal. *et al.*, 2000, Zachariou and Meier *et al.*, 2003)。Diap1 による抑制が解除されると、Dark を介して多量体化した Dronc の自己活性化(Meier and Evan *et al.*, 2000)、そして Dronc による drICE の活性化が起こり、細胞死が実行される(Hawkins and Hey *et al.*, 2000)。

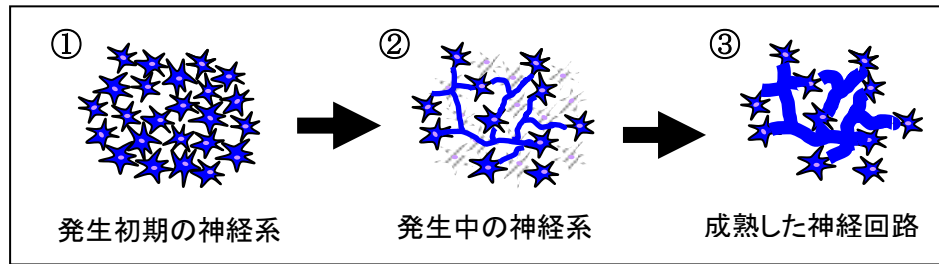
カスパーゼはN末端からプロドメイン、P20 大サブユニット、P10 小サブユニットから

成る前駆体として存在し(図3(A))、切断により大小二つずつのサブユニットから成る四量体の活性型プロテアーゼとなる(Wilson P. and. Livingston *et al.*, 1994; Shi, 2002) (図3(B))。カスパーゼはプロドメインの構造と基質特性から開始カスパーゼと実行カスパーゼの二種に分類される(Riedle and Shi 2004) (図3(A))。開始カスパーゼは CARD(caspase recruitment domain)あるいはDED(death effector domain)から成る長いプロドメインを持ち、自己切断によって活性化し、実行カスパーゼの活性化にはたらく(Aravind and Koonin, 2001)。一方、実行カスパーゼは短いプロドメインを持ち、開始カスパーゼによって切断活性化され、DNA 分解酵素を切断活性化したり、他の様々な基質を切断したりすることによってアポトーシスを実行する(Degterev and Yuan *et al.*, 2003; Fuentes and Salvesen 2004)。

ショウジョウバエのカスパーゼは、ゲノム配列の解析から7個存在し、その内、プロドメインの形状から4個(*drICE*(Fraser and Evan, 1997)、*dcp1*(Song and Steller *et al.*, 1997)、*decay*(Dorstyn and Kumar, 1999)、*damm*(Harvey and Read *et al.*, 2001))が実行カスパーゼの候補で、3個(*dronc* (Meier and Evan *et al.*, 2000)、*dredd*(Leulier and maitre. *et al.*, 2000)、*strica*(Doumanis and Kumar *et al.*, 2001))が開始カスパーゼの候補と考えられている(図3(A))。これまでの研究では、4つの候補の内、*drICE* と *dcp-1* がアポトーシスの実行カスパーゼとしてはたらくことが明らかになっている(Xu and Bergmann *et al.*, 2006)。カスパーゼはシステイン残基を活性基とするシステインプロテアーゼで、標的タンパク質をそのアスパラギン酸残基のC末側で切断する酵素である(図3(C))。各カスパーゼは各々4個のアミノ酸配列に基質特異性を持ち、4個の内、両側の2個のアスパラギン酸がカスパーゼに共通性が高いことが知られている。*drICE* と *dcp-1* は両方とも ASP-GLU-VAL-ASPの配列に高い基質特異性を持っている。しかし、*drICE* と *dcp-1* の視葉細胞死における役割は不明である。

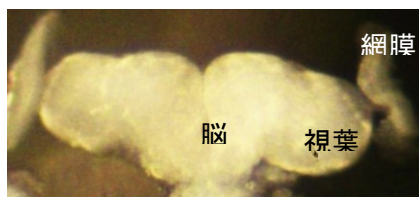
そこで本研究では*drICE*と*dcp-1*の視葉細胞死と死細胞除去における役割を変異体を用いて解析した。その結果、視葉細胞死においては、*drICE*と*dcp-1*は重要な実行カスパーゼであるが、実行カスパーゼの厳密な必要性は状況依存的であり、神経の死細胞クラスターや片方のカスパーゼの活性によって変化した。グリアにおける実行カスパーゼの細胞死の必要性は一部の死細胞クラスターでは、神経細胞とは異なった。具体的には、視葉細胞死にはカスパーゼの必要性から3種が存在し、死細胞クラスターにより異なる実行カスパーゼの必要性を示すことを明らかにした。多くの死細胞クラスターでは、*drICE*と*dcp-1*のいずれかを必要とし、二つが機能重複的に働いた。少数の死細胞クラスターでは、*drICE*を必要とした。この細胞死は正常な*drICE*があれば*dcp-1*を必要としないが、弱まった*drICE*活性の下では*dcp-1*も必要とした。ごく少数の細胞死では、*drICE*と*dcp-1*のいずれも必要としない。さらに、各変異体におけるリソゾーム活性を調べ、*drICE*と*dcp-1*の死細胞除去活性化機能を解析した結果、細胞死実行の重要性だけでなく、本研究によって初めて死細胞除去活性化における*drICE*と*dcp-1*の重要性が示された。野生型の*drICE*は、*drICE*が細胞死を実行した全ての死細胞に対して、それらの除去過程を活性化することができた。しかし、*dcp-1*や*drICE*の機能喪失型変異*drICE*¹⁷は、細胞死を実行しても除去できない細胞が一部存在した。これらの結果から、*drICE*と*dcp-1*の持つ細胞死実行機能と死細胞除去活性化機能は別々に調節され、死細胞の除去には細胞死の実行よりさらに強い実行カスパーゼの働きが必要であると考えられる。

(A)



戸金 悠 博士論文(2012)より転記

(B)



戸金 悠 博士論文(2012)より転記

(C)

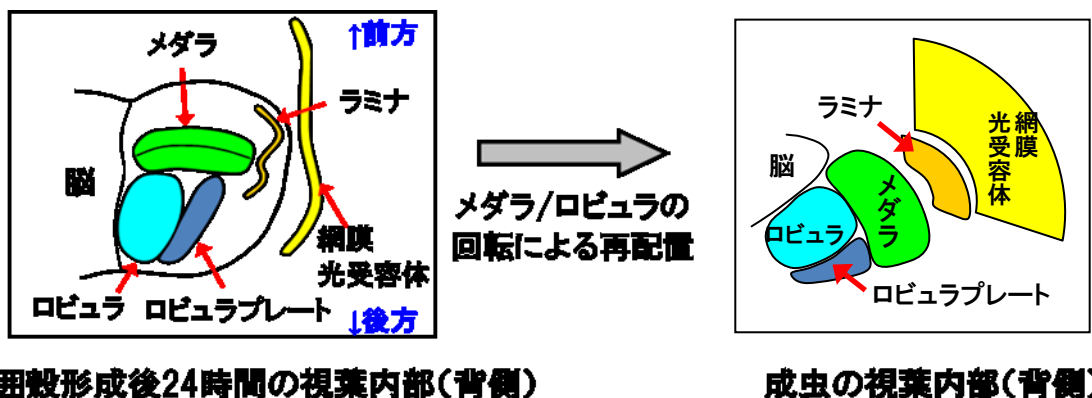


図1 ショウジョウバエにおける発生細胞死

(A) 神経発生における発生細胞死

多くの動物において、発生中の神経系では成体より多くのニューロンが作り出される。過剰なニューロンはシナプスを形成する過程でプログラムされた細胞死によって減する。この細胞死は自然発生細胞死と呼ばれる。余分な神経細胞や不適切に結合した回路がアポトーシスにより除去され、神経系ネットワークが洗練される

(B) ショウジョウバエの視葉

視葉は脳の両側に位置し、網膜の光受容体細胞からの情報を処理し脳に伝達する。

(C) ショウジョウバエの視葉の構造

視葉内は網膜側から脳に向って、ラミナ、メダラ、ロビュラの順に並んだ神経網塊で構成され、網膜光受容体からの神経軸索はラミナとメダラを支配する。成虫の視葉は変態中に視葉原基に存在する二つの増殖領域における細胞増殖と引き続く細胞分化と形態形成によって発生する。

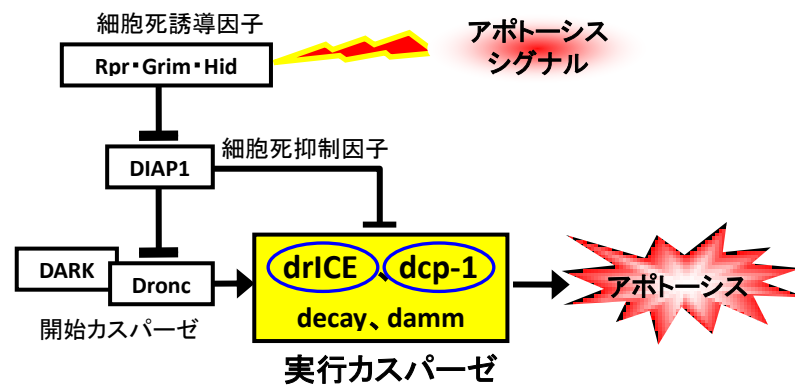


図2 ショウジョウバエの既知のアポトーシス経路

ショウジョウバエでこれまで解析されてきた細胞死カスケード。細胞死シグナルにより細胞死誘導因子である Rpr、Grim、Hid が発現すると、それらは抑制タンパク質 Diap1 の働きを抑制する。Diap1 は通常ではカスパーゼに直接結合して、その活性化を阻害している。Diap1 による抑制が解除されると開始カスパーゼ Dronc の自己活性化、そして Dronc による実行カスパーゼ drICE の活性化が起こり、細胞死が実行される。

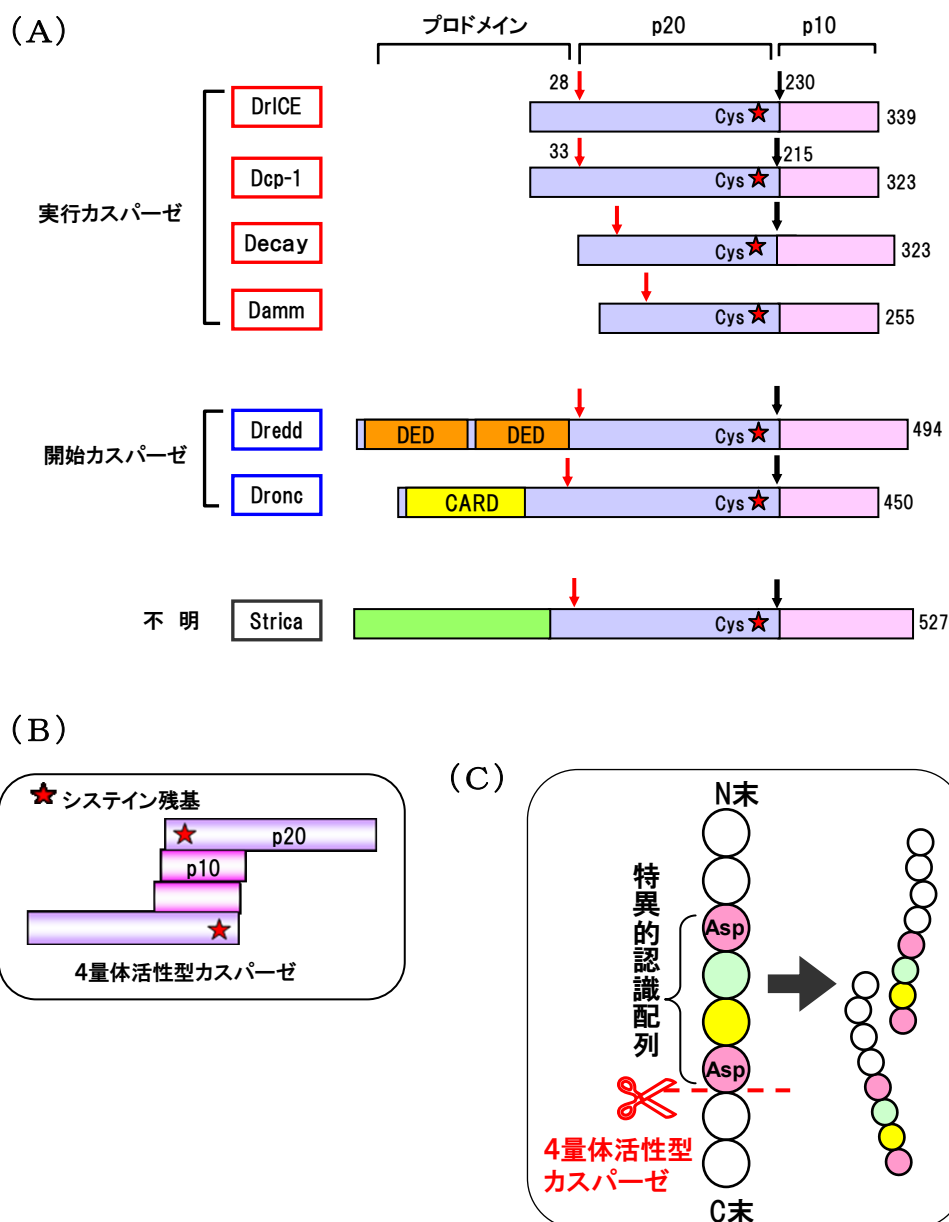


図3 ショウジョウバエのカスパーゼ

(A) ショウジョウバエの開始カスパーゼと実行カスパーゼの構造

開始カスパーゼは Caspase Recruitment Domain (CARD) か Death Effector Domain (DED) を含む長いプロドメインを持ち、実行カスパーゼは短いプロドメインを持つ。N末側は赤い矢印で切り取られる。黒い矢印で p10 小サブユニットと p20 大サブユニットに分裂する (Riedle and Shi, 2004)。

(B) 活性型実行カスパーゼの構造

カスパーゼは P20 と P10 のサブユニットが会合して 4 量体の活性型カスパーゼとなる。

(C) 実行カスパーゼの作用機序

カスパーゼはシステイン残基を活性基とするシステインプロテアーゼで、標的タンパク質をそのアスパラギン酸残基の C 末側で切断する酵素である。各カスパーゼは各々 4 個のアミノ酸配列に基質特異性を持ち、四個の内、両側の二個のアスパラギン酸がカスパーゼに共通性が高いことが知られている。drICE と dcp-1 は両方とも ASP-GLU-VAL-ASP の配列に高い基質特異性を持っている。

第1章 ショウジョウバエ視葉細胞死における実行カスパーゼの役割

1. 背景と目的

視葉細胞死における実行カスパーゼの役割と死細胞の種類を調べるため、GAL4/UAS 系 (Brand and Perrimon, 1993) を用いて、神経細胞あるいはグリア細胞で細胞死を阻害し、視葉全体の死細胞数と各死細胞クラスターでの細胞死の変化を解析した。既に先行研究により、神経細胞の細胞死を阻害すると、死細胞数は大幅に減少することから死細胞の多くが神経細胞であると報告されている (Togane *et al.*, 2012)。また、グリア細胞特異的に細胞死を阻害すると、一部の死細胞クラスターが消失することから、一部の死細胞クラスターではグリア細胞も細胞死を起こすことが報告されている (Togane *et al.*, 2012; Hara *et al.*, 2013)。しかし、これらの報告は一部の発生段階や死細胞クラスターについての結果に基づいたものである。そこで、本研究では視葉細胞死に実行カスパーゼが関与するか否かを調べるとともに、死細胞の種類を明らかにするため、0h APF から 72h APF までの全ての段階で全ての死細胞クラスターについてより詳細に解析した。

2. 材料と方法

2-1. 遺伝子の強制発現方法

2-1-1. GAL4-UAS システムの概要

本研究では細胞死に対するカスパーゼの役割と死細胞の種類を決めるために、遺伝子の組織特異的強制発現を行った。遺伝子の強制発現系として GAL4/UAS 系 (Brand and Perrimon, 1993) を用いた (図4(A))。GAL4 は酵母由来の転写因子で、同じく酵母由来のエンハンサー配列 UAS (Upstream Activation Sequence) を認識し、UAS の下流の遺伝子発現を誘導する。GAL4 遺伝子および UAS 配列は本来ショウジョウバエには存在せず、GAL4 遺伝子のみ、もしくは UAS 配列のみを持ったハエではこれらは機能しない。GAL4/UAS 系では、特定の領域で GAL4 転写因子を発現する GAL4 システムのハエと、UAS エンハンサーと目的の遺伝子を結合させた UAS システムのハエを掛け合わせるにより、得られた F1 世代において、特定の領域で目的の遺伝子を強制発現させ、その効果を観察することができる。

2-1-2. 実験に用いた系統と実験用個体の作製

野生型のショウジョウバエとして Canton-S を用いた。神経細胞特異的 GAL4 として、C155 *elav*-GAL4 (Lin & Goodman 1994) を、グリア細胞特異的 GAL4 として M1B *repo*-GAL4 (Sepp *et al.*, 2001) を用いた。Togane *et al.* (2012) と Hara *et al.* (2013) にあるように、*elav*-GAL4 は 0~48h APF において全ての神経細胞で発現する。また、0h、12h APF では OOA と IOA にあるほぼ全てのニューロblast及び分裂後ラミナ前駆細胞などの神経前駆細胞においても弱く発現する。また、*elav*-GAL4 はメダラ神経網を囲む *neuropil glia* の遠位で 0h~36h APF に発現するが、その他のグリア細胞では発現しない。一方 *repo*-GAL4

はメダラ神経網前方表層に存在する一部の **neuropil glia** とメダラ皮質に存在する一部の小さな **cortex glia** を除く視葉の全てのグリア細胞で 0h~36h APF に発現するが、グリア細胞以外の細胞種では発現しない。

UAS 系統として UAS-**p35** を用いた。**p35** はバキュロウィルス由来の細胞死抑制因子で、実行カスパーゼの活性部位に結合してその活性を阻害し、ショウジョウバエではこれまでに **drICE**、**dcp-1**、**decay** の活性を阻害することが知られている。例えば、ウィルス感染によりアポトーシス細胞死誘導したショウジョウバエの細胞や、X 線により細胞死誘導したショウジョウバエの胚や発生中の眼で、UAS-**p35** を用いて **p35** を強制発現すると細胞死が抑制される (Hay *et al.*, 1994)。また、P35 タンパク質は実行カスパーゼ外部の活性化域に強固に結合することが、結晶構造解析により明らかになっている (Xu *et al.*, 2001)。さらに、P35 はアポトーシス誘導した細胞で、Dcp-1 (Song *et al.*, 2004) と DrICE (Lannan *et al.*, 2007) に結合し、細胞死を抑制することが明らかになっている。

上記 GAL4 系統と UAS 系統を交配後、F1 世代から目的のハエを、GFP 発現をマーカーとして選択し、**elav-GAL4/+ or Y**; UAS-**p35**. BH1/+、M1B **repo-GAL4/** UAS-**p35** BH1 を実験に用いた (図 4 (B))。また、目的遺伝子を強制発現させたハエの表記は、例えば、**elav-gal4/+**; UAS-**p35/+** は、**elav-GAL4>UAS-p35** のように略記した。

elav-GAL4>UAS-p35 で野生型と比較して死細胞数が減少した場合、死細胞集団には神経細胞が含まれるとした。また、**repo-GAL4>UAS-p35** で野生型と比較して死細胞数が減少した場合、死細胞集団にはグリア細胞が含まれるとした。**elav-GAL4>UAS-p35** と **repo-GAL4>UAS-p35** の両方で野生型と比較して死細胞数が減少した場合、死細胞集団には神経細胞とグリア細胞の両方が含まれるとした。**elav-GAL4>UAS-p35** で野生型と比較して死細胞数が減少したが、著しい数の死細胞が残存し、**repo-GAL4>UAS-p35** では減少しなかった場合、死細胞集団には神経細胞と他の細胞の両方が含まれるとした。**elav-GAL4>UAS-p35** と **repo-GAL4>UAS-p35** の両方で野生型と比較して死細胞数の減少が見られなかった場合、死細胞集団には他の細胞が含まれるとした。

また、野生型の死細胞クラスターにおいて確かに神経あるいはグリア細胞の死細胞が存在することを直接的に示すため、UAS-Apoliner (Bardet *et al.*, 2008) を用いて神経特異的あるいはグリア細特異的にカスパーゼ活性を検出した (図 5)。Apoliner (Bloomington stock center) は mRFP (単量体赤色蛍光蛋白質) と eGFP (高感度緑色蛍光タンパク) とを結合した融合たんぱく質で、それらの結合領域はカスパーゼによって切断される。活性型カスパーゼによって切断されると eGFP は核に移行し、mRFP は膜上に残る。その後、eGFP は核の退化によってすぐに消失し、赤い mRFP シグナルによって死細胞を検出することができる。神経細胞の細胞死は **elav-GAL4/+ or Y**; UAS-Apoliner/ + で検出した。グリア細胞の細胞死は UAS-Apoliner/ +; M1B **repo-GAL4/** + で検出した。

また、全てのハエは、一般的なコーミール/イースト培地、25℃、明暗 12 時間ずつの条件で飼育した。

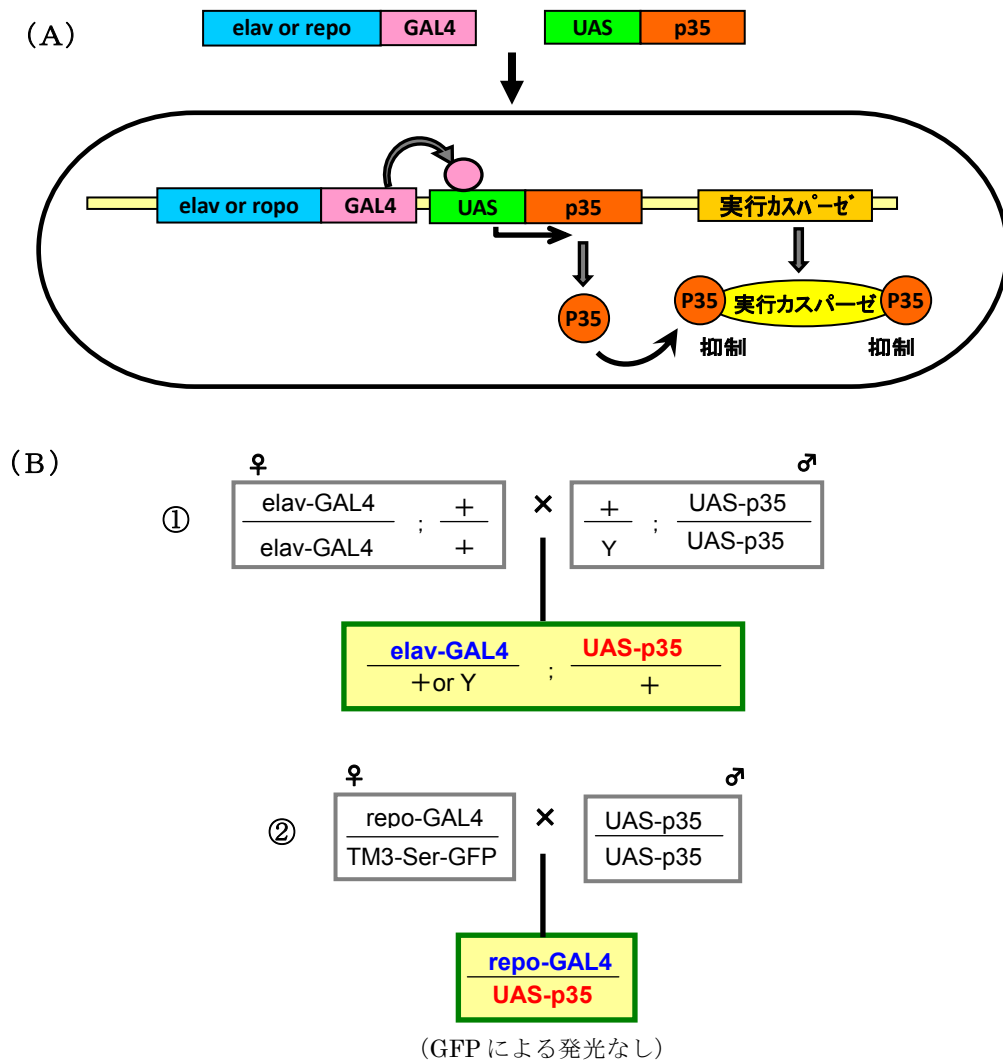


図4 GAL4-UAS システムを用いた細胞特異的な実行カスパーゼ抑制

(A) 神経、グリア細胞特異的な実行カスパーゼ阻害のしくみ

GAL4/UAS 系(Brand and Perrimon 1993)を用いて、神経細胞あるいはグリア細胞で細胞死を阻害した。GAL4 はエンハンサー配列の UAS だけを認識して結合する転写因子である。任意のプロモーター領域下に GAL4 を結合した系統と、UAS 下に任意の遺伝子を結合した系統を交配することで、任意の領域で任意の遺伝子を発現させる事ができる。神経細胞特異的 GAL4 系統として C155 *elav*-GAL4 (Lin & Goodman 1994)を、グリア細胞特異的 GAL4 として *M1B repo*-GAL4 (Sepp *et al.*,2001)を用いた。UAS 系統として UAS-*P35* を用いた。*P35* はバキュロウィルス由来の細胞死抑制因子で、実行カスパーゼの活性部位に結合してその活性を阻害する。

(B) 神経、グリア細胞特異的に実行カスパーゼを阻害する実験用個体の作成

野生型カスパーゼバックグラウンドにおける GAL4-UAS システムを利用した実行カスパーゼの阻害の掛け合わせ。下記の遺伝子型個体について、青色励起光照射下で GFP マーカーを持たない蛹を選択して得た。

- ① *elav*-GAL4/ *elav*-GAL4; +/+ 雌と +/Y; UAS-*p35*/ UAS-*p35* 雄を交配し、*elav*-GAL4/ + or Y; UAS-*p35*/ + を作成した。
- ② *repo*-GAL4/ TM3-Ser-GFP と UAS-*p35* を交配し、*repo*-GAL4/ UAS-*p35* を作成した。

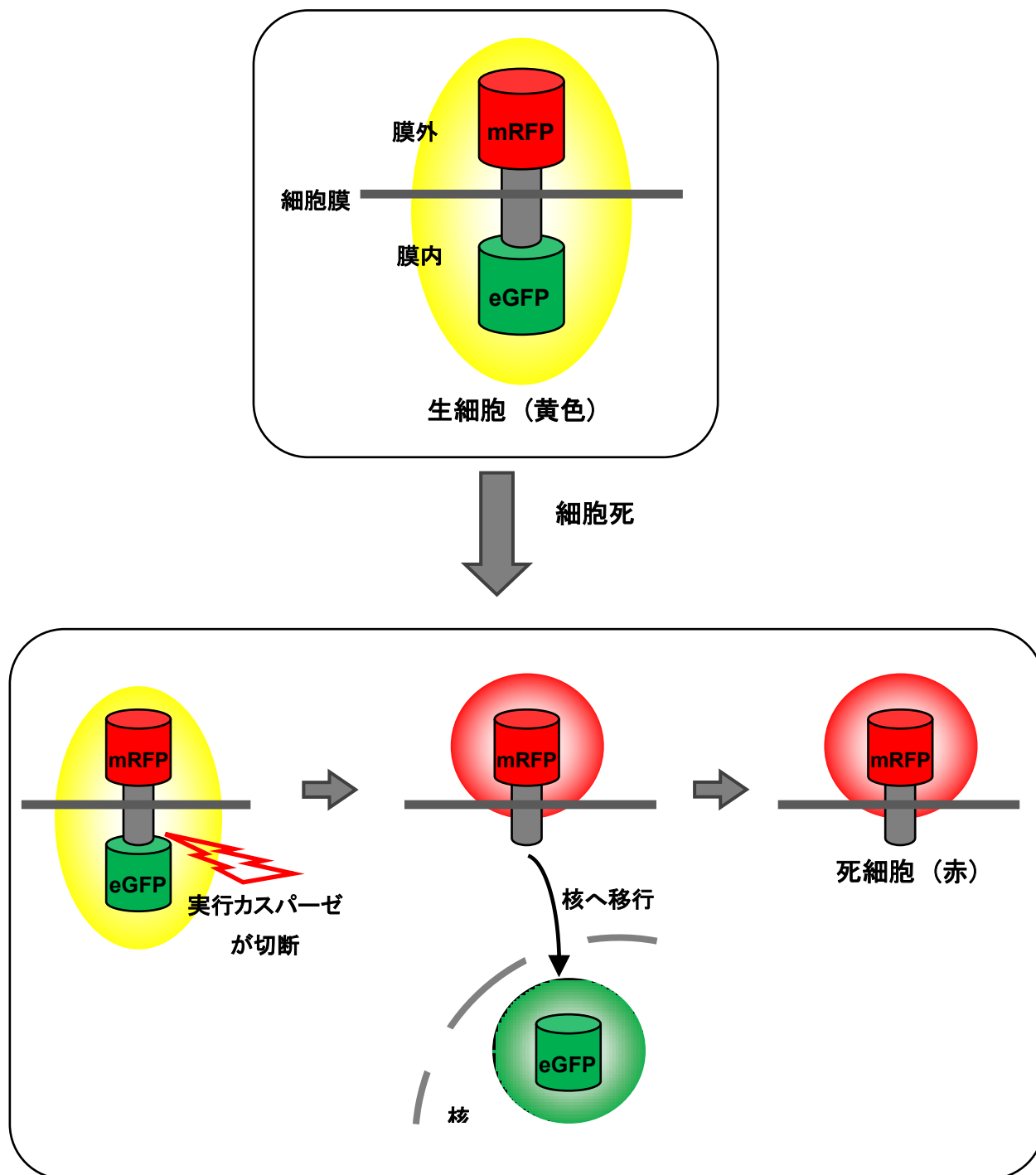


図5 Apoliner による死細胞検出のしくみ

Apoliner は mRFP と eGFP をカスパーゼによって切断される領域で結合した融合たんぱく質で、活性型カスパーゼによって切断されると eGFP(緑色) は核に移行し、mRFP (赤色) は膜上に残る。その後、eGFP は核の退化により消失するので、赤い mRFP シグナルによって死細胞を検出することができる。

2-2 死細胞の検出、計数、分布の解析

死細胞の検出は、アポトーシスの過程で起こる DNA の断片化を検出するための最も信頼できる方法である TUNEL 法 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) を用いた (図6(A))。具体的な方法は最新アポトーシス実験法で Kimura (1995) が述べている方法を改変して行なった。PBS (Phosphate-buffered saline) 中で解剖し、CNS (central nervous system) を取り出して 4%ホルムアルデヒドで 20 分間固定後、PBS-Tx (0.3% Triton-X 100 in PBS (v/v)) で洗浄した。続いてメタノールに置換し、 -20°C で一晩以上保存した。メタノール中 -20°C で一晩以上保存した CNS を PBS-Tx で洗浄後、プロテアーゼ K (和光純薬, 大阪, 日本) で 10 分間処理し、4%ホルムアルデヒドで 10 分間固定した。さらに PBS-Tx で洗浄し、 $1\times$ TdT バッファー+0.1%Triton-X-100 で前処理後、TdT 反応 (Takara TDT enzyme, Takara Biomedicals, 大津, 日本) を 37°C で一晩行ない、断片化した DNA 末端を Biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) でラベルした。PBS-Tx で洗浄後、ABC 反応 (Vector Laboratories, Inc., California, USA) を行ない、PBS-Tx で洗浄後、茶色 DAB 反応を行ない発色した。死細胞が茶色く染色されてきたら DAB 液を捨て、蒸留水で洗い、アルコールで脱水後、安息香酸メチルで透徹し、カナダバルサム：安息香酸メチル 3:1 (V/V) 中に包埋して永久プレパラートを作製した。死細胞数を計数するための標本は、視葉前方を上部に置いて包埋した。前方からは死細胞の集積が少ないため計数が容易である。また、死細胞の分布を解析するための標本は、背側を上部に置いて包埋した。背側からはラミナ、メダラ、ロビュラ、ロビュラプレート、T/C 領域の各ニューロパイルが明瞭に観察される上、死細胞クラスター毎に死細胞が集積しているため死細胞クラスターの同定と分布状況の解析が容易である。

TUNEL 染色後の視葉を光学顕微鏡 (Optiphot, Nikon, Tokyo) で 40 倍の対物レンズを用いてデジタルカメラ (TS-CA series, Sugitoh Co., Ltd., Tokyo) で撮影して観察した (図6(B))。死細胞の計数には、視葉を前方から観察した像を用いた。標本の 1000 倍の画像をモニター上に得、モニター上に張った透明プラスチックフィルム上に、顕微鏡の焦点をずらしながら視葉全域に存在する直径 $0.7\mu\text{m}$ 以上の死細胞シグナルを油性ペンでプロットして写し取った。このプロット図をスキャナーでパソコンに取り込み、死細胞数を解析した。死細胞の計数には画像ソフト Image-J (National Institutes of Health) のパーティクルカウンターを用いた。

死細胞の分布は光学顕微鏡 (BX50, Olympus, Tokyo) を用いて背側から視葉を観察し、デジタルカメラ (DP72, Olympus, Tokyo) と Metamorph software (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale) を用いて得られた $1\mu\text{m}$ 間隔の連続切片画像を解析して行った。死細胞クラスターの同定は戸金ら (2012) および、原ら (2013) に基づいて行った (表1、図6(C))。

統計検定は Mann Whitney の U 検定を用いた。

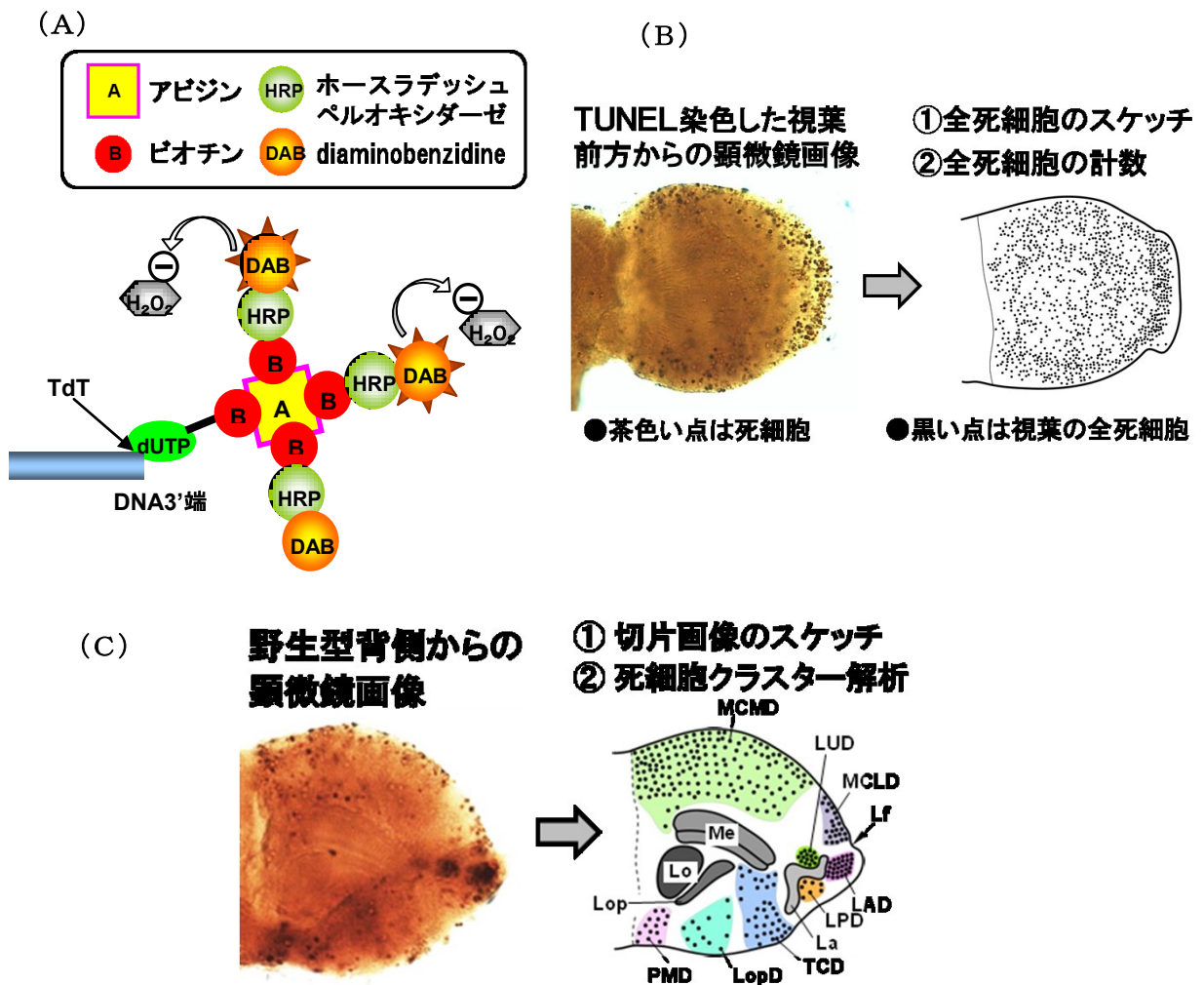


図6 アポトーシスを起こした細胞の TUNEL 染色での可視化と計数

(A) TUNEL 染色のしくみ

TUNEL 染色 (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling) は切断した DNA を可視化する方法である。切断した DNA の 3' 端の水酸基に TdT (terminal deoxynucleotidyltransferase) でビオチン化 dUTP を結合させ、そこにアビジン 4 量体の一箇所を結合させ、さらにアビジンの残りの三箇所にビオチン標識した HRP (ホースラデッシュペルオキシダーゼ) を結合させる。HRP の基質である DAB (diaminobenzidine) を結合させると、HRP は H_2O_2 を電子受容体として DAB を酸化し茶褐色の副産物を生成する。

(B) 死細胞の計数法

TUNEL 染色した視葉。濃い褐色の点がアポトーシスを起こした細胞である。染色後、前後軸方向に封埋した視葉を光学顕微鏡で 400 倍に拡大し、その画像をビデオカメラで写して 1000 倍にし、さらに画像表示ソフト SUGITHO TS-CA SERIES を用いてデジタル化し、ディスプレイに映し出した。ディスプレイ上に貼った OHP フィルム上に全ての死細胞をプロットし、イメージ J のパーティクルカウンター機能を用いて計数した。前方からは死細胞の集積が無く、計数しやすい。

(C) 死細胞クラスターの解析法

背側からはニューロパイル構造と死細胞クラスターがはっきりと識別できることから、TUNEL 染色後、背腹軸方向に包埋し、背側からの死細胞クラスターを観察した。

表 1 死細胞クラスターの名称

領域名	死細胞クラスター名	死細胞クラスターの説明
ラミナ	LAD	ラミナ前方死細胞
	LPD	ラミナ後方死細胞
ラミナ-メダラ 境界域	MALD	メダラ前方側方死細胞
	LUD	ラミナ基底死細胞
	LMBD	ラミナ-メダラ境界死細胞
前方皮質	MCLD	メダラ皮質側方死細胞
	MCD	メダラ皮質死細胞
	MAMD	メダラ内部前方死細胞
	MCMD	メダラ皮質内部死細胞
後方皮質	MPLD	メダラ後方側方死細胞
	TCD	T2/T3/C 神経死細胞
	PMCD	後方メダラ皮質死細胞
	LopD	ロビュラプレート死細胞
	PMD	後方内部死細胞

3. 結果

3-1. 神経特異的、グリア細胞特異的に、細胞死を阻害した時の全死細胞数の変化

まず *elav-GAL4 >UAS-p35* では、死細胞数は 0h APF で 319 個と野生型の死細胞数 (546 個) と比較してはるかに少なかった (図7)。その後 12h APF で 170 個、24h APF で 252 個、36h APF で 123 個といずれのステージにおいても野生型 (12h APF 854 個、24h APF 1113 個、36h APF 678 個) より著しく少なかった。その後も増加は見られず、48h APF で 94 個、72h APF で 63 個と、野生型 (48h APF で 119 個、72h APF で 42 個) と同程度であった。*elav-GAL4 >UAS-p35* で多くの死細胞が消失したことから、野生型の視葉で見られる細胞死の殆どが実行カスパーゼによる神経細胞死であることがわかった。

一方、*repo-GAL4 >UAS-p35* では、死細胞数は 0h APF で 603 個と野生型と有意差がなかったが ($p=0.05$)、12h APF で 1002 個、24h APF で 1295 個と急速に増加し野生型より有意に多くなった ($p=0.05$) (図7)。その後急速に減少し、36h APF で 667 個、48h APF で 140 個、72h APF で 71 個と野生型と同程度であった。*repo-GAL4 >UAS-p35* で死細胞は殆ど消失しなかったことから、野生型の視葉で見られる細胞死にはグリア細胞は殆ど含まれないことがわかった。

3-2. 野生型に見られる死細胞の種類

発生中の視葉における細胞死は視葉中にランダムに生じず、クラスターを形成して生じる (Togane et al, 2012)。そこで、死細胞クラスター毎に死細胞の種類を解析した (図8)。野生型における細胞死の存在領域は図30、死細胞種は図33にまとめた。なお同じ発生段階の個体の死細胞分布には殆ど個体差が見られなかったため (*elav-GAL4 >UAS-p35* ; 0h APF $n=10$ 、12h APF $n=8$ 、24APF $n=11$ 、36h APF $n=11$ 、48h APF $n=10$ 、72h APF $n=10$) (*repo-GAL4 >UAS-p35* ; 0h APF $n=8$ 、12h APF $n=11$ 、24APF $n=11$ 、36h APF $n=11$ 、48h APF $n=11$ 、72h APF $n=11$)、以下の記載では例数を個々に述べない。0h APF、12 h APF、24 h APF 以降では *elav-GAL4 >UAS-P35* と *repoGAL4 >UAS-P35* に対する各死細胞クラスターの反応が異なっていたため、以下では 0 h APF、12h APF、24 h APF 以降の三つに分けて記述する。

0h APF (図8 A1-A4) では、*elav-GAL4 >UAS-p35* で死細胞クラスター MCD と MAMD が消失した。また、TCD、PMCD、PMD では減少したが、かなりの数が残った。しかし、*repo-GAL4 >UAS-p35* ではあきらかな減少はなかった。この時期に *elav-GAL4* は分化したニューロンとその前駆細胞で発現することを考慮すると、MCD と MAMD のほぼ全てと TCD、PMCD、PMD の一部が神経細胞またはその前駆細胞であることがわかった。一方、LAD、MALD は *elav-GAL4 >UAS-p35* と *repo GAL4 >UAS-p35* の両方で明らかな減少がみられなかった。しかし、このことは LAD、MALD が神経細胞ではないことを必ずしも意味しない。何故なら、この時期のこれらの死細胞クラスター領域の細胞の大部分は *Elav* を発現しない神経前駆細胞であり (Togane, 2012)、*elav-GAL4* の発現が弱かった (データは示さない) 可能性があるからである。

12h APF (図8 B1-B4) では *elav-GAL4 >UAS-p35* で LAD、MCLD、MCMD が消失した。ま

た、TCD、PMD は減少したが、かなりの数が残り、LPD は消失しなかった。一方 *repo-GAL4 >UAS-p35* では LPD だけが消失し、他の死細胞クラスターでは消失や明らかな減少が見られなかった。これにより LAD、MCLD、MCMD のほぼ全てと TCD、PMD、MALD の一部が神経細胞または神経前駆細胞であり、LPD はグリア細胞であることがわかった。

24～72h APF (図8 C1-F4) では、死細胞クラスターは四種類に分類された。

MAMD、MCLD、MPLD、LAD、TCD、LopD は *elav-GAL4 >UAS-p35* で殆どが消失し、*repo-GAL4 >UAS-p35* では変化がなかった。これにより、これらの死細胞クラスターは殆ど神経細胞で構成されていることがわかった。

一方、MCMD、LMBD、PMD は *elav-GAL4 >UAS-p35* で多くが消失したものの、少数が残存した。また、*repo-GAL4 >UAS-p35* では 36h APF にやや減少した。これにより、これらの死細胞クラスターは多くが神経細胞で構成されるが、グリア細胞も含むことがわかった。

LUD は *repo-GAL4 >UAS-p35* でも大きく減少し、*elav-GAL4 >UAS-p35* でも減少した。したがって、この死細胞クラスターでは多くがグリア細胞で、神経細胞も含むことがわかった。

また、LPD は *repo-GAL4 >UAS-p35* で消失し、*elav-GAL4 >UAS-p35* では変化がなかった。これにより LPD はグリア細胞で構成されていることがわかった。

したがって、蛹期に増加する視葉細胞死の殆どは実行カスパーゼの働きを必要とするアポトーシスで、その時の死細胞は多くが神経細胞で、一部がグリアであることがわかった。

また、*elav-GAL4 >UAS Apoliner* では、カスパー活性を示す赤いシグナルの分布は、24h APF と 48h APF で、TUNEL 陽性死細胞クラスター領域と一致した(図9)。一方、*repo-GAL4 >UAS Apoliner* では、シグナルはごく少数のみだった。これにより、死細胞クラスターの TUNEL 陽性細胞の殆どが神経であり、少数がグリア細胞であるという上記の結果が確認された。

4. 考察

神経細胞で実行カスパーゼを阻害するといずれの発生段階でも 死細胞が激減した。一方グリア細胞で実行カスパーゼを阻害しても死細胞の増減に野生型と有意差がなかった。これにより野生型の視葉で見られる細胞死の殆どが実行カスパーゼによる神経細胞死であることがわかった。

発生初期の死細胞クラスターの多くは、*elav-GAL4 >UAS-p35* でも *repo-GAL4 >UAS-p35* でも減少するが消失はしなかった。したがって、発生初期の死細胞クラスターの多くは神経とグリアで構成されていると言える(図8)。また、発生中期以降の死細胞クラスターの多くは、*elav-GAL4 >UAS-p35* で消失した。一方、*repo-GAL4 >UAS-p35* でも一部のクラターで減少あるいは消失し、これにより、発生中期以降の死細胞クラスターの多くが神経細胞で構成されているが、一部が神経細胞とグリア細胞、あるいはグリア細胞だけで構成されることが考えられる(図8)。

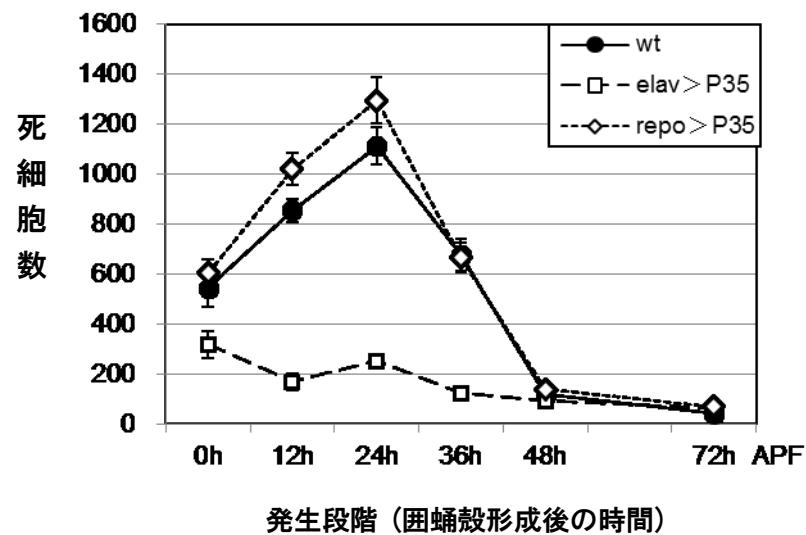


図7 野生型における神経特異的、グリア細胞特異的な実行カスパーゼ阻害時の死細胞数の変化

神経特異的な *elav*-GAL4 駆動、グリア細胞特異的な *repo*-GAL4 駆動により、バキュロウイルスの実行カスパーゼ阻害因子 *p35* を強制発現した時の死細胞数の変化。実線は野生型、破線は *elav*、点線は *repo* を示す。バーは標準偏差。

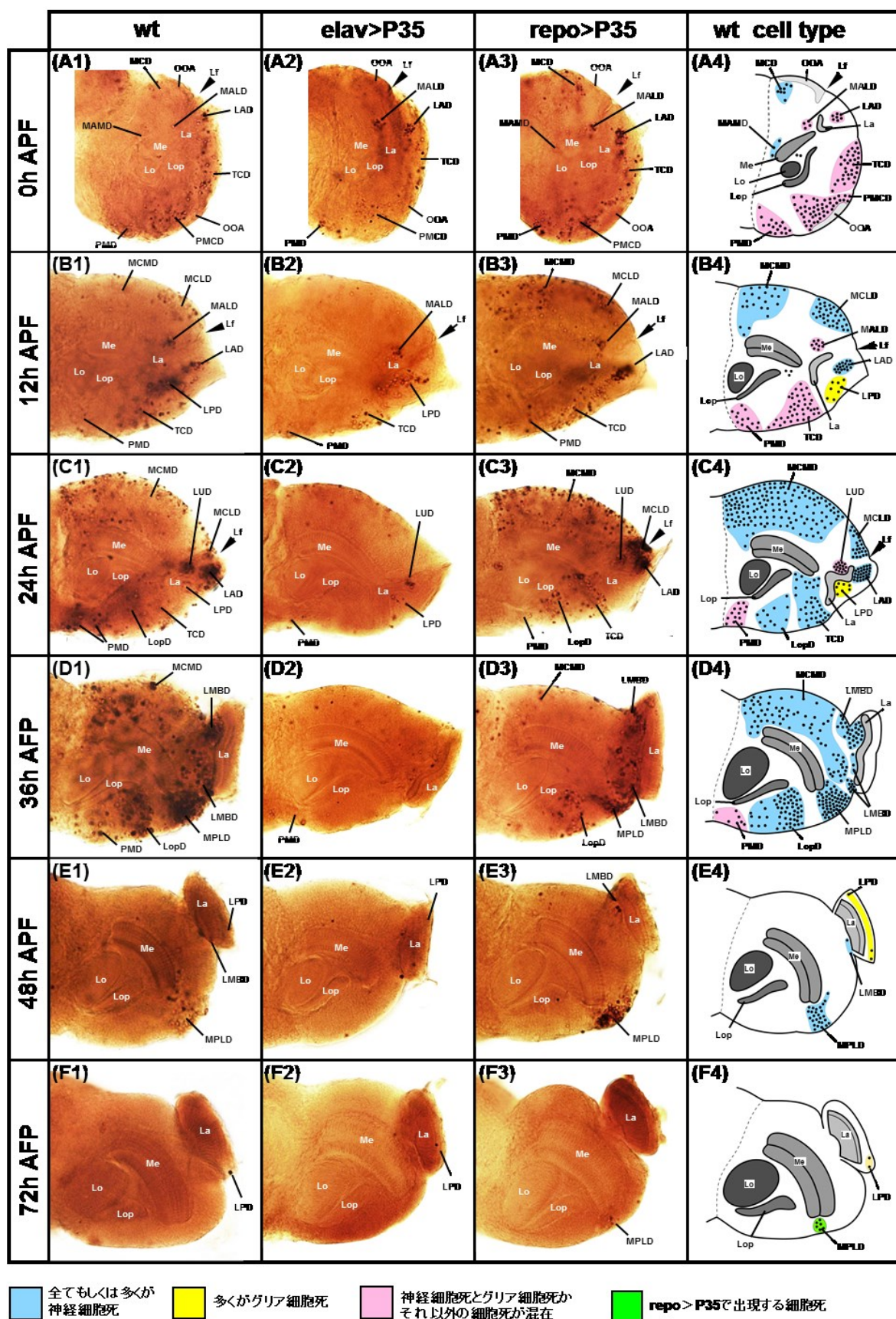


図8 野生型の死細胞クラスターを構成する死細胞の種類

elav-GAL4>UAS-p35 で神経特異的、**repo>UAS-p35** でグリア細胞特異的にアポトーシスを阻害した。

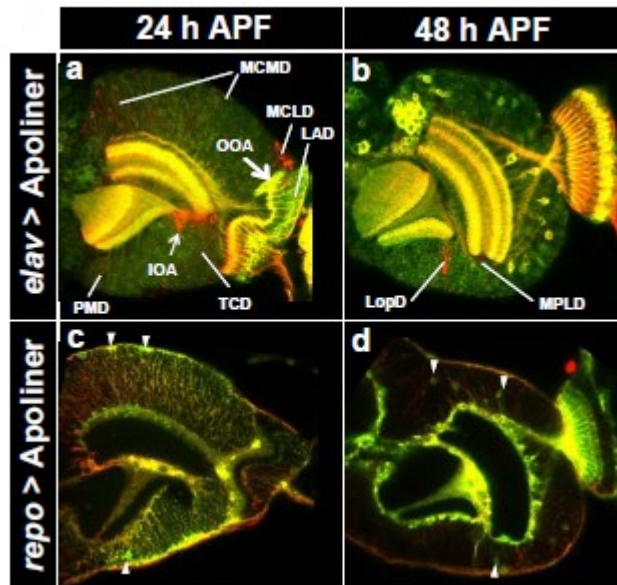


図9 Apoliner を用いた死細胞種の同定

アポライナーを神経細胞あるいはグリア細胞特異的に発現させ、赤いシグナルを検出した。細胞膜は黄色(mRFP and eGFP) (生細胞)か赤(mRFP)(死細胞)でラベルされる。死細胞の核は緑(eGFP)でラベルされる。大きな矢印は OOA の残遺物、小さい矢印は IOA の残遺物である。OOA の先端にある LUD は黄色や赤でラベルされなかった。IOA は TUNEL 染色により予測されるより強く赤でラベルされた。少数の緑のシグナル(やじり)が *repo > Apoliner* の MCMD や他の領域で観察されたことから、これらの領域で野生型 *elav > p35* で見られた TUNEL 陽性細胞はグリアであった。

第2章 細胞死における実行カスパーゼの機能解析

1. 背景と目的

これまでの研究では、発生中の視葉細胞死は殆どが実行カスパーゼによって実行されることが明らかになった。そこで、個々の実行カスパーゼの変異体を用いて視葉細胞死に必要な実行カスパーゼの種類を解析した。ゲノム研究による配列の解析から、ショウジョウバエの実行カスパーゼには *drICE*、*dcp-1*、*decay*、*damm* の4種類が存在することが知られている。これまでの細胞死に関する研究から、*drICE* と *dcp-1* は細胞死に関係することが明らかになっている。例えば、蛹期における過剰個眼間細胞の細胞死や、胚期における一部の過剰正中線グリア細胞の細胞死には *drICE* がはたらく (Muro *et al.*, 2006)。また、X線照射をして人為的に誘導した翅成虫盤の細胞死には、*drICE* がはたらく (Muro *et al.*, 2006)。また、細胞死誘導遺伝子 *hid* の強制発現で誘導した眼成虫原基の細胞死には *drICE* がはたらく (Xu *et al.*, 2006)。一方、発達中の卵巣は栄養飢餓下ではアポトーシスにより退化するが、この時の細胞死には *dcp-1* がはたらく (Peterson *et al.*, 2003)。しかし、発生中の視葉細胞死における *drICE* と *dcp-1* の役割は明らかになっていない。

そこで、本研究では *drICE* と *dcp-1* の視葉細胞死におけるはたらきを解析した。*drICE* の変異体として *drICE^{Δ1}* 変異体と *drICE¹⁷* 変異体を用い、*dcp-1* の変異体として *dcp-1^{prev1}* を用いた。

2. 材料と方法

2-1. *drICE* 変異体と *dcp-1* 変異体の説明

2-1-1. *drICE^{Δ1}* 変異体の説明

drICE^{Δ1} 変異体は *drICE* の欠失変異系統である (Muro *et al.*, 2006)。*drICE^{Δ1}* は、*drICE* の 3'UTR に挿入された P 因子 Ice^{GE284898} が不完全に切り出され、生じたものである (図10(A))。*drICE* のコード領域が全て除去され 5'UTR と 3'UTR が融合し、1.5kb の P 因子断片が 3'UTR に残っている。

drICE^{Δ1} ホモ 3 齢幼虫の成虫までの生存率は約 20% である (Muro *et al.*, 2006)。27% が蛹化後に頭部の外転不全、唾液腺や幼虫筋肉の分解不全、頭部や翅成虫盤、脚成虫盤、腹部の異常増殖等を伴う。*drICE^{Δ1}* ホモの成虫では、触角の軸の肥厚と分岐の増加、オス生殖器の回転不全、翅の不透明化、過剰個眼間細胞の除去不全が見られる。胚では、胚全域でのアポトーシスの減少と余剰正中線グリア細胞の除去不全が見られる。

2-1-2. *dcp-1* 変異体の説明

dcp-1^{prev1} は *dcp-1* の機能喪失変異系統である (Laundrie *et al.*, 2003) (図10(B))。*dcp-1* は第二染色体右腕の多糸染色体地図の 59E3 に位置し、相補配列に *pita* と呼ばれる別の遺伝子がコードされている。*dcp-1^{prev1}* は *dcp-1* と *pita* の両方のコード領域に P 因子が挿入された

系統、P{lacW}Dcp-1^{k05606} にトランスポゼース系統を交配して、不完全な切り出しを誘導することによって作製された。この系統では *dcp-1* のエキソン部に 40bp の P 因子が挿入されており、これによりトリプレットにフレームシフトが起こり、P 因子内部に新しい終止コドンが生じた結果、正常な Dcp-1 タンパク質が生成されない。この系統における *dcp-1* タンパク質の不在はウェスタンブロットで確認されている。一方、*pita* 遺伝子に関しては、P 因子がイントロン位置に挿入されている為、その発現には影響がない。*dcp-1^{prev1}* はホモでも生存し生殖能力を持つ。*dcp-1^{prev1}* ホモの卵巣は正常であるが、一部の卵室で濾胞細胞の欠如が見られる。

2-1-3. *drlCE*¹⁷ 変異体の説明

*drlCE*¹⁷ は *drlCE* の低形質変異系統である。この変異は、*drlCE* の Asn116 が Tyr に置換した一塩基置換変異である (Xu *et al.*, 2006) (図11)。*drlCE*¹⁷ は不安定なたんぱく質をコードしており、野生型の 0.5 % の DrlCE たんぱく質が検出される (Xu *et al.*, 2006)。この変異体では 26h APF での複眼の TUNEL 染色で死細胞数の減少を示し、42h APF の個眼間に野生型と比較して余剰な細胞が見られる。

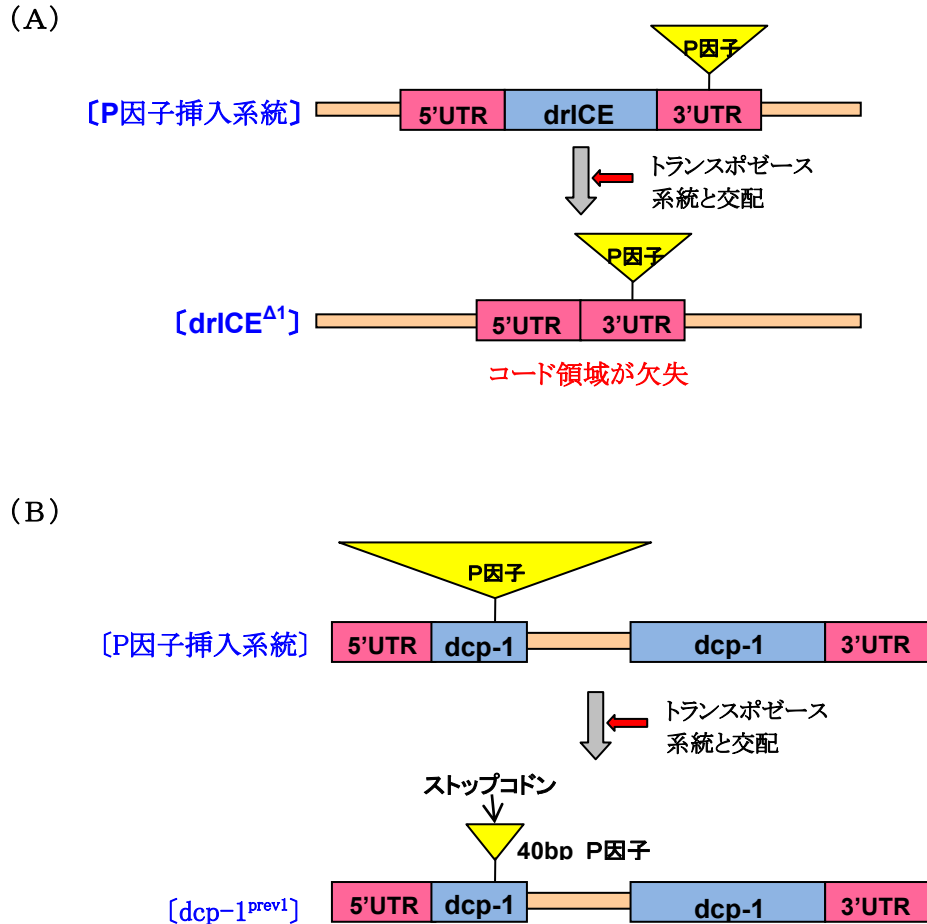


図 1 0 $drICE^{\Delta 1}$ と $dcp-1^{prev1}$ の構造

(A) $drICE^{\Delta 1}$ の構造

$drICE^{\Delta 1}$ は $drICE$ の欠失系統である。 $drICE^{\Delta 1}$ は $drICE$ の 3'UTR に P 因子が挿入された系統 IceGE284898 とトランスポゼース系統とを交配して作成した。P 因子転移の際に $drICE$ のコード領域が全て除去され、5'UTR と 3'UTR が融合しており、1.5kb の P 因子断片が 3'UTR に残っている (Muro 2006)。

(B) $dcp-1^{prev1}$ の構造

$dcp-1^{prev1}$ は $dcp-1$ (*Death caspase-1*) の機能喪失変異系統である。 $dcp-1$ は第二染色体右腕の多系染色体地図の 59E3 に位置し、相補配列に *pita* と呼ばれる別の遺伝子がコードされている。 $dcp-1^{prev1}$ は $dcp-1$ と *pita* の両方のコード領域に P 因子が挿入された系統、P{lacW}Dcp-1^{k05606} とトランスポゼース系統を交配して作成された。この系統では $dcp-1$ のエキソン部に 40bp の P 因子が挿入されており、これによりトリプレットにフレームシフトが起こり、P 因子内部に新しい終止コドンが生じた結果、正常な $dcp-1$ タンパク質が生成されない。一方、*pita* 遺伝子に関しては、P 因子がイントロン位置に挿入されている為、その発現には影響がない。 $dcp-1^{prev1}$ はホモでも野生型に匹敵する生存率と生殖能力を持つ。(Laundrie et al 2003)

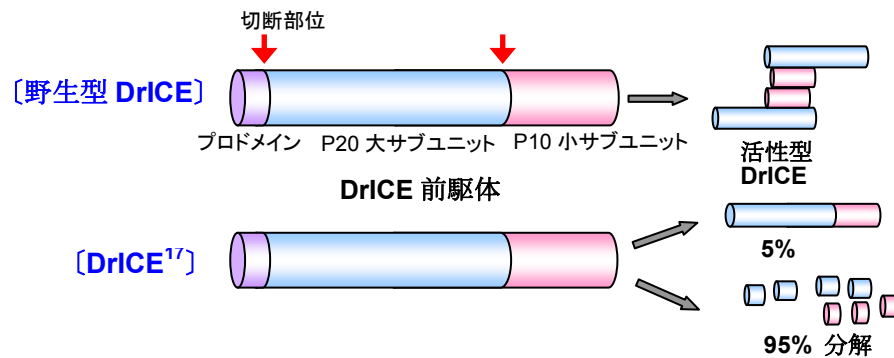


図 1 1 $drICE^{17}$ の構造

$drICE^{17}$ は $drICE$ の 1 塩基変異系統である。DrICE は N 末端からプロドメイン、P20 大サブユニット、P10 小サブユニットから成る前駆体として存在し、開始カスパーゼによって切断され、切断により大小二つずつのサブユニットから成る四量体の活性型プロテアーゼとなる。 $drICE^{17}$ は大サブユニットの良く保存されたドメインのアミノ酸 1 個が Asn116 から Tyr に置換し、不安定なタンパク質をコードする。胚では 95% は合成後すぐに分解し、5% は全長型となるが、活性型となるかどうかはわかっていない (Bergmann 2006)。

2-2. 実験用系統の作製

実験用個体は組換えを起こし、系統として維持することができないため、まず最初に以下の系統を作製した。系統作製には *drICE* 変異系統、*dcp-1* 変異系統、*elav-GAL4* 系統、*repo-GAL4* 系統、*UAS-p35* 系統、バランサー染色体系統を用いた。バランサー染色体は対合、組換えを起こさず、劣性致死と優性のマーカーを持つ。そのため、バランサー染色体をヘテロで持つ個体を作製することにより、系統作製や系統維持を行なうことができる。本研究では、第三染色体のバランサー系統として *TM3-Ser-GFP* (切翅と GFP を持つ)、*TM6-Tb-Hu* (肩剛毛変異、短蛹)、第二染色体のバランサー系統として *CyO-GFP* (曲翅と GFP を持つ)を用いた。後述する実験用個体は以下の系統を交配することにより作製した。

2-2-1. 二重変異系統 *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}* ; *drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* の作製 (図12)

二重変異体 *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}* ; *drICE^{Δ1}/drICE^{Δ1}* の作製に用いるため、変異系統 *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}* ; *drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* を作製した。まず *Sco* /*CyO-GFP*;+/+雌と+/+ ; *TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu* 雄を交配し(G0)、生じた子の中から *CyO-GFP*/+ ; + /*TM6-Tb-Hu* 雌と *CyO-GFP*/+ ; + / *TM3-Ser-GFP* 雌を選択し、各々に+/+ ; *TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu* 雄を交配した(F1)。生じた子の中から *CyO-GFP*/+ ; *TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu* 雄を選択し、*dcp-1^{prev1}/CyO-GFP*;+/+雌と交配した(F2-1)。生じた子の中から *dcp-1^{prev1}/CyO-GFP*; +/*TM3-Ser-GFP* 雄雌を選択し、両者を交配した(F3)。生じた子の中から *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}*;+/ *TM3-Ser-GFP* 雌を選択し保存した。一方、(F1)で生じた *CyO-GFP*/+ ; *TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu* 雄と+/+ ; *drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* 雌を交配し(F2-2)、生じた子の中から *CyO-GFP*/+ ; *drICE^{Δ1}/TM6-Tb-Hu* 雄を選択し、これを(F3)で生じた *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}*; +/*TM3-Ser-GFP* 雌と交配した(F4)。生じた子の中から *dcp-1^{prev1}/CyO-GFP*; *TM3-Ser-GFP/drICE^{Δ1}*の雌雄を選択、交配し(F5)、これを系統保存した。(F5)で生じた子の中から *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}*; *drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* の雌雄を選択、交配し(F6)これを系統保存した。

2-2-2. 二重変異系統 *dcp-1^{prev1}/CyO-GFP* ; *drICE¹⁷/TM6-Tb-Hu* の作製 (図 13)

二重変異体 *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}* ; *drICE¹⁷/drICE¹⁷* の作製に用いるため、二重変異系統 *dcp-1^{prev1}/CyO-GFP* ; *drICE¹⁷/TM6-Tb-Hu* を作製した。まず+/+ ; *drICE¹⁷* 雌と *dcp-1^{prev1}/CyO-GFP*; *drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* 雄を交配した(G0)。生じた子の中から+/ *CyO-GFP*; *drICE¹⁷/TM3-Ser-GFP* 雌を選択し *dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}*; *drICE^{Δ1}/TM6-Tb-Hu* 雄を交配した(F1)。生じた子の中から *dcp-1^{prev1}/CyO-GFP*; *drICE¹⁷/TM6-Tb-Hu* を選択・交配し(F2)、これを系統維持した。

2-2-3. *elav-GAL4*; *drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* の作製 (図14)

drICE^{Δ1} 変異をバックグラウンドにして *elav-GAL4* を用いて遺伝子の強制発現を行うため、*elav-GAL4*; *drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* 系統を作製した。まず *elav-GAL4/ elav-GAL4* 雌と

TM3-Ser-GGP/ TM6-Tb-Hu 雄を交配した(G0)。生じた子の中から *elav-GAL4/ Y*; TM3-Ser-GGP/ +雄を選択し、*elav-GAL4/ elav-GAL4* 雌と交配した(F1)。生じた子の中から *elav-GAL4/ elav-GAL4*; TM3-Ser-GGP/+ 雌を選択し、(F1)で生じた *elav-GAL4/ Y*; TM6-Tb-Hu/ +雄と交配した(F2)。生じた子の中から *elav-GAL4/ elav-GAL4*; TM3-Ser-GGP/ TM6-Tb-Hu 雌を選択し、*drICE^{Δ1}*; TM3-Ser-GFP 雄と交配した(F3)。生じた子の中から *elav-GAL4/ Y*; *drICE^{Δ1}*; TM3-Ser-GFP 雄を選択し、(F3)の *elav-GAL4/ elav-GAL4*; TM3-Ser-GGP/ TM6-Tb-Hu 雌と交配した(F4)。生じた子の中から *elav-GAL4*; *drICE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP の雌雄を選択・交配し(F5)、これを系統維持した。

2-2-4. *drICE^{Δ1}* repo-GAL4/ TM3-Ser- GFP or TM6-Tb-Hu の作製 (図15)

drICE^{Δ1} 変異をバックグラウンドにして *repo-GAL4* を用いて遺伝子の強制発現を行うため、*drICE^{Δ1}* *repo-GAL4/ TM3-Ser- GFP or TM6-Tb-Hu* 系統を作製した。まず *drICE^{Δ1}/ drICE^{Δ1}* (白眼)雌と *repo-GAL4/ TM3-Ser-GFP* (赤眼)雄を交配した(G0)。生じた子の中から、*drICE^{Δ1}/ repo-GAL4* 雌を選択し(*drICE^{Δ1}* と *repo-GAL4* 間で組換え起こす)、TM3-Sb/ TM6-Tb-Hu (白眼)雄と交配した。生じた子の中から赤眼をマーカーに、*drICE^{Δ1} repo-GAL4/ TM6-Tb-Hu* (組換え型)と *repo-GAL4/ TM6-Tb-Hu* (未組換え型)の雄を選択し(両者は識別できない)、その雄1頭につき TM3-Ser-GFP/ TM6-Tb-Hu 雌数頭を交配する(F3)。生じた子の中から、*drICE^{Δ1} repo-GAL4/ TM3-Ser-GFP or TM6-Tb-Hu* と *repo-GAL4/ TM3-Ser-GFP or TM6-Tb-Hu* の両方を選択して(両者は識別できない)、同じ親から生じた雌雄同士を交配した(F4)。生じた子に *drICE^{Δ1}/drICE^{Δ1}* を交配し *drICE^{Δ1}* のマーカーである不透明な翅と雄生殖器の回転不全によりスクリーニングし、マーカーを持つものを系統維持し、持たないものを破棄した。

2-2-5. UAS-*p35*; *drICE^{Δ1}* の作製 (図16)

drICE^{Δ1} 変異をバックグラウンドにして *p35* 遺伝子の強制発現を行うため、UAS-*p35*; *drICE^{Δ1}* 系統を作製した。まず CyO-GFP/+; TM3-Ser-GFP; TM6-Tb-Hu 雌と UAS-*p35*; +雄を交配した(G0-1)。生じた子の中から CyO-GFP/UAS-*p35*; TM3-Ser-GFP/+の雌雄を選択し、両者を交配した(F1)。生じた子の中から UAS-*p35*; TM3-Ser-GFP/+雌を選択した。一方、別に CyO-GFP/+; TM3-Ser-GFP; TM6-Tb-Hu 雌と +; *drICE^{Δ1}* を交配し(G0-2)、生じた子の中から CyO-GFP/+; TM6-Tb-Hu/ *drICE^{Δ1}* 雄を選択した。先に選択した UAS-*p35*; TM3-Ser-GFP/+雌と CyO-GFP/+; TM6-Tb-Hu/ *drICE^{Δ1}* 雄を交配し(F2)、生じた子の中から UAS-*p35/ CyO-GFP*; TM3-Ser-GFP/ *drICE^{Δ1}* 雌雄を選択・交配し(F3)系統維持する。次に生じた子の中からホモ系統 UAS-*p35*; *drICE^{Δ1}* 雌雄を選択・交配し(F4)、系統維持した。

2-2-6. *elav-GAL4*; *dcp-1^{prev1}* の作製 (図17)

dcp-1^{prev1} 変異をバックグラウンドにして *elav-GAL4* を用いて遺伝子の強制発現を行うため、*elav-GAL4*; *dcp-1^{prev1}* 系統を作製した。まず *elav-GAL4*; *so^D*/ CyO-GFP 雌と +/Y; *dcp-1^{prev1}* 雄を交配する(G0)。生じた子の中から *elav-GAL4/Y*; CyO-GFP/ *dcp-1^{prev1}* 雄を選

択し、*elav-GAL4*; *so^D*/ *CyO-GFP* 雌と交配する(F1)。生じた子の中から、*elav-GAL4/elav-GAL4* or Y; *CyO-GFP/dcp-1^{prev1}*を選択・交配し系統維持する(F2)。この系統の中から *elav-GAL4/ elav-GAL4* or Y; *dcp-1^{prev1}/ dcp-1^{prev1}*(*elav-GAL4; dcp-1^{prev1}*)を選択・交配し系統維持した(F3)

2-2-7. *dcp-1^{prev1}*; TM3-Ser-GFP/ *repo-GAL4* の作製 (図18)

*dcp-1^{prev1}*変異をバックグラウンドにして *repo-GAL4* を用いて遺伝子の強制発現を行うため、*dcp-1^{prev1}*; TM3-Ser-GFP/ *repo-GAL4* 系統を作製した。まず +/+; *repo-GAL4*/ TM3-Ser-GFP 雌と *so^D*/ *CyO-GFP*; *drICE^{Δ1}*/ TM6-Tb-Hu 雄を交配した(G0)。生じた子の中から +/ *CyO-GFP*; *repo-GAL4*/ TM6-Tb-Hu 雌と +/ *so^D*; *repo-GAL4*/ TM6-Tb-Hu 雄を選択し、両者を交配した(F1)。生じた子の中から *so^D*/ *CyO-GFP*; *repo-GAL4*/ TM6-Tb-Hu 雄を選択し、*dcp-1^{prev1}*; *drICE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP 雌と交配した(F2)。生じた子の中から、*dcp-1^{prev1}*/ *CyO-GFP*; TM3-Ser-GFP/ *repo-GAL4* を選択・交配し系統維持した(F3)。この系統の中から *dcp-1^{prev1}/ dcp-1^{prev1}*; TM3-Ser-GFP/ *repo-GAL4* (*dcp-1^{prev1}*; TM3-Ser-GFP/ *repo-GAL4*) を選択・交配し系統維持した(F4)。

2-2-8. *dcp-1^{prev1}*; UAS-*p35* の作製 (図19)

dcp-1^{prev1} 変異をバックグラウンドにして *p35* 遺伝子の強制発現を行うため、*dcp-1^{prev1}*; UAS-*p35* 系統を作製した。まず *so^D*/ *CyO-GFP*; *drICE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP 雌と +/+; UAS-*p35*/ UAS-*p35* 雄を交配した(G0)。生じた子の中から、*CyO-GFP*/ +; TM3-Ser-GFP/ UAS-*p35* 雄を選択し、+/+; UAS-*p35*/ UAS-*p35* 雌と交配した(F1)。生じた子の中から、*CyO-GFP*/ +; UAS-*p35*/ UAS-*p35* 雄を選択し、*dcp-1^{prev1}*; *drICE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP 雌と交配した(F2)。生じた子の中から *dcp-1^{prev1}*/ *CyO-GFP*; TM3-Ser-GFP/ UAS-*p35* を選択・交配し系統維持した(F3)。この系統から *dcp-1^{prev1}*; UAS-*p35* を選択・交配し、系統維持した(F4)。

2-3. 実験用個体の作製

以下の交配により目的の遺伝子型を持った実験用個体を作製した。

2-3-1. *drICE^{Δ1}* と *dcp-1^{prev1}* のホモ及びヘテロの実験用個体作製の掛け合わせ (図 20)

下記の個体で計数を行い、その内ホモ個体(②、④、⑧)では死細胞クラスター解析を行った。

- ① *drICE^{Δ1}*/+は、野生型と *drICE^{Δ1}*/TM3-Ser-GFP を交配して作製した。
- ② *drICE^{Δ1}/ drICE^{Δ1}* は、*drICE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP 雌雄を交配して作製した。
- ③ +/ *dcp-1^{prev1}* は、野生型と *CyO-GFP/dcp-1^{prev1}* を交配して作製した。
- ④ *dcp-1^{prev1}/ dcp-1^{prev1}* は、*CyO-GFP/dcp-1^{prev1}* 雌雄を交配して作製した。
- ⑤ *dcp-1^{prev1}/+; +/ drICE^{Δ1}* は、*dcp-1^{prev1}/ dcp-1^{prev1}*; +/+ と +/+; *drICE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP を交配して作製した。
- ⑥ *dcp-1^{prev1}/ dcp-1^{prev1}*; +/ *drICE^{Δ1}* は、*CyO-GFP/dcp-1^{prev1}*; +/+ と *CyO-GFP/dcp-1^{prev1}*; *drICE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP を交配して作製した。

- ⑦ $+ / dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta1} / drICE^{\Delta1}$ は、 $+ / +; drICE^{\Delta1} / TM3-Ser-GFP$ と $dcp-1^{prev1} / dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta1} / TM3-Ser-GFP$ を交配して作製した。
- ⑧ $dcp-1^{prev1} / dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta1} / drICE^{\Delta1}$ は、 $CyO-GFP / dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta1} / TM3-Ser-GFP$ の雌雄を交配して作製した。

なお、野生型のショウジョウバエとして Canton-S を用いた。

2-3-2. $drICE^{\Delta17}$ と $dcp-1^{prev1}$ のホモの実験用個体作製の掛け合わせ (図 21)

- ① $drICE^{17} / TM3-Ser-GFP$ の雌雄を交配し、 $drICE^{17} / drICE^{17}$ を作製した。
- ② $dcp-1^{prev1}; drICE^{17} / TM6-Tb-Hu$ の雌雄を交配し、 $dcp-1^{prev1}; drICE^{17}$ を作製した。

2-3-3. $drICE^{\Delta1}$ 変異体と $dcp-1^{prev1}$ 変異体における $p35$ 強制発現実験用個体の作製 (図 22)

- ① $elav-GAL4 / + or Y; UAS-p35 / +; drICE^{\Delta1}$ は、 $elav-GAL4; +; drICE^{\Delta1}$ 雌と $+; UAS-p35; drICE^{\Delta1}$ 雄を交配して作製した。
- ② $UAS-p35 / +; drICE^{\Delta1} / drICE^{\Delta1} repo-GAL4$ は、 $+; drICE^{\Delta1} repo-GAL4 / TM3-Ser-GFP$ と $UAS-p35; drICE^{\Delta1}$ を交配して作製し、GFP マーカーを持たない蛹を選択した。
- ③ $elav-GAL4 / + or Y; dcp-1^{prev1}; UAS-p35 / +$ は、 $elav-GAL4; dcp-1^{prev1}; +$ 雌と $+; dcp-1^{prev1}; UAS-p35$ 雄を交配して作製した。
- ④ $dcp-1^{prev1}; repo-GAL4 / UAS-p35$ は、 $dcp-1^{prev1}; repo-GAL4 / TM3-Ser-GFP$ と $dcp-1^{prev1}; UAS-p35$ を交配して作製し、GFP マーカーを持たない蛹を選択した。

なお、野生型のショウジョウバエとして Canton-S を用いた。

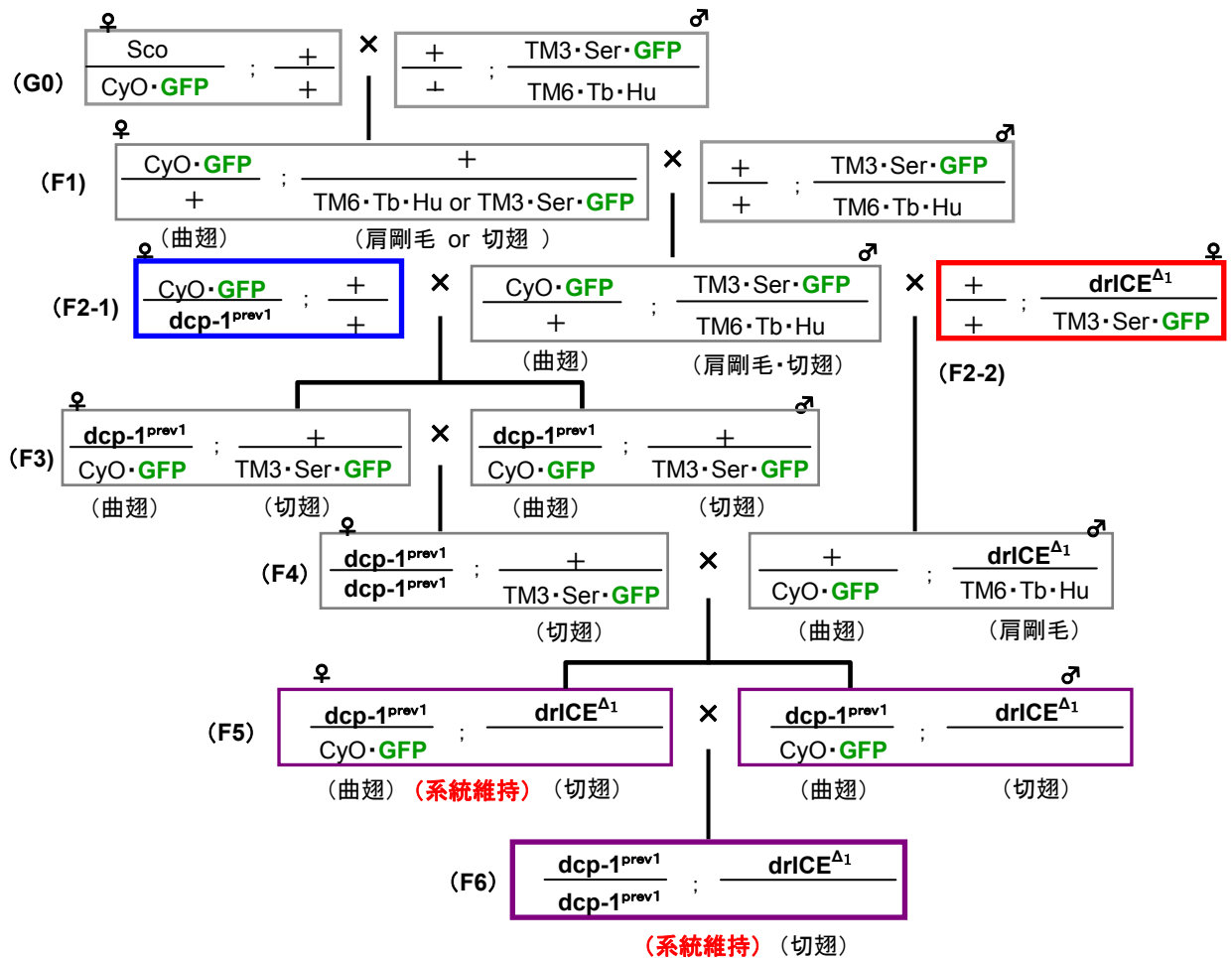


図12 二重変異系統 $dcp-1^{prev1} / dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta 1} / TM3-Ser-GFP$ の作製の為の掛け合わせ

まず $Sco / CyO-GFP; +/+$ 雌と $+/+; TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu$ 雄を交配し(G0)、生じた子の中から $CyO-GFP/+; +/TM6-Tb-Hu$ 雌と $CyO-GFP/+; +/ TM3-Ser-GFP$ 雌を選択し各々に $+/+; TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu$ 雄を交配する(F1)。生じた子の中から $CyO-GFP/+; TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu$ 雄を選択し、 $dcp-1^{prev1} / CyO-GFP; +/+$ 雌と交配する(F2-1)。生じた子の中から $dcp-1^{prev1} / CyO-GFP; +/TM3-Ser-GFP$ 雄雌を選択し、両者を交配する(F3)。生じた子の中から $dcp-1^{prev1} / dcp-1^{prev1}; +/TM3-Ser-GFP$ 雌を選択し保存する。一方、(F1)で生じた $CyO-GFP/+; TM3-Ser-GFP/TM6-Tb-Hu$ 雄と $+/+; drICE^{\Delta 1} / TM3-Ser-GFP$ 雌を交配し(F2-2)、生じた子の中から $CyO-GFP/+; drICE^{\Delta 1} / TM6-Tb-Hu$ 雄を選択し、これを(F3)で生じた $dcp-1^{prev1} / dcp-1^{prev1}; +/TM3-Ser-GFP$ 雌と交配する(F4)。生じた子の中から $dcp-1^{prev1} / CyO-GFP; TM3-Ser-GFP/drICE^{\Delta 1}$ の雌雄を選択、交配し(F5)、これを系統保存した。(F5)で生じた子の中から $dcp-1^{prev1} / dcp-1^{prev1}; TM3-Ser-GFP/drICE^{\Delta 1}$ の雌雄を選択、交配し(F6)これを系統保存した。

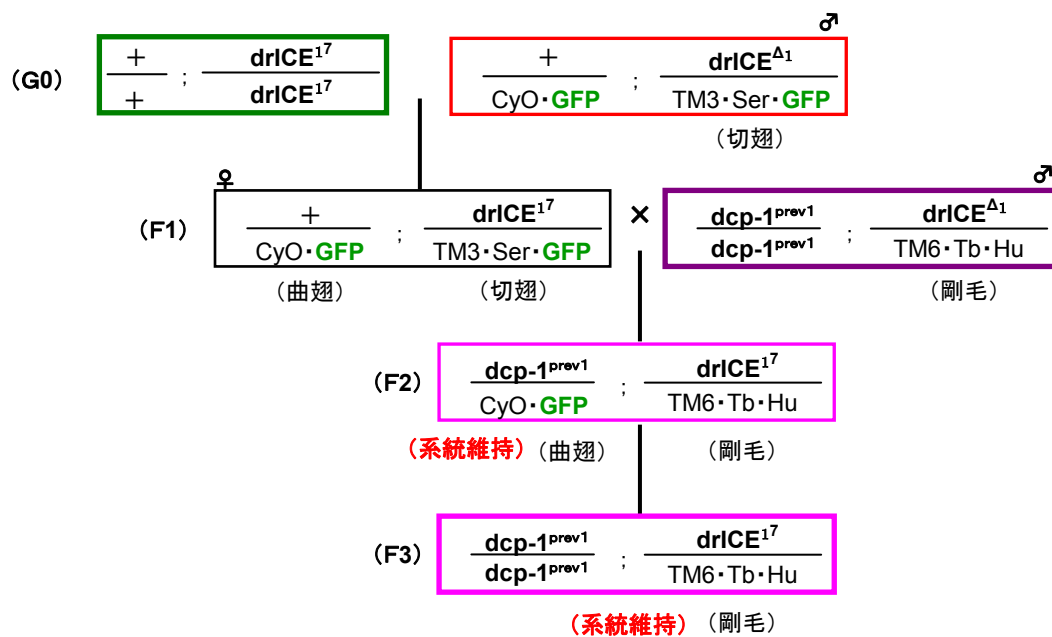


図 1 3 二重変異系統 $dcp-1^{prev1}/CyO-GFP; drICE^{17}/TM6-Tb-Hu$ の作製の為の掛け合わせ

まず $+/+; drICE^{17}$ 雌と $dcp-1^{prev1}/CyO-GFP; drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ 雄を交配し(G0)、生じた子の中から $+/CyO-GFP; drICE^{17}/TM3-Ser-GFP$ 雌を選択し $dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta 1}/TM6-Tb-Hu$ 雄を交配し(F1)、生じた子の中から $dcp-1^{prev1}/CyO-GFP; drICE^{17}/TM6-Tb-Hu$ を選択・交配し(F2)、これを系統維持した。

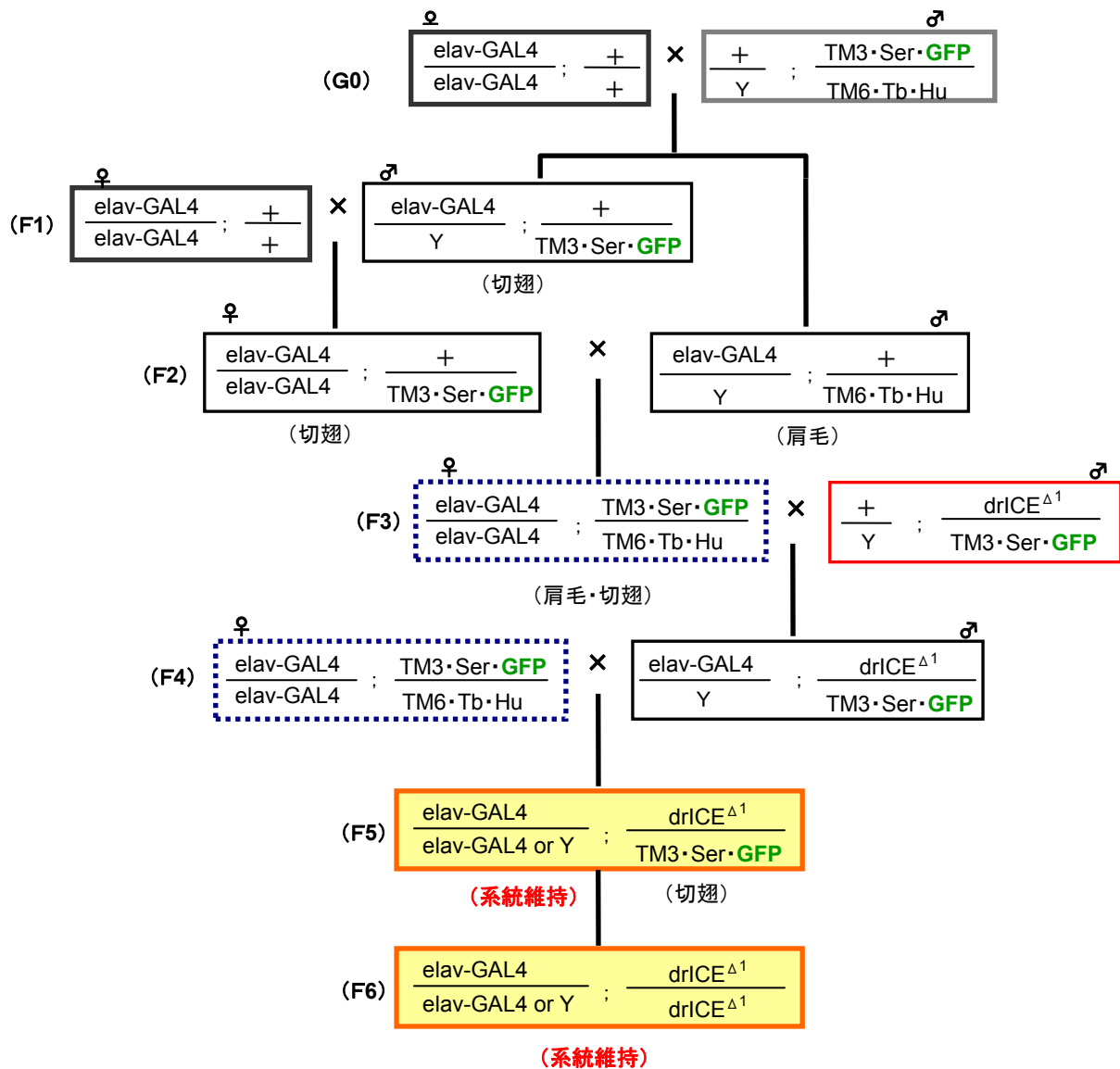


図 1 4 *elav-GAL4; drICE^{Δ1}/TM3-Ser-GFP* の作製

まず *elav-GAL4/ elav-GAL4* 雌と *TM3-Ser-GFP/ TM6-Tb-Hu* 雄を交配する(G0)。生じた子の中から *elav-GAL4/ Y; TM3-Ser-GFP/ +*雄を選択し、*elav-GAL4/ elav-GAL4* 雌と交配する(F1)。生じた子の中から *elav-GAL4/ elav-GAL4; TM3-Ser-GFP/+*雌を選択し、(F1)で生じた *elav-GAL4/ Y; TM6-Tb-Hu/ +*雄と交配する(F2)。生じた子の中から *elav-GAL4/ elav-GAL4; TM3-Ser-GFP/ TM6-Tb-Hu* 雌を選択し、*drICE^{Δ1}; TM3-Ser-GFP* 雄と交配する(F3)。生じた子の中から *elav-GAL4/ Y; drICE^{Δ1}; TM3-Ser-GFP* 雄を選択し、(F3)の *elav-GAL4/ elav-GAL4; TM3-Ser-GFP/ TM6-Tb-Hu* 雌と交配する(F4)。生じた子の中から *elav-GAL4/ elav-GAL4 or Y; drICE^{Δ1}; TM3-Ser-GFP* を選択・交配し(F5)、これを系統維持した。

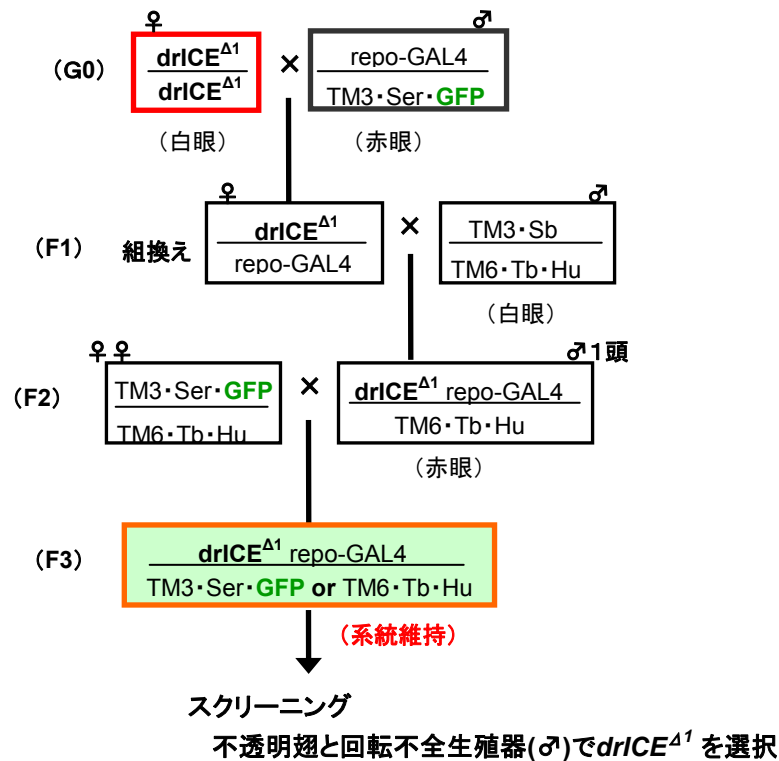


図 1 5 $drICE^{\Delta 1} repo-GAL4/ TM3-Ser- GFP \text{ or } TM6-Tb-Hu$ の作製

まず $drICE^{\Delta 1}/ drICE^{\Delta 1}$ (白眼) 雌と $repo-GAL4/ TM3-Ser-GFP$ (赤眼) 雄を交配する (G0)。生じた子の中から、 $drICE^{\Delta 1}/ repo-GAL4$ 雌を選択し ($drICE^{\Delta 1}$ と $repo-GAL4$ 間で組換え起こす)、 $TM3-Sb/ TM6-Tb-Hu$ (白眼) 雄と交配する。生じた子の中から赤眼をマーカーに、 $drICE^{\Delta 1} repo-GAL4/ TM6-Tb-Hu$ (組換え型) と $repo-GAL4/ TM6-Tb-Hu$ (未組換え型) の雄を選択し (両者は識別できない)、その雄 1 頭につき $TM3-Ser-GFP/ TM6-Tb-Hu$ 雌数頭を交配する (F3)。生じた子の中から、 $drICE^{\Delta 1} repo-GAL4/ TM3-Ser-GFP \text{ or } TM6-Tb-Hu$ と $repo-GAL4/ TM3-Ser-GFP \text{ or } TM6-Tb-Hu$ の両方を選択して (両者は識別できない)、同じ親から生じた雌雄同士を交配する (F4)。生じた子に $drICE^{\Delta 1}/ drICE^{\Delta 1}$ を交配し $drICE^{\Delta 1}$ のマーカーである不透明な翅と雄生殖器の回転不全によりスクリーニングし、マーカーを持つものを系統維持し、持たないものを破棄した。

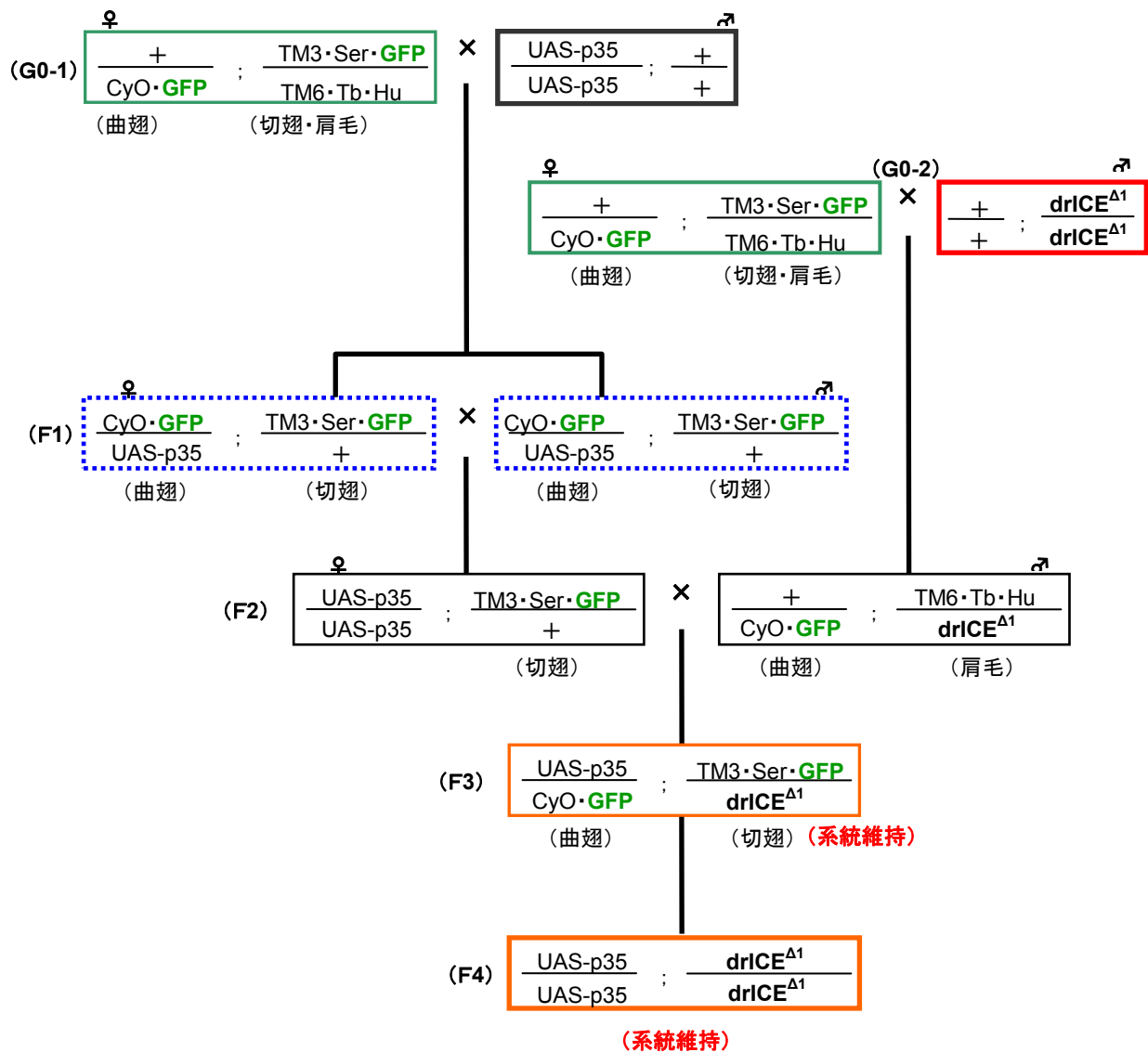


図 1 6 *UAS-p35;drICE^{Δ1}* の作製

まず *CyO-GFP/+*; *TM3-Ser-GFP*; *TM6-Tb-Hu* 雌と *UAS-p35*;+雄を交配する(G0-1)。生じた子の中から *CyO-GFP/UAS-p35*; *TM3-Ser-GFP/+*の雌雄を選択し、両者を交配する(F1)。生じた子の中から *UAS-p35*; *TM3-Ser-GFP/+*雌を選択する。一方、別に *CyO-GFP/+*; *TM3-Ser-GFP*; *TM6-Tb-Hu* 雌と+; *drICE^{Δ1}*を交配し(G0-2)、生じた子の中から *CyO-GFP/+*; *TM6-Tb-Hu/ drICE^{Δ1}*雄を選択する。先に選択した *UAS-p35*; *TM3-Ser-GFP/+*雌と *CyO-GFP/+*; *TM6-Tb-Hu/ drICE^{Δ1}*雄を交配し(F2)、生じた子の中から *UAS-p35/CyO-GFP*; *TM3-Ser-GFP/ drICE^{Δ1}*雌雄を選択・交配し(F3)系統維持する。次に生じた子の中からホモ系統 *UAS-p35; drICE^{Δ1}*雌雄を選択・交配し(F4)、系統維持した。

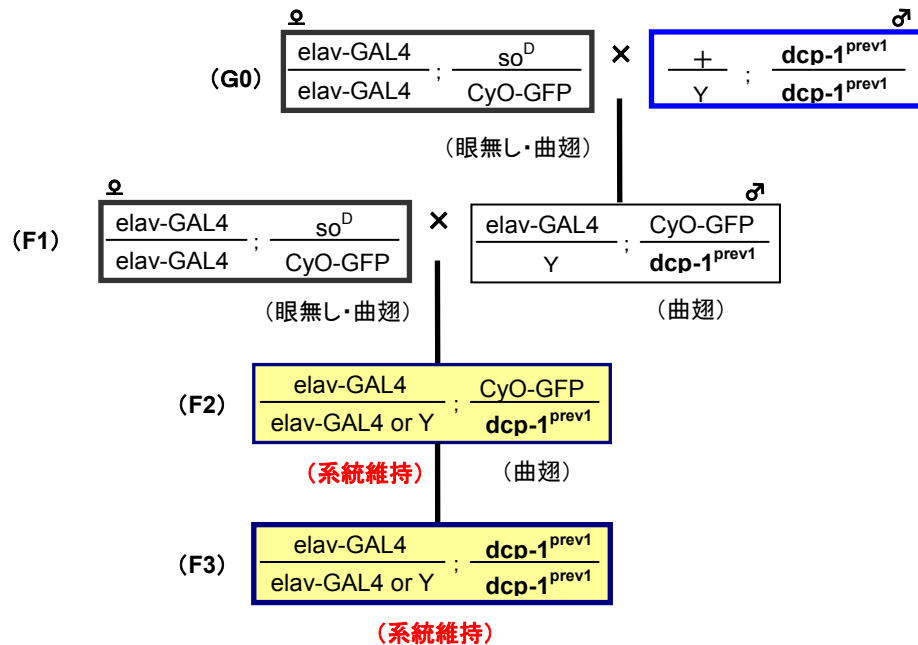


図 1 7 *elav-GAL4; dcp-1^{prev1}* の作製

まず *elav-GAL4; so^D/ CyO-GFP* 雌と *+/Y; dcp-1^{prev1}* 雄を交配する(G0)。生じた子の中から *elav-GAL4/Y; CyO-GFP/ dcp-1^{prev1}* 雄を選択し、*elav-GAL4; so^D/ CyO-GFP* 雌と交配する(F1)。生じた子の中から、*elav-GAL4/elav-GAL4 or Y; CyO-GFP/ dcp-1^{prev1}* を選択・交配し系統維持する(F2)。この系統の中から *elav-GAL4/elav-GAL4 or Y; dcp-1^{prev1}/ dcp-1^{prev1}* を選択・交配し系統維持した(F3)

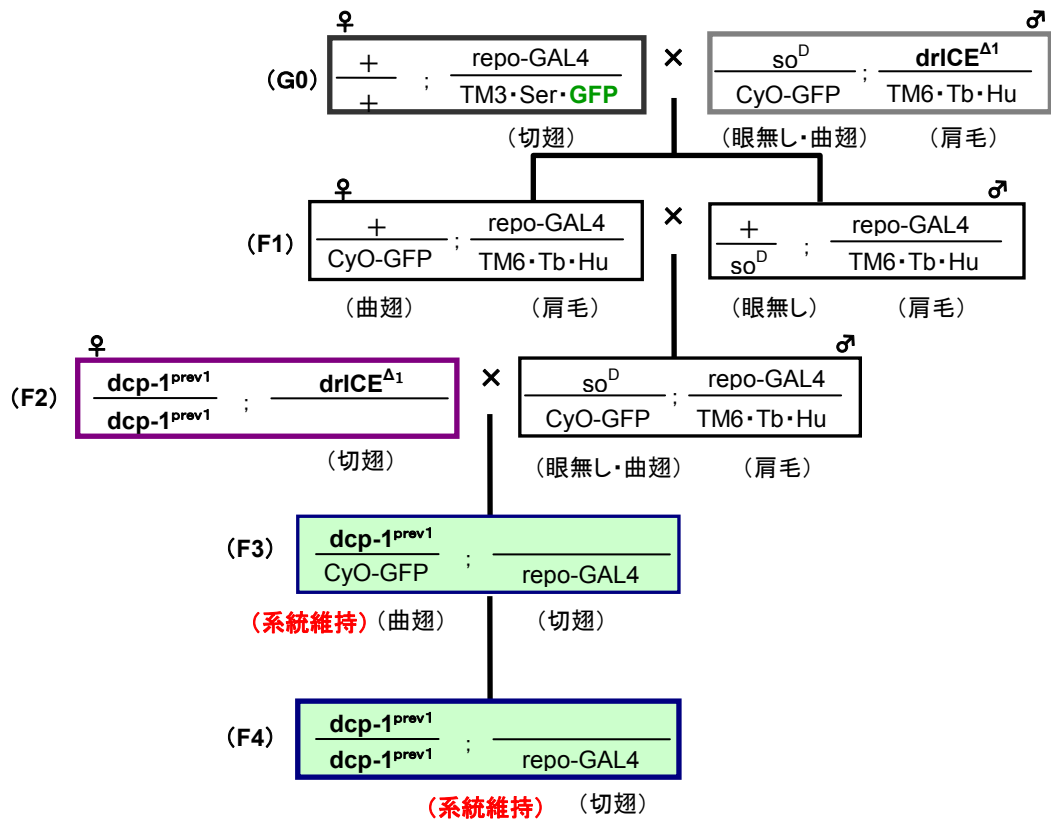


図 1 8 $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{TM3-Ser-GFP} / \text{repo-GAL4}$ の作製

まず $+/+; \text{repo-GAL4} / \text{TM3-Ser-GFP}$ 雌と $\text{so}^D / \text{CyO-GFP}; \text{drICE}^{\Delta 1} / \text{TM6-Tb-Hu}$ 雄を交配する(G0)。生じた子の中から $+/ \text{CyO-GFP}; \text{repo-GAL4} / \text{TM6-Tb-Hu}$ 雌と $+/ \text{so}^D; \text{repo-GAL4} / \text{TM6-Tb-Hu}$ 雄を選択し、両者を交配する(F1)。生じた子の中から $\text{so}^D / \text{CyO-GFP}; \text{repo-GAL4} / \text{TM6-Tb-Hu}$ 雄を選択し、 $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{drICE}^{\Delta 1} / \text{TM3-Ser-GFP}$ 雌と交配する(F2)。生じた子の中から、 $\text{dcp-1}^{\text{prev1}} / \text{CyO-GFP}; \text{TM3-Ser-GFP} / \text{repo-GAL4}$ を選択・交配し系統維持する(F3)。この系統の中から $\text{dcp-1}^{\text{prev1}} / \text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{TM3-Ser-GFP} / \text{repo-GAL4}$ を選択・交配し系統維持した(F4)

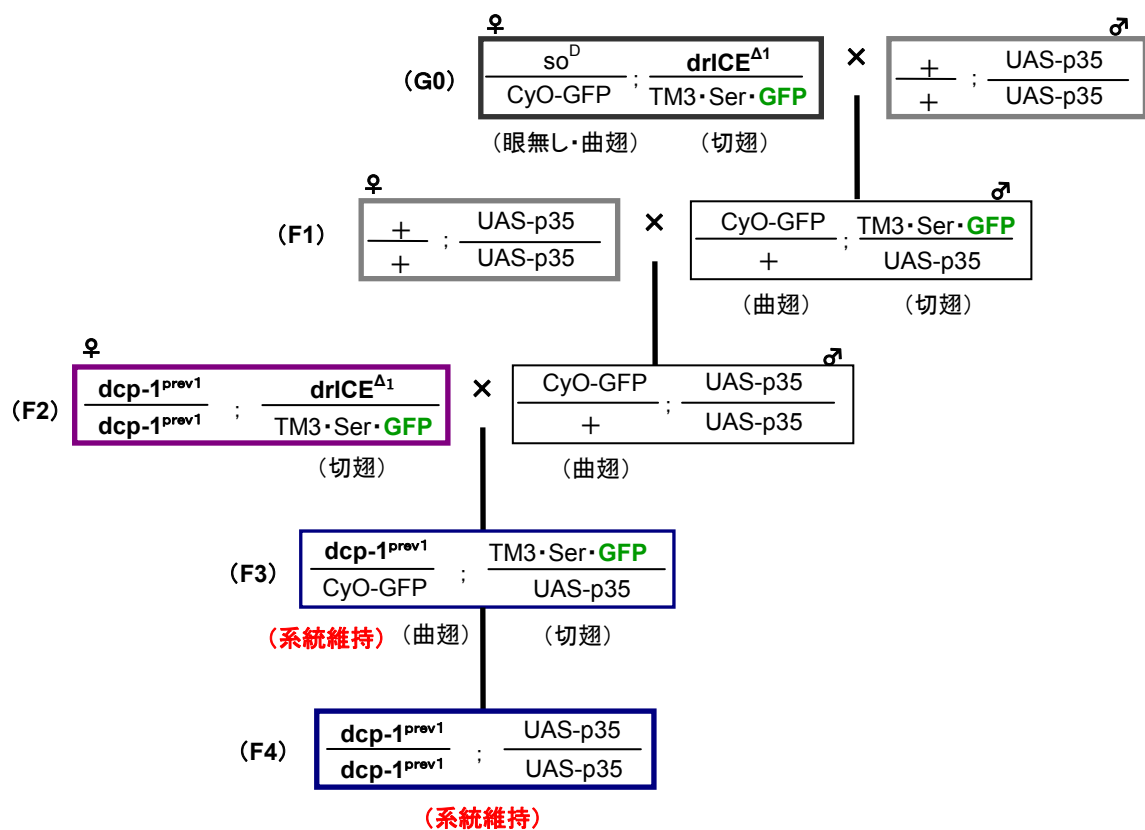


図 1 9 *dcp-1^{prev1}*; UAS-p35 の作製

まず *so^D*/ CyO-GFP; *drlCE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP 雌と +/+; UAS-*p35*/ UAS-*p35* 雄を交配する (G0)。生じた子の中から、CyO-GFP/ +; TM3-Ser-GFP/ UAS-*p35* 雄を選択し、+/+; UAS-*p35*/ UAS-*p35* 雌と交配する (F1)。生じた子の中から、CyO-GFP/ +; UAS-*p35*/ UAS-*p35* 雄を選択し、*dcp-1^{prev1}*; *drlCE^{Δ1}*/ TM3-Ser-GFP 雌と交配する (F2)。生じた子の中から *dcp-1^{prev1}*/ CyO-GFP; TM3-Ser-GFP/ UAS-*p35* を選択・交配し系統維持する (F3)。この系統から *dcp-1^{prev1}*; UAS-*p35* を選択・交配し、系統維持した (F4)。

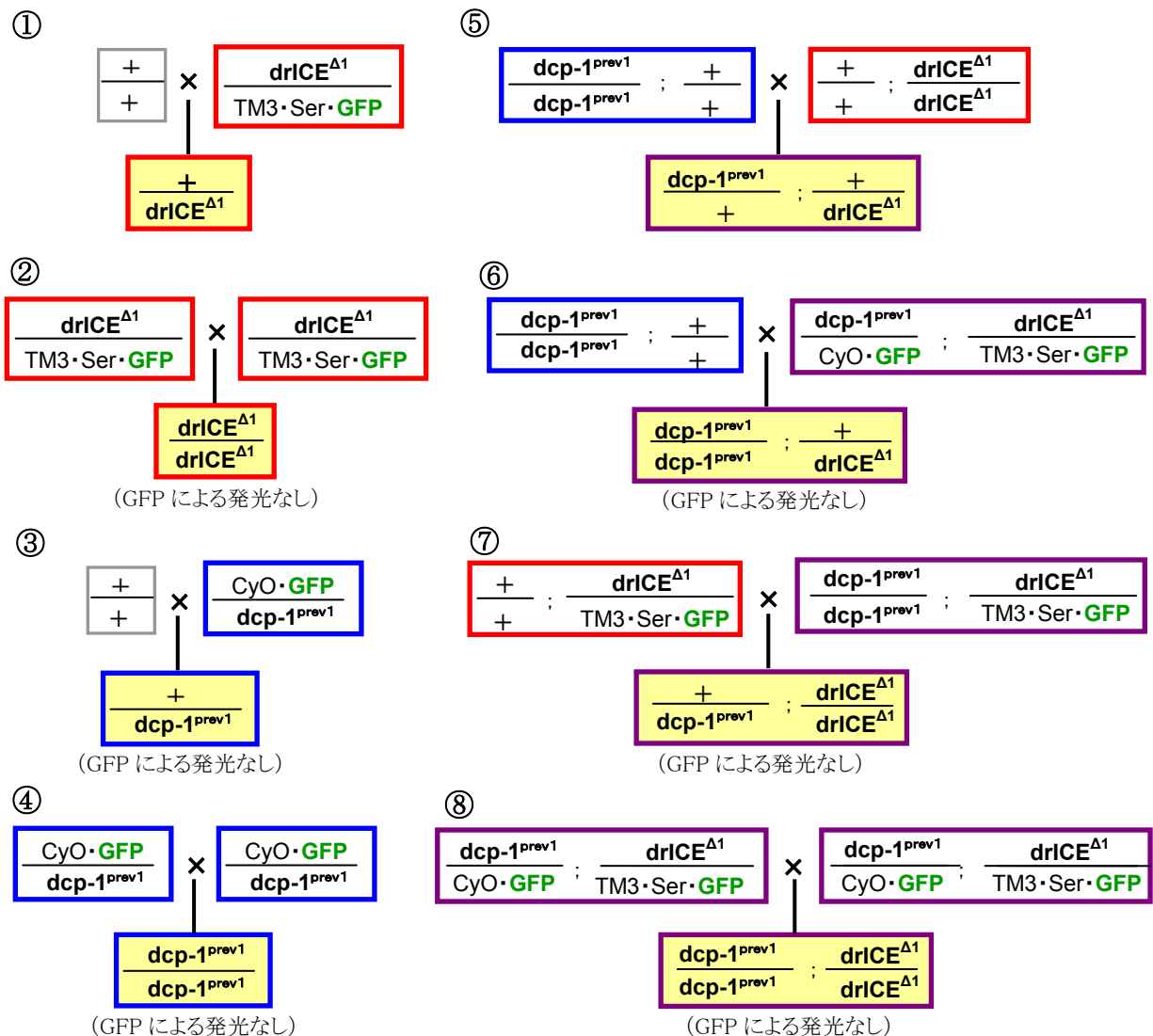


図 20 $drICE^{\Delta 1}$ と $dcp-1^{prev1}$ のホモ及びヘテロの実験用個体作製の掛け合わせ

下記の個体で計数を行い、その内ホモ個体(②、④、⑧)ではクラスター解析とライソトラーカー染色を行った。

- ① $drICE^{\Delta 1}/+$: 野生型 CS と $drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ を交配して作製した。
- ② $drICE^{\Delta 1}/drICE^{\Delta 1}$: $drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ 雌雄を交配して作製した。
- ③ $+/dcp-1^{prev1}$: 野生型 CS と $CyO-GFP/dcp-1^{prev1}$ を交配して作製した。
- ④ $dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}$: $CyO-GFP/dcp-1^{prev1}$ 雌雄を交配して作製した。
- ⑤ $dcp-1^{prev1}/+; +/drICE^{\Delta 1}$: $dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}; +/+$ と $+/+; drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ を交配して作製した。
- ⑥ $dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}; +/drICE^{\Delta 1}$: $CyO-GFP/dcp-1^{prev1}; +/+$ と $CyO-GFP/dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ を交配して作製した。
- ⑦ $+/dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta 1}/drICE^{\Delta 1}$: $+/+; drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ と $dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ を交配して作製した。
- ⑧ $dcp-1^{prev1}/dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta 1}/drICE^{\Delta 1}$: $CyO-GFP/dcp-1^{prev1}; drICE^{\Delta 1}/TM3-Ser-GFP$ の雌雄を交配して作製した。

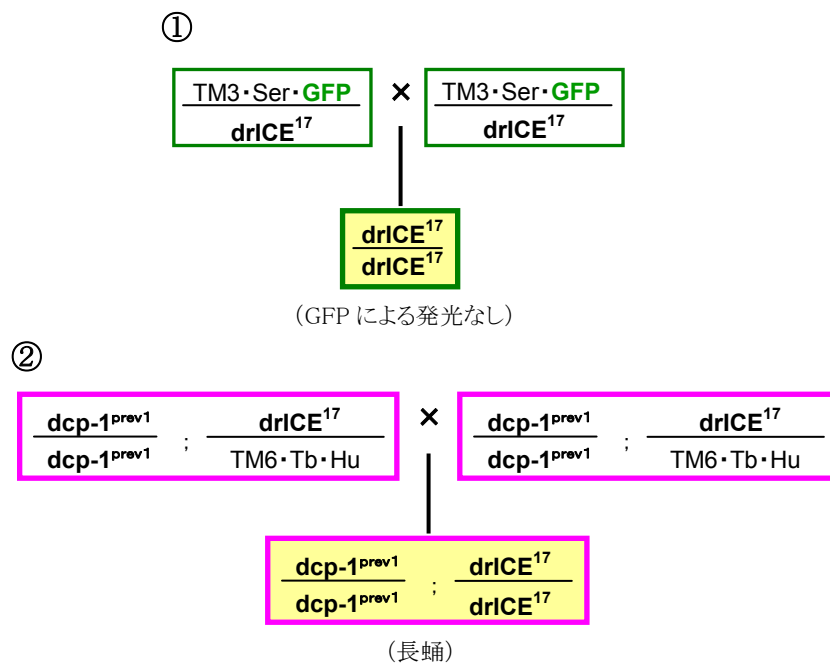


図 2 1 drICE^{17} の実験用個体の作製

以下の個体で計数、クラスター解析を行い、①ではライソトラッカー染色も行った。

① $\text{drICE}^{17}/\text{TM3-Ser-GFP}$ の雌雄を交配し、 $\text{drICE}^{17}/\text{drICE}^{17}$ を作製した。

② $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{drICE}^{17}/\text{TM6-Tb-Hu}$ の雌雄を交配し、 $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{drICE}^{17}$ を作製した。

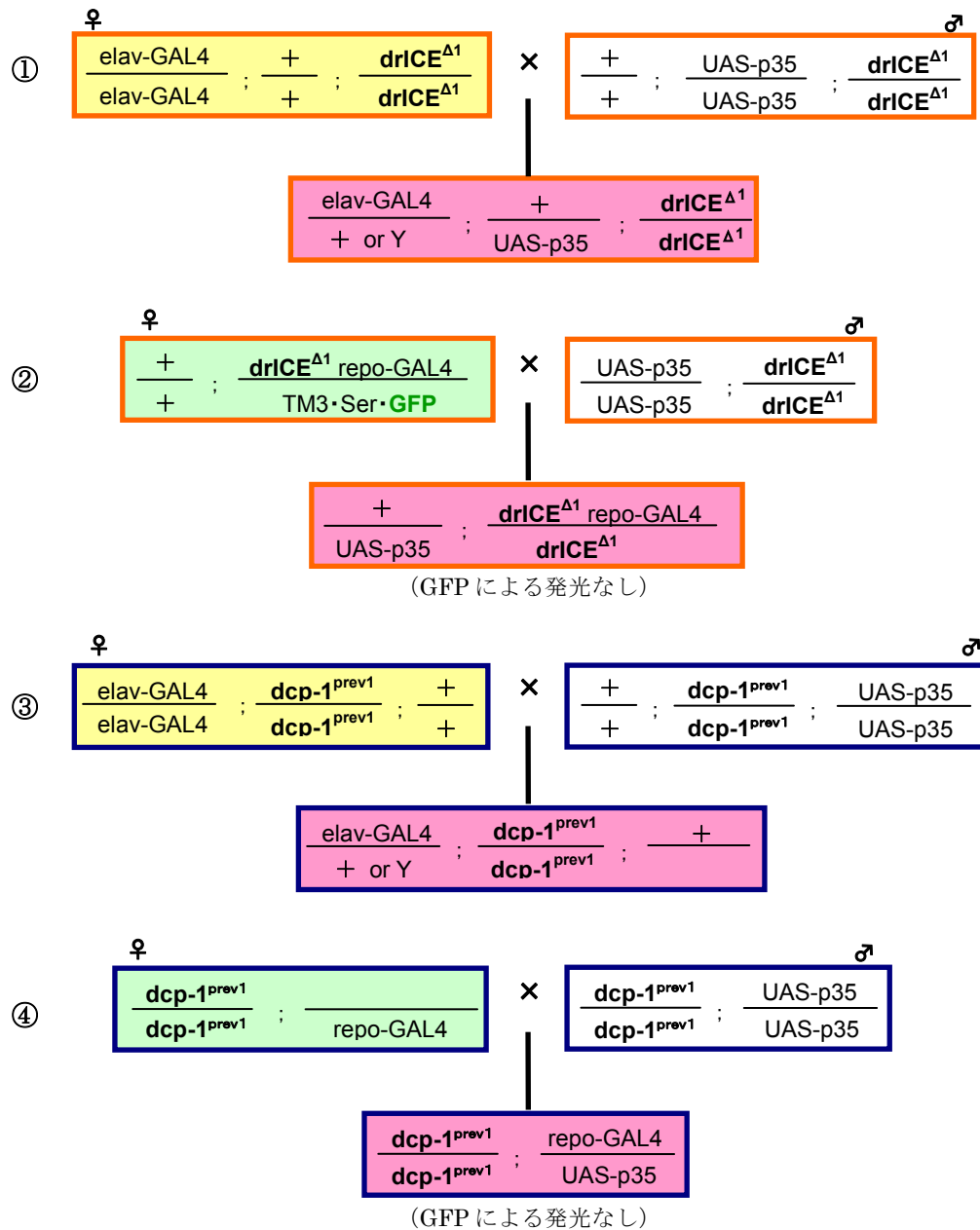


図 2 2 $\text{drICE}^{\Delta 1}$ 変異体と $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}$ 変異体における GAL4-UAS システムを用いた他の実行カスパーゼの抑制のための掛け合わせ

- ① $\text{elav-GAL4}; +; \text{drICE}^{\Delta 1}$ 雌と $+; \text{UAS-p35}; \text{drICE}^{\Delta 1}$ 雄を交配して $\text{elav-GAL4}/+ \text{ or } Y; \text{UAS-p35}/+; \text{drICE}^{\Delta 1}$ を作製した。
- ② $+; \text{drICE}^{\Delta 1} \text{ repo-GAL4}/ \text{TM3-Ser-GFP}$ と $\text{UAS-p35}; \text{drICE}^{\Delta 1}$ を交配し、 $\text{UAS-p35}/+; \text{drICE}^{\Delta 1}/ \text{drICE}^{\Delta 1} \text{ repo-GAL4}$ を作製した。GFP マーカーを持たない蛹を選択した。
- ③ $\text{elav-GAL4}; \text{dcp-1}^{\text{prev1}}; +$ 雌と $+; \text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{UAS-p35}$ 雄を交配して $\text{elav-GAL4}/+ \text{ or } Y; \text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{UAS-p35}/ +$ を作製した。
- ④ $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{repo-GAL4}/ \text{TM3-Ser-GFP}$ と $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{UAS-p35}$ を交配して、 $\text{dcp-1}^{\text{prev1}}; \text{repo-GAL4}/ \text{UAS-p35}$ を作製した。GFP マーカーを持たない蛹を選択した。

3. 結果

3-1. 変異体における視葉全体の死細胞数の変化

drICE と *dcp-1* の視葉細胞死における役割を解析するために *drICE*^{Δ1} 変異体、*dcp-1*^{prev1} 変異体、それらの二重変異体、および *drICE*¹⁷ 変異体、*dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体の死細胞数の変化を調べた。

3-1-1. *drICE*^{Δ1} 変異体、*dcp-1*^{prev1} 変異体、二重変異体における死細胞数の変化

実行カスパーゼ *drICE* の変異体、*drICE*^{Δ1} 変異体の視葉では、0h APF から 48h APF にかけて多くの死細胞が見られたが、死細胞数の推移は野生型と異なっていた(図23A)。すなわち 0h APF では 288 個で野生型(546 個)より少なく、約半分であった。その後、野生型(12h APF 845 個、24h APF 1113 個)より急速に増加し、12h APF では 990 個、24h APF で 1259 個となった。24h APF 以後も野生型(36h APF 678 個)とは異なり、増加を続け、36h APF にピークとなり 1386 個となった。その後、急速に減少するものの、48h APF には 784 個と野生型(119 個)と比べ依然として多くの死細胞が残存した。さらに、60h APF で 553 個、72h APF で 440 個と緩やかに減少しつつも野生型(60h APF 46 個、72h APF 42 個)よりはるかに多数の死細胞が蛹後期まで観察された。

dcp-1^{prev1} 変異体では死細胞数の増加の推移は野生型とほぼ同じであったが、その後の減少の推移はやや異なっていた(図23A)。すなわち、*dcp-1*^{prev1} 変異体では 0h APF で 524 個、12h APF で 803 個、24h APF で 1084 個となり、0h APF から 24h APF のピークまでの細胞死数は野生型とほぼ同じであった。しかし、36h APF 以後の減少の程度が *dcp-1*^{prev1} 変異体ではやや緩慢であり、36h APF で野生型の 678 個に対し 809 個、48h APF でも野生型 60 個に対し有意に多い 313 個の死細胞が残存していた($p>0.05$)。その後、60h APF で野生型の 46 個に対し 81 個、72h APF で野生型の 41 個に対し 81 個と有意差が無い値まで減少した($p>0.05$)。

次に *dcp-1*^{prev1};*drICE*^{Δ1} 変異体の死細胞数は 0h APF で 3 個で、野生型の死細胞数 546 個に比べて著しく少なかった(図23A)。その後、12h APF で 29 個、24h APF で 73 個、36h APF で 94 個、48h APF で 57 個とわずかに増加したが、野生型で観察されるような急激な死細胞数の増加とその後の減少はみられなかった。

また、*dcp-1*^{prev1} と *drICE*^{Δ1} の二重変異体におけるヘテロ変異体の死細胞数は野生型と有意差がなかった($p>0.05$)(図23B)。

したがって、*drICE*^{Δ1} 変異体と *dcp-1*^{prev1} 変異体の両方で死細胞が見られ、二重変異体では死細胞がほぼ消失したことから、殆どの視葉細胞死には *drICE* と *dcp-1* のいずれかが必要であり、多くの細胞死で *drICE* と *dcp-1* が機能重複的にはたらくことがわかった。しかし、*drICE*^{Δ1} と *dcp-1*^{prev1} の働きは同じではなく、*drICE*^{Δ1} 変異体ではピークが野生型より遅れ、その時の死細胞数が野生型より多く、さらに後期まで死細胞が残った。また、二重変異体で少数の死細胞が存在したことから、*drICE* と *dcp-1* を必要としないごく少数の細胞死があることがわかった。

3-1-2. *drICE*¹⁷ 変異体、*dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体における死細胞数の変化

*drICE*¹⁷ 変異体の視葉では、0h APF から 12h APF までの死細胞数は野生型 (wt) と同程度であった (図24)。その後、急激に増加し、24h APF では 2178 個となり、野生型 (1113 個) のほぼ二倍であった。野生型と同様に 24h APF でピークを迎えた後、急激に減少し 36h APF では 1358 個で、野生型 (678 個) の二倍であった。その後は全く減少せず、野生型では殆どが消失する 48h APF で 1390 個、72h APF で 1348 個と多くが残存した。また、この *drICE*¹⁷ 変異体のピーク時の死細胞の増加と、その後の残存は先に述べた *drICE*^{Δ1} 変異体 (図24) より著しかった。したがって、*drICE*¹⁷ 変異体ではピーク時の死細胞数が野生型より大きく増加し、その後減少するものの死細胞は後期まで残存し続けることがわかった。

次に *drICE*¹⁷ の機能をより詳細に解析するため、*dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体における視葉全体の死細胞数の推移を解析した。この変異体の死細胞数は、*drICE*¹⁷ が低形質変異であるにもかかわらず、0h APF では 159 個、12h APF では 458 個、24h APF では 733 個で、*dcp-1*^{prev1};*drICE*^{Δ1} よりはるかに多くの細胞死が起こったことから、*drICE*¹⁷ 変異遺伝子は細胞死実行機能を持つことが確認された (図24)。また、*dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体の死細胞数は野生型の *drICE* を持つ *dcp-1*^{prev1} 変異体 (図23(A)) より、どの段階でも 500 個位少なかったことから、*drICE*¹⁷ 遺伝子は野生型 *drICE* 遺伝子より細胞死実行活性が低いこと、すなわち低形質変異であることが確認された。さらに、*dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体では 36h APF で 749 個で 24h APF とほぼ同じであるが、それ以降、死細胞数が減少するものの、48h APF では 323 個で、72h APF では 199 個と野生型や *dcp-1*^{prev1} 変異体より多数が残存した。*dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体では死細胞数が *dcp-1*^{prev1} 変異体より少ないにもかかわらず、後期までより多くの死細胞が残存したことから、*drICE*¹⁷ 遺伝子は野生型 *drICE* 遺伝子より死細胞除去活性が低いことが示唆された。したがって、*drICE*¹⁷ 遺伝子は細胞死実行機能と死細胞除去機能の両方に部分的な不全を持つことが示唆された。

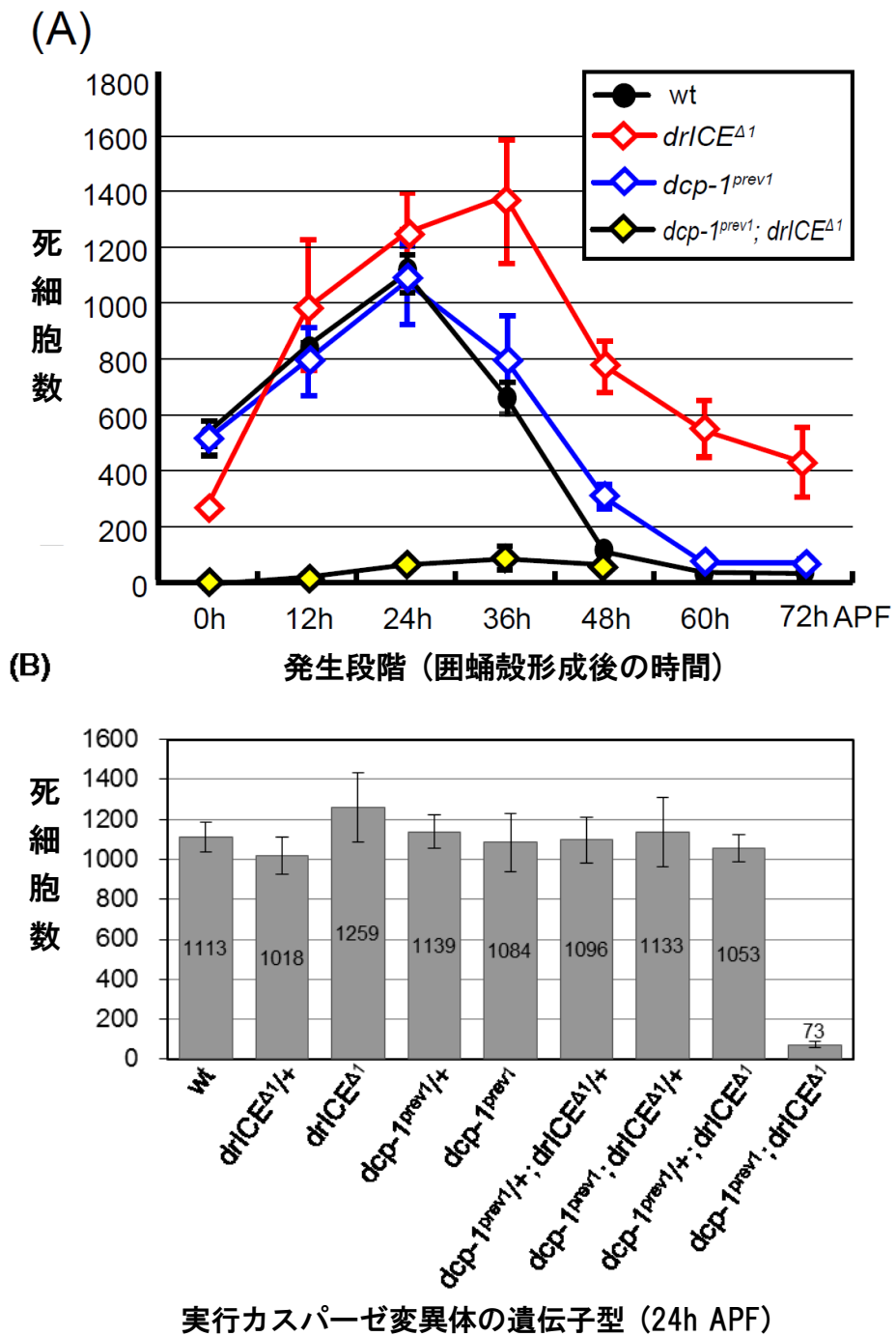


図 2 3 *drICE*^{Δ1} 変異体と *dcp-1*^{prev1} 変異体における視葉全体の死細胞数

(A) *drICE*^{Δ1} ホモ変異体、*dcp-1*^{prev1} ホモ変異体、二重変異体ホモの死細胞数の変化

二重変異体で著しく減少した

(B) *drICE*^{Δ1} 変異体、*dcp-1*^{prev1} 変異体、二重変異体のホモとヘテロの 24h APF の死細胞数

二重変異体だけで、著しく減少した。

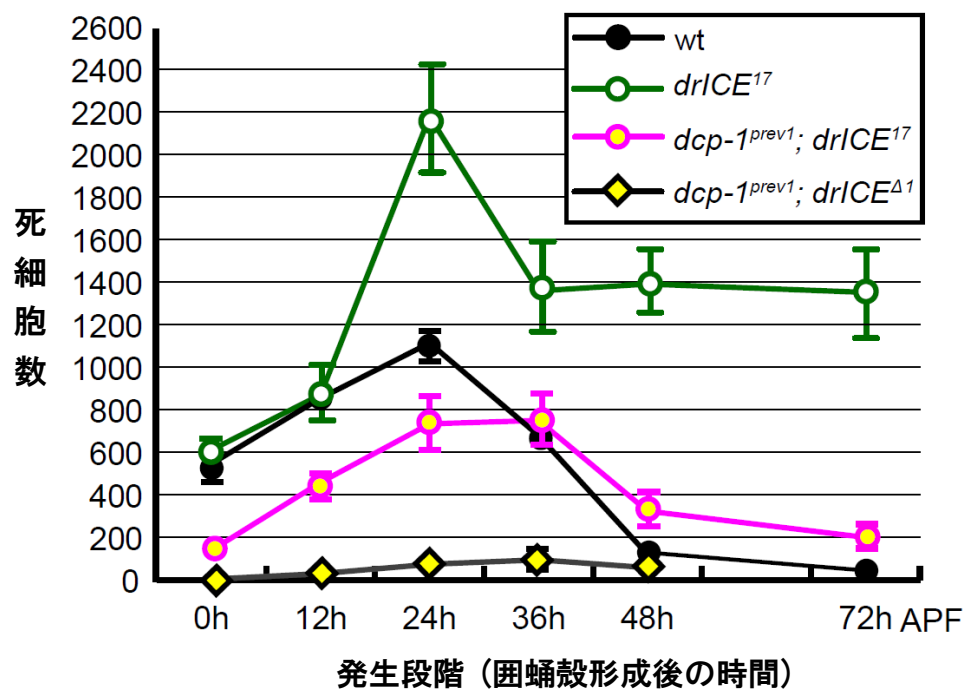


図24 低形質変異体の *drICE*¹⁷ 変異体、機能喪失変異体の *dcp-1*^{prev1} 変異体と *drICE*¹⁷ 変異体の二重変異体における死細胞数の変化

3-2. 実行カスパーゼ変異体の死細胞クラスターの解析

drICE と *dcp-1* の視葉細胞死における役割を死細胞クラスター毎に解析するために *drICE^{Δ1}* 変異体、*dcp-1^{prev1}* 変異体、それらの二重変異体、および *drICE¹⁷* 変異体、*dcp-1^{prev1};drICE¹⁷* 変異体に見られる死細胞クラスター調べた。全変異体における死細胞クラスターの解析結果を図30にまとめた。

3-2-1. *drICE^{Δ1}* 変異体の死細胞クラスターの解析

drICE^{Δ1} 変異体では、死細胞クラスターの分布が野生型と大きく異なっていた(図25、図28 A1-F1, A2-F2)。12h APF 以降は視葉の形態が野生型とは異なっていたが、その時の死細胞の位置は視葉の内部構造との相対的な位置関係より判断した。また、この変異体では、同じ発生段階の個体の死細胞分布には殆ど個体差が見られなかった(0h APF n=8、12h APF n=5、24h APF n=11、36h APF n=11、48h APF n=10、72h APF n=10)、以下の記載では例数を個々に述べない。また、この変異体における死細胞クラスター解析の結果は図30にまとめた。

野生型では、LADは、0h APF~24h APF、MALDは0h APF~12h APFに見られた(図8 A1-F1、図28 A1-F1)。しかしこれらの死細胞クラスターは *drICE^{Δ1}* 変異体では見られず、いずれの発生段階でも出現しなかった(図25 A-F, G1-G2, H1-H2, I1-I2, J1-J2、図28 A2-F2)。

LUDは、野生型では24h APFに多数集積したが(図8 C1、図28 C1)、*drICE^{Δ1}* 変異体では野生型より著しく減少した(図25 C, I1-I2 図28 C2)。

野生型ではLPDは12h APF~24h APFに存在し(図8 B1-F1、図28 B1-F1)、LoPDは24h APF~36h APFに存在し(図8 C1-D1、図28 C1-D1)、それ以後は殆ど見られなかった。しかし、これらの死細胞クラスターは *drICE^{Δ1}* 変異体では野生型より遅れて出現し、後期まで残存した。すなわち、LPDは *drICE^{Δ1}* 変異体では24h APFに出現し、72h APFまで残存した(図25 B-F, H1-H2、図28 C2-F2)。LopDは *drICE^{Δ1}* 変異体では36h APFに出現し、72h APFまで残存した(図25 D-F、図28 D2-F2)。

TCD、MCMD、MCLD、LMBD、MPLD、PMDは野生型と同時期に出現するものの、野生型より消失時期が遅れたり、72h APFまで残存したりした(図25 A-F、図28 A2-F2)。すなわち、TCDは野生型では24h APFまで見られたが(図8 A1-C1、図28 A1-C1)、*drICE^{Δ1}* 変異体では36h APFまで残存した(図25A-D、図28 A2-D2)。野生型ではMCMD、PMDが36h APF、MPLD、LMBDが48h APFまで見られたが(図8 A1-E1、図28 A1-E1)、*drICE^{Δ1}* 変異体ではMCMD、LMBD、MPLD、PMDは72h APFまで残存した(図28 A2-F2、図25 A-F, L1-L2)。

MCD、MAMDだけが野生型と同様に出現し消失した(図25 A、図28 A2)(図8 A1、図28 A1)。

以上の結果から、LAD、MALD、LUDでは、細胞死実行に *drICE* を必要とし *dcp-1* が存在しても *drICE* が無ければ細胞死実行できないことがわかった。LPD、LMBD、MCLD、MCD、MAMD、MCMD、MPLD、TCD、PMCD、LoPD、PMDの多く細胞死は *drICE* がなくても起こる。しかし、これらの細胞死の時間通りの進行や完遂には *drICE* が必要であることがわかった。さらに、0h APFだけに見られるMCD、MAMD、PMCDは、*drICE* が無くても細

胞死が正常に起こることがわかった。

3-2-2. *dcp-1^{prev1}* 変異体の死細胞クラスターの解析

dcp-1^{prev1} 変異体では、0h APF (n=9)、12h APF (n=8)、24h APF (n=10)、36h APF (n=10) の死細胞クラスターの分布に野生型 (図8 A1-D1) と大きな違いは見られなかった (図8 A3-D3、図 26 A-D)。

48h APF では、野生型 (図8 E1) ではこの時期までに消失する MCMD、LUD、LopD、PMD が *dcp-1^{prev1}* 変異体では残存した (n=12) (図26 E、図28 E3)。すなわち、*dcp-1^{prev1}* では、LUD はごく少数が存在し (n=12)、MCMD は領域全体に散在し (n=12)、LopD は TCD 領域に沿って細い帯状で分布していた (n=12)。PMD はごく少数が見られた (n=12)。また、MPLD は野生型より多く、領域も広がっていた (n=12)。上記以外の死細胞クラスターは野生型と大きな差は見られなかった。

72h APF では、野生型 (図8 F1) と異なり LopD が TCD 領域に沿って細い帯状に存在したが (n=10)、他の死細胞クラスターは野生型と同様に消失した (n=10) (図8 F3、図26 F)。

したがって、*dcp-1^{prev1}* 変異体では、野生型の視葉で見られる全ての死細胞クラスターが存在することから、細胞死は *dcp-1* がなくても起こることがわかった。しかし、野生型と異なり 48h APF まで死細胞が残存し 72h APF で殆ど消失したことから、細胞死の時間通りの進行には *dcp-1* が必要であると言える。

3-2-3. *dcp-1^{prev1};**drICE^{Δ1}* 変異体の死細胞クラスターの解析

*dcp-1^{prev1};**drICE^{Δ1}* では 0h APF では野生型で見られる死細胞クラスターが全て消失した (n=6) (図28 A4-E4、図27)。その後も、ほぼ全ての死細胞クラスターで死細胞は観察されなかった。しかし、PMD が 12h APF から 48 APF までごく少数継続して存在すると共に、この領域の肥大が見られた。また、MCMD が 24h APF から 48h APF までごく少数が存在した。

MCD、TCD、PMCD、MCLD、LPD、LopD、LMBD、MPLD は *drICE^{Δ1}* 変異体および *dcp-1^{prev1}* 変異体の両方で見られる死細胞クラスターである。これらの死細胞クラスターが二重変異体で見られなかったことから、これらの死細胞クラスターは *drICE* と *dcp-1* のいずれかを必要とし、そのどちらか片方で十分細胞死を起こせる死細胞クラスターであることがわかった。

また、PMD と MCMD は *drICE^{Δ1}* 変異体および *dcp-1^{prev1}* 変異体の両方で見られ、二重変異体では大きく減少するが、ごく少数が見られた。したがって、それらの死細胞クラスターは *drICE* と *dcp-1* のいずれかを必要とする大部分の死細胞と *drICE* と *dcp-1* のいずれも必要しない少数の死細胞との 2 種類から成ることがわかった。

3-2-4. *drICE¹⁷* 変異体と *dcp-1^{prev1};**drICE¹⁷* 変異体の死細胞数クラスターの解析

drICE¹⁷ 変異体と *dcp-1^{prev1};**drICE¹⁷* 変異体では、同じ発生段階の個体の死細胞分布には殆ど個体差が見られなかった (図28 *drICE¹⁷* 変異体: APF n=5、12h APF n=5、24APF n=5、36h

APF n=5、48h APF n=6、72h APF n=5)、(*dcp-1^{prev1}*;*drICE¹⁷*変異体: 0h APF n=4、12h APF n=5、24h APF n=6、36h APF n=8、48h APF n=5、72h APF n=5)以下の記載では例数を個々に述べない。

まず、これまでの実験で、全てのあるいは殆どの細胞死の実行に *drICE* を必要とすることがわかっている LAD、MALD、LUD についてこれらの変異体で検討した。*drICE¹⁷* 変異体では、LAD は 0h APF と 12h APF には存在しなかったが(図29 A1-B1)、24h APF には死細胞が野生型と同程度に多数集積するようになり(図29 C1, H1)、しかも 36h APF から 72h APF まで多数が集積し続けた(図29 D1-F1)。また、MALD は 0h APF から 12h APF まで野生型と同程度に存在した(図29 A1-B1,G1)。LUD は 24h APF で多数集積していた(図29 C1, H1)。したがって、以上の結果から、*drICE¹⁷* 変異体では LAD、MALD、LUD で細胞死実行活性が低下しているが、*drICE^{Δ1}* 変異体と異なり依然として活性を持つことがわかった。また、LAD で死細胞が後期まで残存したことから、死細胞除去不全の可能性が示された。

dcp-1^{prev1};*drICE¹⁷* 変異体では、LAD は 0h APF から 24h APF まで存在しなかった(図29 A2-C2, H1-H2)。また、MALD は 0h APF から 12h APF まで存在せず(図29 A2-B2,G1-G2)、LUD は 24h APF に存在しなかった(図29 C2,H1-H2)。この結果を野生型の *dcp-1* を持つ *drICE¹⁷* 変異体と比較すると(図29 A1-C1, G1, H1)*dcp-1* の新たな特徴がわかった。すなわち、*dcp-1^{prev1}*;*drICE¹⁷* 変異体と異なり、*drICE¹⁷* 変異体では、LAD、MALD、LUD で細胞死が見られた。これは、この死細胞クラスターにおける *dcp-1* の細胞死実行機能の存在を示している。つまり、細胞死実行機能の弱い *drICE¹⁷* 変異のバックグラウンドで、初めてこの領域における *dcp-1* の細胞死実行機能が明らかになった。

次に *drICE* がなくても細胞死が起こる死細胞クラスター(MCD、MAMD、MCMD、MCLD、TCD、PMCD、LMBD、LPD、MPLD LopD、PMD)について検討した。*drICE¹⁷* 変異体では以下の通りであった。すなわち、0h APF から 12h APF では、各死細胞クラスターでは野生型や *drICE^{Δ1}* 変異体と同程度の死細胞が見られた(図29 A1-B1)。24h APF から 36h APF では各死細胞クラスターで *drICE^{Δ1}* 変異体と同様、野生型より多数存在した(図29 C1-D1)。48h APF では多くの死細胞クラスターで *drICE^{Δ1}* 変異体と同程度、もしくはより多くの死細胞が存在した。この時期 *drICE^{Δ1}* 変異体では消失する TCD でも死細胞が存在していた(図29 E1)。72h APF でも多くの死細胞クラスター(MCMD、LMBD、TCD、LopD、PMD)で *drICE^{Δ1}* 変異体より多くの死細胞が残存し、しかも *drICE^{Δ1}* 変異体とは異なり、皮質全体に死細胞が存在した。また LPD でも *drICE^{Δ1}* 変異体より多数の死細胞が領域内に散在した(図29 F1)。

したがって、*drICE* がなくても細胞死が起こる死細胞クラスターでは、*drICE¹⁷* 変異体で 12h APF までは野生型と同様に細胞死が起こるが、24h APF 以降は各死細胞クラスターで *drICE^{Δ1}* 変異体より多数の死細胞が存在し、後期まで残存することがわかった。これにより、*drICE¹⁷* ではこれらの領域でも細胞死実行活性を持ち、しかも死細胞除去不全を持つ可能性が示された。

dcp-1^{prev1};*drICE¹⁷* 変異体では、MAMD と LPD は存在しなかった(図29 A2-F2,H1-H2)。MCLD は 12h APF には存在しなかったが(図29 B2,G1-G2)、24h APF から表層に見られるようになった(図29C2,H1-H2)。MCD は 0h APF に存在した(図28 A2)。MCMD、LMBD、TCD、PMCD、LopD、PMD は正常な時期に出現し(図29 B2-E2)、蛹後期まで残存した(図29 F2)。しかし、存在域は殆どが表層に極限され、中心部には極端に少なかった。また、

PMD はいずれのステージでも多数集積し、その領域で視葉の肥大が見られた(図29 A2-F2,I1-I2)。

以上の結果を野生型の *dcp-1* を持つ *drlCE¹⁷* 変異体と比較すると、*drlCE¹⁷* 変異体で見られる 72h APF の皮質内部の細胞死実行に *dcp-1* が必要であることがわかる。先に述べたように、*drlCE^{Δ1}* 変異体では 72h APF ではメダラ・ロビュラプレートニューパイルの周辺領域に多くの死細胞が蓄積していた。*dcp-1^{prev1};drlCE^{Δ1}* は 72h APF までに致死となるため、この細胞死における *dcp-1* の役割は解析することはできなかった。しかし、*dcp-1^{prev1};drlCE¹⁷* 変異体を用いたこの実験で、*dcp-1* がこれらの細胞死の実行カスパーゼであることが初めてわかった。

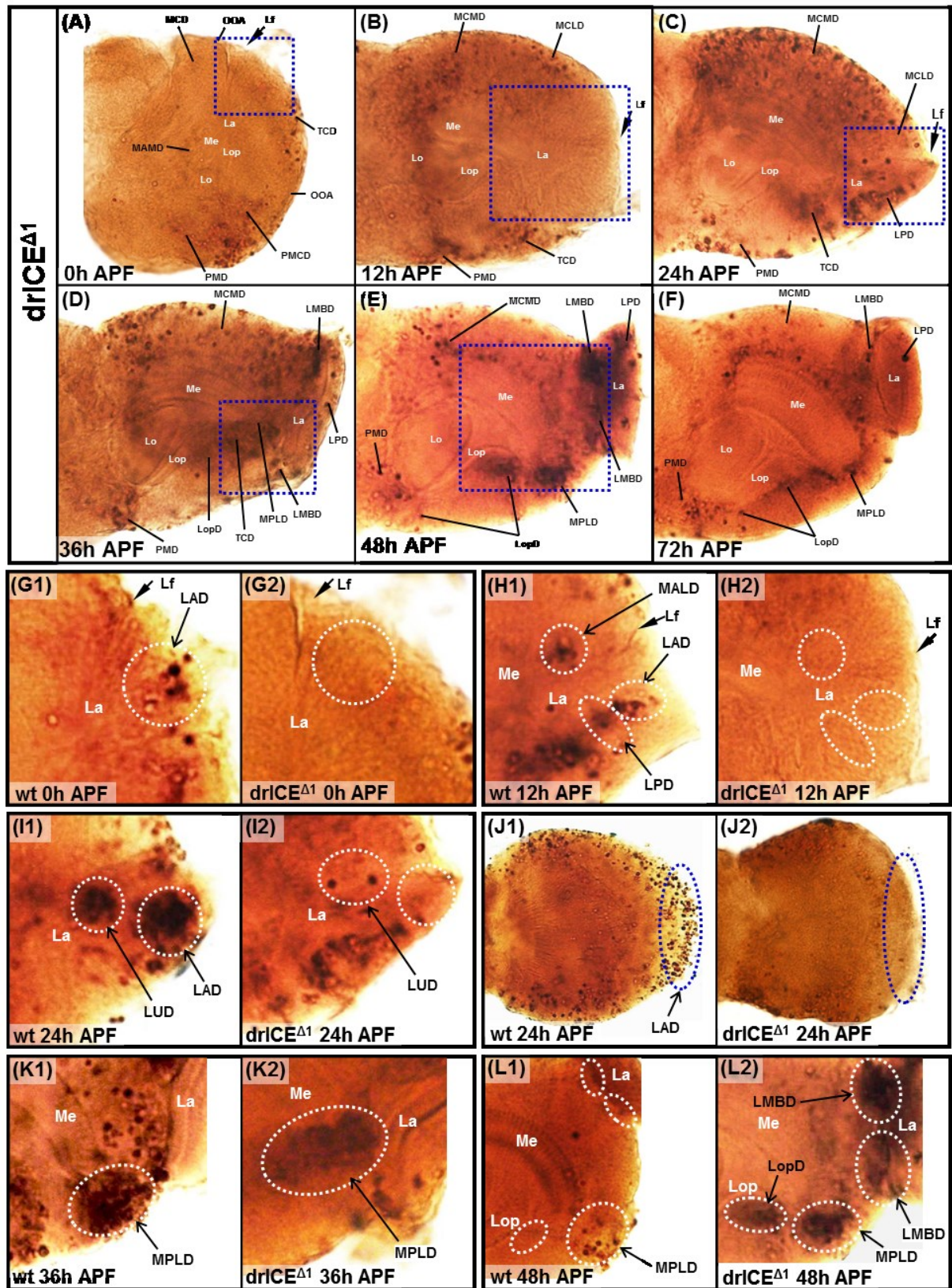


図 2-5 *drICE Δ 1* 変異体の死細胞クラスター像

(G2)は(A)青枠の拡大写真で、(G1)は対応する野生型の領域。(H2)は(B)青枠の拡大写真で (H1)は対応する野生型の領域。(I2)は(C)の拡大写真で、(I1)は対応する野生型の領域。(J2)は *drICE Δ 1* 変異体の 24h APF の視葉前方写真、(J1)は野生型の前方写真で、点線はラミナ領域。(K2)は(D)青枠の拡大写真、(K1)は対応する野生型の領域。(L2)は(E)青枠の拡大写真、(L1)は対応する野生型の領域

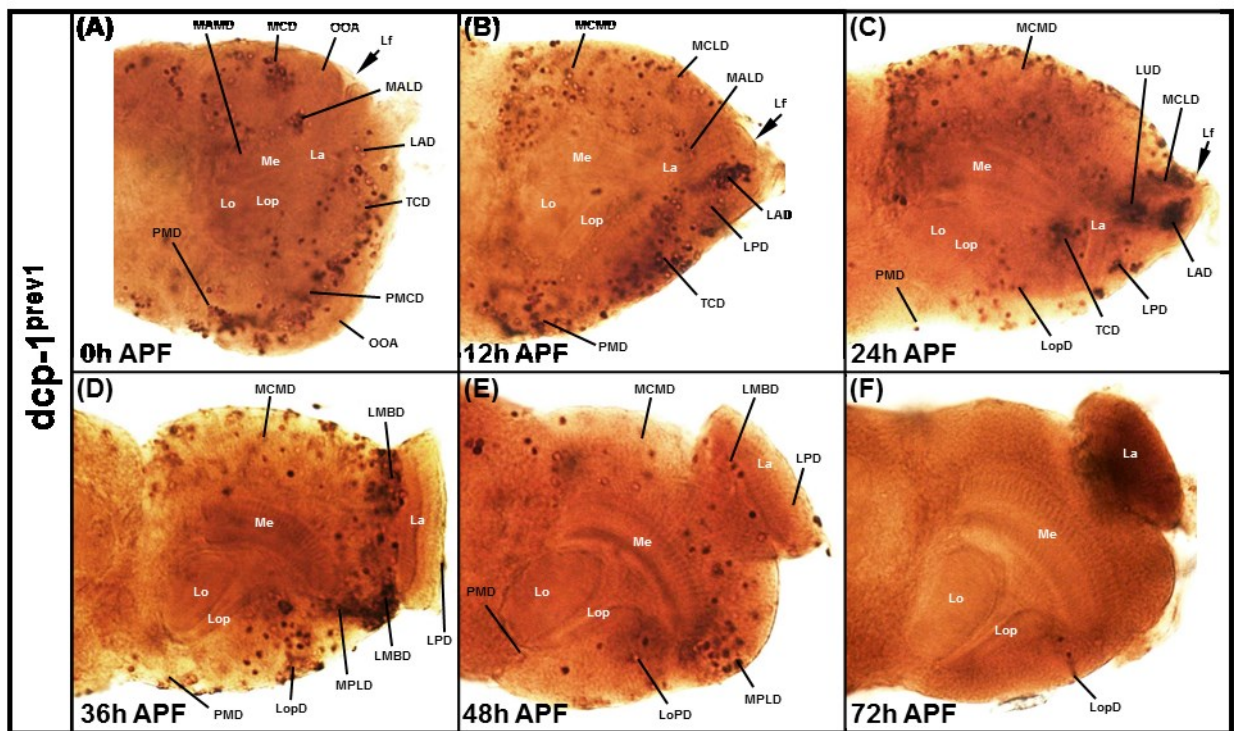


図 2 6 *dcp-1^{prev1}* 変異体の死細胞クラスター像

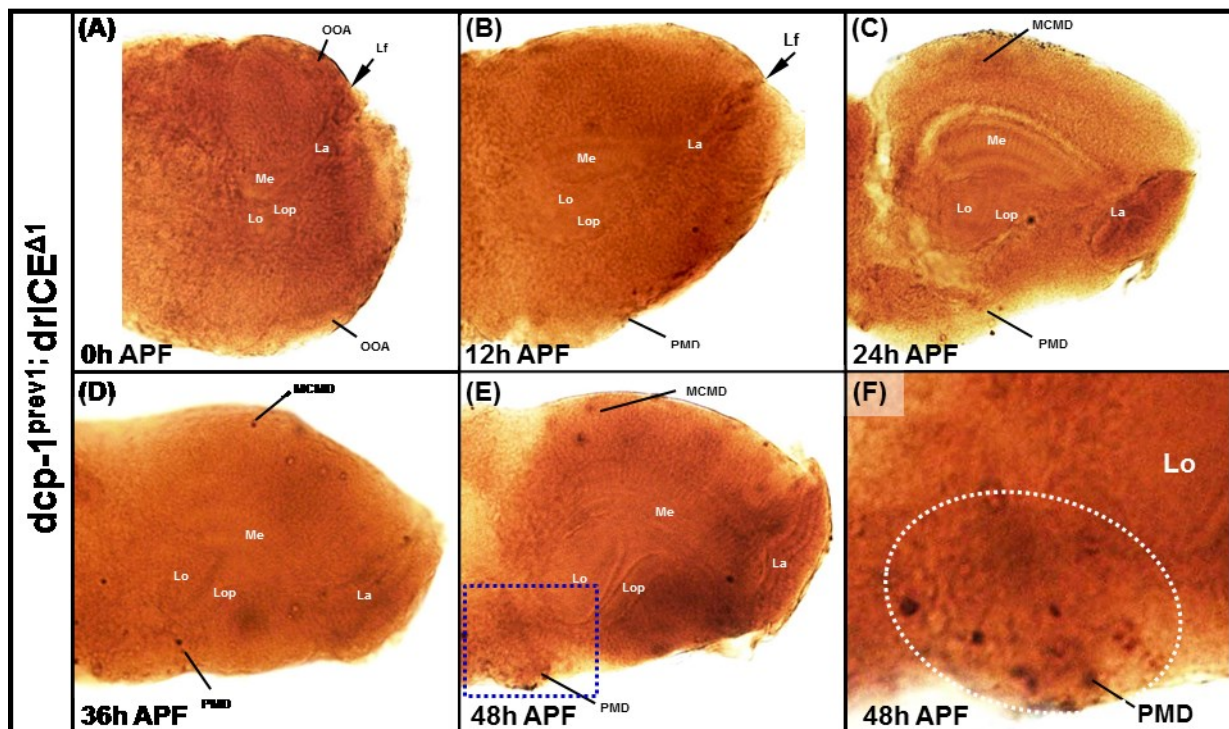


図 2 7 *dcp-1^{prev1}; drICE^{Δ1}* 変異体の死細胞クラスター像

(F)は(E)の拡大写真である。白点線円内に PMD の肥大と死細胞が観察される。

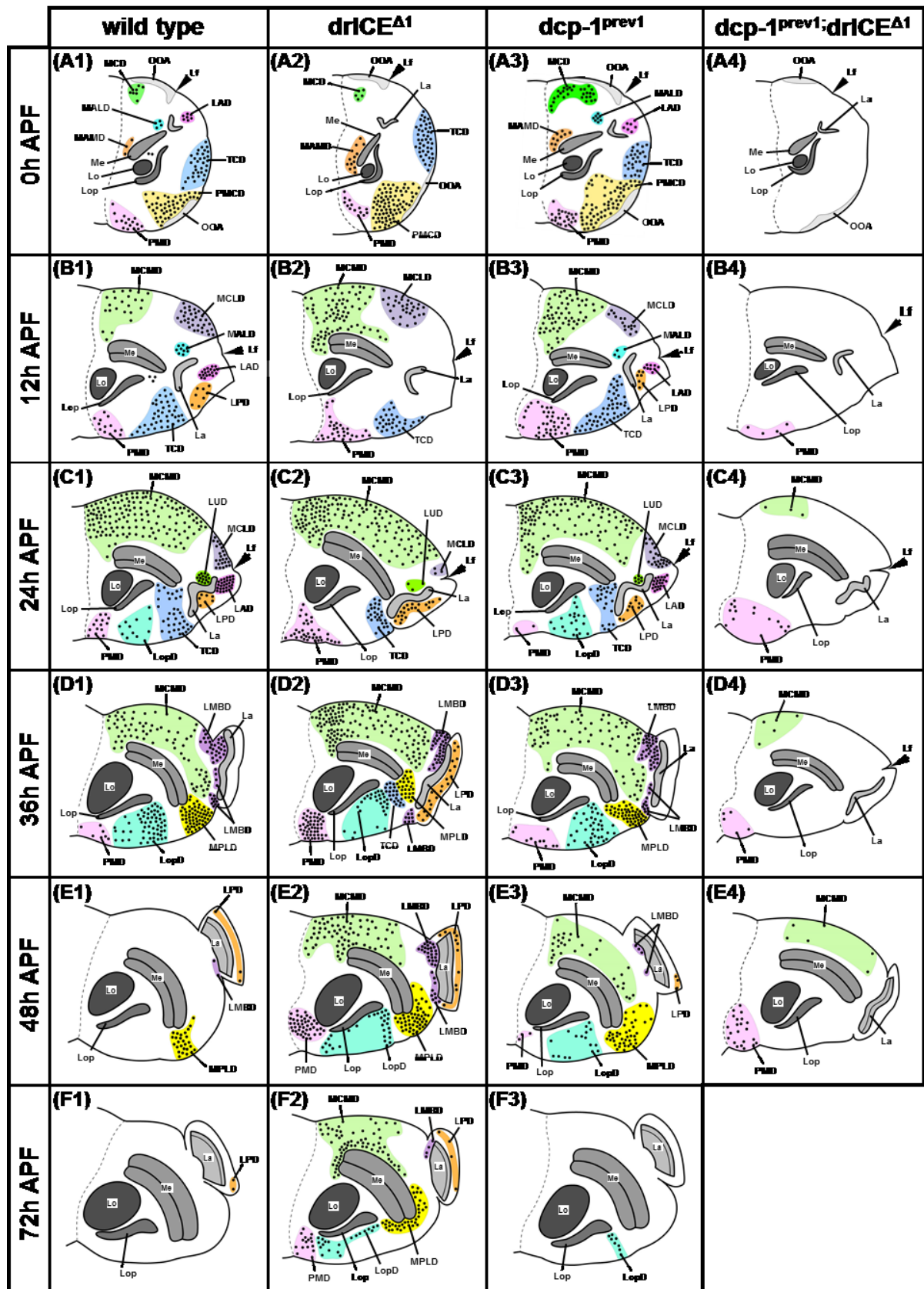


図 2 8 *drICE^{Δ1}* 変異体、*dcp-1^{prev1}* 変異体、*dcp-1^{prev1};**drICE^{Δ1}* 変異体の死細胞クラスターの変化模式図

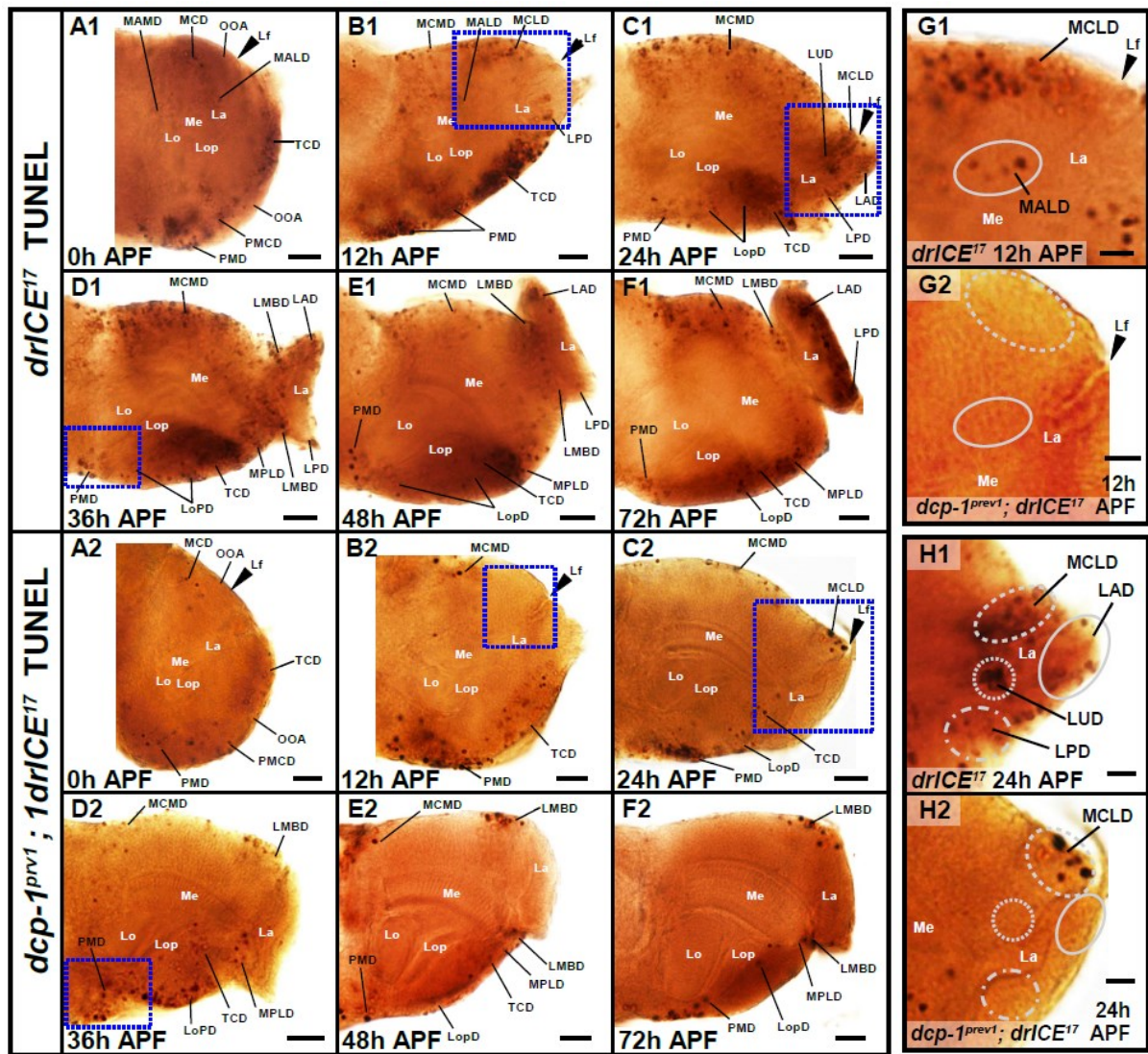


図 2 9 *drICE*¹⁷ 変異体と *dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体の死細胞クラスター解析

(A1)-(F1)は *drICE*¹⁷ 変異体、(A2)-(F2)は *dcp-1*^{prev1};*drICE*¹⁷ 変異体の TUNEL 染色で、(G1)は(B1)青枠、(G2)は(B2)青枠、(H1)は(C1)青枠、(H2)は(C2)青枠、(I1)は(D1)、(I2)は(D2)青枠の拡大。

	region cluster stage	Lamina		Lamina-Medulla boundary			Anterior				Posterior				
		LAD	LPD	MALD	LUD	LMBD	MCLD	MCD	MAMD	MCMD	MPLD	TCD	PMCD	LopD	PMD
wild type	0 h APF	T		T				T	T			T	T		T
	12 h APF	T	T	T			T			T		T			T
	24 h APF	T	T		T		T			T		T		T	T
	36 h APF					T				T	T			T	T
	48 h APF										T				
	72 h APF														
drlCE ^{Δ1}	0 h APF							T	T			T	T		T
	12 h APF						T			T		T			T
	24 h APF		T		t		T			T		T			T
	36 h APF		T			T				T	T	T		T	T
	48 h APF		T			T				T	T			T	T
	72 h APF		T			T				T	T			T	T
dcp-1 ^{prev1}	0 h APF	T		T				T	T			T	T		T
	12 h APF	T	T	T			T			T		T			T
	24 h APF	T	T		T		T			T		T		T	T
	36 h APF					T				T	T			T	T
	48 h APF		T			T				T	T			T	T
	72 h APF													T	
dcp-1 ^{prev1} ; drlCE ^{Δ1}	0 h APF														
	12 h APF														T
	24 h APF									T					T
	36 h APF									T					T
	48 h APF									T					T
drlCE ¹⁷	0 h APF			T				T	T			T	T		T
	12 h APF		T	T			T			T		T			T
	24 h APF	T	T		T		T			T		T		T	T
	36 h APF	T	T			T				T	T	T		T	T
	48 h APF	T	T			T				T	T	T		T	T
	72 h APF	T	T			T				T	T	T		T	T
dcp-1 ^{prev1} ; drlCE ¹⁷	0 h APF							T				T	T		T
	12 h APF									T		T			T
	24 h APF						T			T		T		T	T
	36 h APF					T				T	T	T		T	T
	48 h APF					T				T	T	T		T	T
	72 h APF					T					T			T	T

T : TUNEL-positive cells present both in mutants and wild type

t : Fewer TUNEL-positive cells in the mutant than in wild type

T : TUNEL-positive cells present in mutants but not in wild type

図 3 0 カスパーゼ変異体の TUNEL 陽性死細胞の分布まとめ

黒 T: 野生型と変異体の両方に存在する TUNEL 陽性細胞。t: 野生型より変異体の方が少ない TUNEL 陽性細胞。赤 T: 野生型には無いが、変異体にはある TUNEL 陽性細胞。

3-3. 変異体における死細胞クラスターを構成する死細胞の種類の同定

drICE と *dcp-1* が細胞死にはたらく細胞種が神経細胞かグリア細胞かを死細胞クラスター毎に同定するため、*drICE*^{Δ1} 変異体および *dcp-1*^{prev1} 変異体バックグラウンドで、神経細胞特異的あるいはグリア細胞特異的に実行カスパーゼ抑制因子 *p35* を強制発現させて実行カスパーゼを抑制し、各死細胞クラスターの死細胞の有無や減少を調べた。

3-3-1. *drICE*^{Δ1} 変異体の死細胞クラスターに見られる死細胞の種類 (図31)

drICE^{Δ1} 変異体の各死細胞クラスターにおける死細胞の種類を同定するため、*drICE*^{Δ1} 変異体の神経細胞とグリア細胞でそれぞれ *p35* を強制発現させ、*drICE* 以外の実行カスパーゼを抑制した(図31)。神経細胞での *p35* 強制発現方法として *elav-GAL4; UAS-p35; drICE*^{Δ1}、グリア細胞での *p35* 強制発現方法として *UAS-p35; drICE*^{Δ1}-*repo-GAL4* を用いた。なお、この変異体では、同じ発生段階の個体の死細胞分布には殆ど個体差が見られなかった(図31) (*elav-GAL4 >UAS-P35* ; 0h APF n=7、24APF n=9、48h APF n=11、72h APF n=9) (*repo-GAL4 >UAS-P35* ; 0h APF n=6、24APF n=10、48h APF n=5、72h APF n=5)、以下の記載では例数を個々に述べない。

drICE^{Δ1} は、0h APF に、全ての死細胞クラスター(MAMD、TCD、PMCD、PMD)が *elav-GAL4 >UAS-p35* だけで消失したことから、これらの死細胞クラスターは主に神経細胞または神経前駆細胞で構成されていることがわかった(図31 A1-A3)。すなわち、TCD、PMCD、PMD には、野生型と異なり神経以外の細胞種は見られなかった(図8 A1-A4)。

24h APF では LPD 以外の死細胞クラスター(LUD、MCMD、MCLD、TCD、PMD)は *elav-GAL4 >UAS-p35* だけで消失し、全て神経細胞で構成されていることがわかった(図31 B1-B3)。LUD、PMD は、野生型(図8 C1-C4)とは異なり、グリア細胞が混在しないことがわかった。一方、LPD は *elav-GAL4 >UAS-p35* と *repo-GAL4 >UAS-p35* のいずれでも減少はするが、消失せず、グリア細胞と神経細胞が混在していることがわかった(図31 B1-B3)。したがって、LPD は、野生型(図8 C1-C4)とは異なり神経細胞が含まれることがわかった。

48h APF、72h APF では LPD、LMBD 以外の死細胞クラスター(MCMD、TCD、MPLD、LopD、PMD)が *elav-GAL4 >UAS-p35* だけで消失したことから、これらの死細胞クラスターは全て神経細胞で構成されていることがわかった(図31 C1-C3, D1-D3)。一方、LPD は *elav-GAL4 >UAS-p35* と *repo-GAL4 >UAS-p35* のいずれでも減少するが消失せず、グリア細胞と神経細胞が混在していることがわかった(図31 C1-C3, D1-D3)。LMBD は 48h APF では *elav-GAL4 >UAS-p35* で消失したことから神経細胞で構成され(図31 C1-C3)、72h APF では *elav-GAL4 >UAS-p35* と *repo-GAL4 >UAS-p35* のいずれでも減少するが少数が残存したことから、神経細胞とグリア細胞が混在していることがわかった(図31 D1-D3)。

以上の結果から、*drICE*^{Δ1} 変異体に見られる死細胞の種類は、多くが野生型と同様であることが分かった。しかし、LPD は野生型と異なり、グリア細胞の他に神経細胞を含むことがわかった。また、野生型と異なり、0h APF の TCD、PMCD、PMD は神経細胞および神経前駆細胞のみを含み、*elav-GAL4 >UAS-p35* で消失しない細胞死は含まれないことから、これらの細胞死は *drICE* を必要とし、*dcp-1* だけでは起こせないことがわかった。さらに、

24h APF の LUD と PMD も野生型と異なり神経細胞だけで構成され、*elav-GAL4 >UAS-p35* で消失しない細胞死を含まないことから、これらの細胞死は *drlICE* を必要とし、*dcp-1* だけでは起こせないことがわかった。

3-3-2. *dcp-1^{prev1}* 変異体の死細胞クラスターに見られる死細胞の種類 (図32)

dcp-1^{prev1} 変異体(図26)における死細胞の種類を同定するため、*dcp-1^{prev1}* 変異体の神経細胞とグリア細胞でそれぞれ *p35* を強制発現させ、*dcp-1* 以外の実行カスパーゼを抑制した。解析結果は図33にまとめた。神経細胞での *p35* 強制発現には *elav-GAL4;dcp-1^{prev1};UAS-p35* を用い、グリア細胞には *dcp-1^{prev1};repo-GAL4/UAS-p35* を用いた。なお、この変異体では、同じ発生段階の個体の死細胞分布には殆ど個体差が見られなかったので (*elav-GAL4 >UAS-P35*; 0h APF n=5, 24APF n=7, 48h APF n=6, 72h APF n=8) (*repo-GAL4 >UAS-P35*; 0h APF n=10, 24APF n=6, 48h APF n=7, 72h APF n=4)、以下の記載では例数を個々に述べない。

0h APF では、LAD、MALD、MCD、MAMD は *elav-GAL4 >UAS-p35* だけで消失したことから、殆どが神経細胞または神経前駆細胞で構成されていることがわかった(図32 A1-A3)。すなわち、LAD と MALD は野生型(図8 A1-A4) と異なり、*elav-GAL4 >UAS-P35* でも *repo-GAL4 >UAS-P35* でも消失しない細胞死が存在しなことがわかった。TCD、PMCD、PMD は野生型と同様に *elav-GAL4 >UAS-P35* と *repo-GAL4 >UAS-P35* のいずれでも減少するが消失しなかった(図32 A1-A3)。

24h APF では LAD、LUD、MCLD、MCMD、TCD、LopD が *elav-GAL4 >UAS-P35* だけで消失したことから、殆どが神経細胞で構成されていることがわかった(図32 B1-B3)。すなわち、LUD は野生型(図8 C1-C4) とは異なり、グリア細胞を含まないことがわかった。LPD は *repo-GAL4 >UAS-P35* だけで消失したことからグリア細胞で構成されているとわかった(図32 B1-B3)。PMD は *elav-GAL4 >UAS-P35* と *repo-GAL4 >UAS-P35* のいずれでも減少するが消失せず、神経細胞とグリア細胞の両方で構成されていることが分かった(図32 B1-B3)。

48h APF では、MCMD、MPLD、LopD が神経細胞、LPD、LMBD、PMD が神経細胞とグリア細胞の両方で構成されていることが分かった(図32 C1-C3)。

72h APF では LopD が神経細胞であることが分かった。また、MCMD 領域に *elav-GAL4 >UAS-P35* で *dcp-1^{prev1}* 変異体にはない死細胞が生じた(図32 D1-D3)。

以上の結果から、*dcp-1^{prev1}* 変異体に見られる死細胞の種類は、多くが野生型と同様であることが分かった。しかし、0h APF の LAD と MALD は野生型と異なり神経細胞だけで構成され、*elav-GAL4 >UAS-P35* で消失しない細胞死を含まないことから、これらの細胞死は *dcp-1* を必要とし、*drlICE* だけでは起こせないことがわかった。また、24h APF の LUD も野生型と異なり神経細胞だけで構成され、*elav-GAL4 >UAS-P35* で消失しない細胞死を含まないことから、これらの細胞死は *dcp-1* を必要とし、*drlICE* だけでは起こせないことがわかった。

4. 考察

以上の結果から、各死細胞クラスターにおいて神経細胞とグリア細胞が細胞死に必要な実行カスパーゼの種類を同定することができた。その結果は図33にまとめた。

LAD と MALD では、多くの神経細胞が *drICE* を必要とし、少数のグリア細胞が *drICE* と *dcp-1* の両方を必要とする。LPD では多くのグリア細胞が *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要とする。LUD では、神経細胞が *drICE* を必要とし、グリア細胞が *drICE* と *dcp-1* の両方を必要とする。LMBD、MCLD、MCD、MAMD、MPLD、LopD では、神経細胞が *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要とする。TCD、PMCD では多くの神経細胞が *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要とし、グリア細胞が *drICE* を必要とする。MCMD では神経細胞が *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要とし、不明の細胞種が *drICE* と *dcp-1* のいずれも必要としない。PMD では神経細胞が *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要とし、グリア細胞が *drICE* を必要とし、不明の細胞種が *drICE* と *dcp-1* のいずれも必要としない。したがって、神経細胞とグリア細胞のどちらの場合も細胞死における実行カスパーゼの必要性は死細胞クラスター毎に異なることがわかった。すなわち神経細胞は、*drICE* だけを必要とする場合と、*drICE* と *dcp-1* のいずれかを必要とする場合があることがわかった。一方、グリア細胞は、*drICE* だけを必要とする場合と、*drICE* と *dcp-1* のいずれかを必要とする場合、*drICE* と *dcp-1* の両方を必要とする場合があることがわかった。

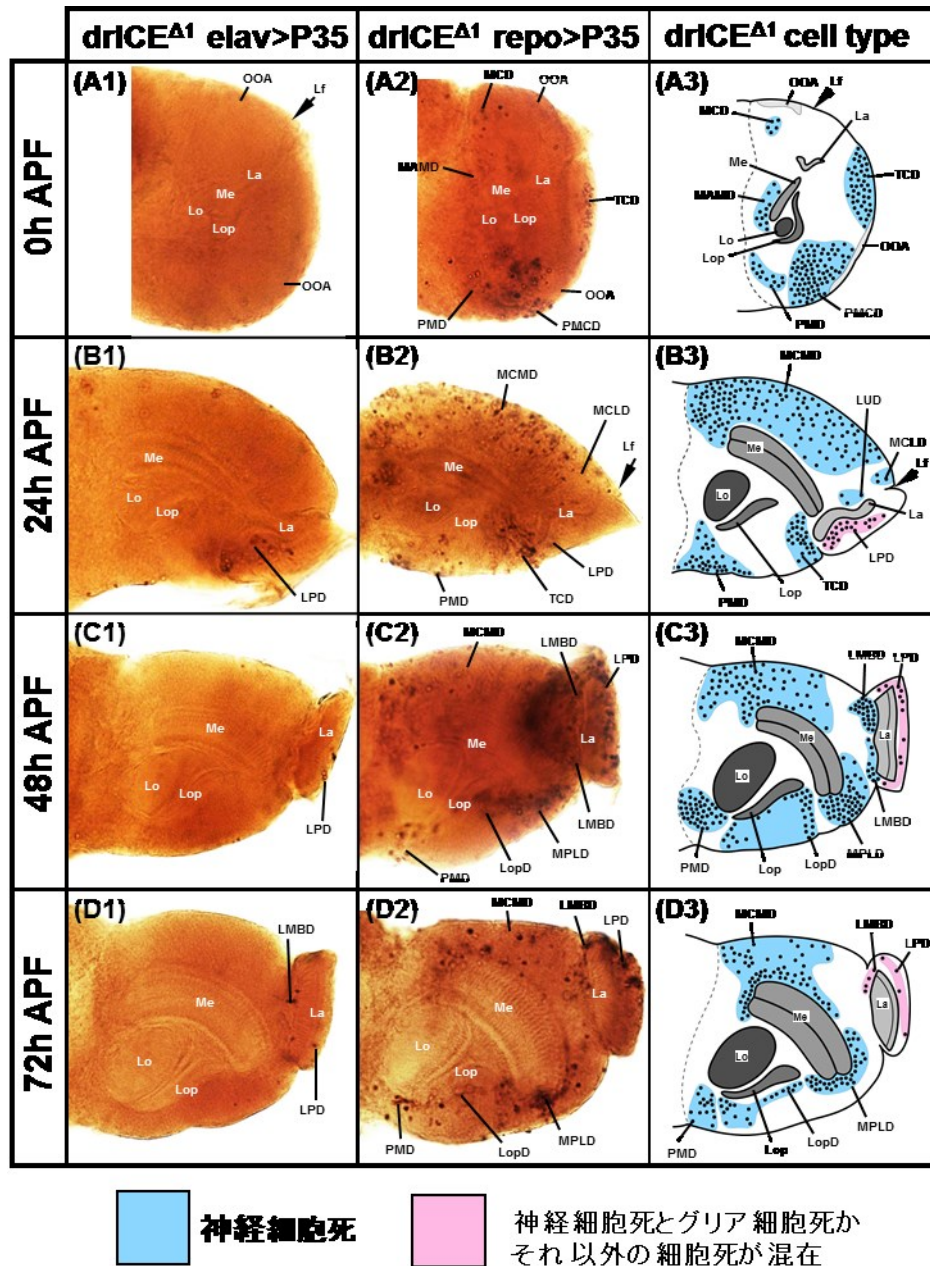


図 3 1 *drICE^{Δ1}* 変異体に見られる死細胞の種類

drICE^{Δ1} 変異体において、*elav-GAL4>UAS-p35* で神経特異的(A1)-(D1)、*repo>UAS-p35* でグリア細胞特異的(A2)-(D2)にアポトーシスを阻害した。(A3)-(D)は模式図。

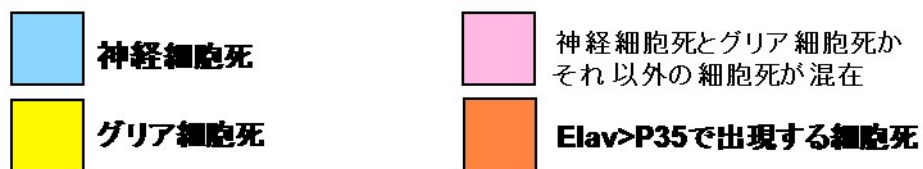
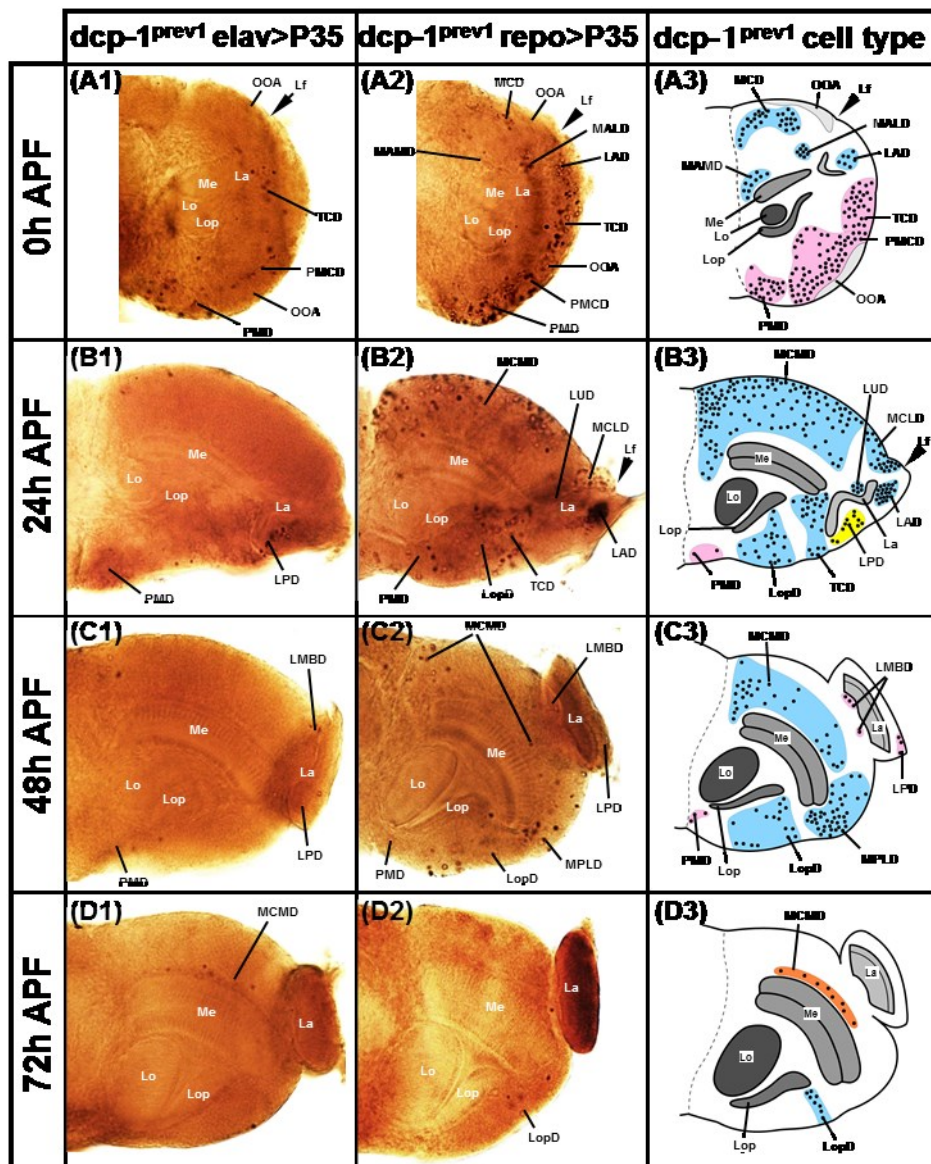


図 3 2 *dcp-1^{prev1}* 変異体に見られる死細胞の種類

dcp-1^{prev1} 変異体において、*elav-GAL4>UAS-p35* で神経特異的(A1)-(D1)、*repo>UAS-p35* でグリア細胞特異的(A2)-(D2)にアポトーシスを阻害した。(A3)-(D)は模式図

死細胞 クラスター名	視細胞クラスターを 構成する死細胞種	死細胞の有無			細胞種毎に必要とされる 実行カスパーゼ
		WT	<i>drICE</i> ^{Δ1}	<i>dcp-1</i> ^{prev1}	
LAD,MALD	神経細胞	○	×	○	<i>drICE</i> (<i>drICE</i> ¹⁷ & <i>dcp-1</i>)
	グリア (or 他の細胞種)	○	×	×	<i>drICE</i> & <i>dcp-1</i>
LPD	神経細胞	×	○	○	不明
	グリア細胞	○	○	○	<i>drICE</i> or <i>dcp-1</i>
LUD	神経細胞	○	○	○	<i>drICE</i> or <i>dcp-1</i>
	グリア (or 他の細胞種)	○	×	×	<i>drICE</i> & <i>dcp-1</i>
LMBD,MCLD, MCD,MAMD, MPLD, LopD	神経細胞	○	○	○	<i>drICE</i> or <i>dcp-1</i>
TCD, PMCD	神経細胞	○	○	○	<i>drICE</i> or <i>dcp-1</i>
	グリア	○	×	○	<i>drICE</i>
MCMD	神経細胞	○	○	○	<i>drICE</i> or <i>dcp-1</i>
	不明の細胞種(二重変異のみ)	?	?	?	Neither <i>drICE</i> nor <i>dcp-1</i>
PMD	神経細胞	○	○	○	<i>drICE</i> or <i>dcp-1</i>
	グリア細胞	○	×	○	<i>drICE</i>
	不明の細胞種(二重変異のみ)	?	?	?	Neither <i>drICE</i> nor <i>dcp-1</i>

図 3 3 各クラスターの死細胞種と細胞死に必要な実行カスパーゼのまとめ

○：死細胞が存在する。×：死細胞が存在しない。

？：不明の細胞種は二重変異体のみで観察され、他の遺伝子型では識別できない。

第3章 死細胞除去における実行カスパーゼの機能解析

1. 背景と目的

これまでの研究で、実行カスパーゼの変異体では死細胞が野生型より蛹後期まで観察されることが分かった(図23 (A))。すなわち、*drICE^{Δ1}* 変異体では死細胞数のピークが 36h APF で野生型より遅く、その時の死細胞数も野生型より多かった。その後急速に減少するものの、48h APF でも野生型と比べて依然として多く、死細胞数はその後緩やかに減少するが 72h APF になっても野生型よりはるかに多くが残存していた。*dcp-1^{prev1}* 変異体では 24h APF のピークまでの死細胞数は野生型とほぼ同じであったが、36h APF 以後の減少の程度がやや緩慢で 48h APF でも野生型より有意に多い死細胞が残存していた。さらに、*drICE¹⁷* 変異体でも蛹後期まで多くの死細胞が残存していた。このような後期にまで観察される死細胞の原因の一つとして、本研究ではじめて死細胞除去不全の可能性が考えられた。そこで、*drICE^{Δ1}* 変異体と *dcp-1^{prev1}* 変異体、*drICE¹⁷* 変異体における死細胞除去活性を直接調べ、その可能性を検討した。ライソトラッカー染色は神経切断後の軸索除去活性や成虫盤におけるリソゾームの関与する死細胞除去活性の検出に用いられてきた (Watts *et al.*, 2004; Ziegenfuss *et al.*, 2012; Ozge *et al.*, 2014) (図34)。そこで、本研究では視葉細胞死における死細胞除去活性をライソトラッカー染色で直接的に検出した。

2. 材料と方法

2-1. ライソトラッカー染色および抗体染色

食食による死細胞除去活性を検出するためライソトラッカー染色を行った。PBS 中で解剖し、CNS (central nervous system)を取り出し、Lysotracker (Lysotracker Red DND-99, Invitrogen/Molecular Probes, Tokyo, Japan) 溶液(0.02% Lysotracker in PBS (v/v))中に 30 分置き、PBS で洗浄後、4%ホルムアルデヒドで 20 分間固定し、PBS-Tx (0.3% Triton-X 100 in PBS(v/v))で 30 分洗浄した。この CNS を 5% normal goat serum を含む PBS-Tx で 30 分ブロッキングし、一次抗体の抗 DE-cadherin ラット抗体(DE-Cad) (Oda *et al.*, 1994)と抗 Repo マウス抗体(8D12 anti-Repo)(Alfonso and Jones, 2002)を各々1:20 濃度と 5%normal goat serum を含む PBS-Tx で一晩 4℃でインキュベートした。これらのサンプルを PBS-Tx で一時間洗浄後、5% normal goat serum を含む PBS-Tx で 30 分ブロッキングし、二次抗体の抗マウス IgG ヤギ抗体 Texas Red (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA)と抗ラット IgG ヤギ抗体 Cy5 (Biological Detection Systems, Inc., Pittsburgh, PA)を各々1:100 濃度と 5%normal goat serum を含む PBS-Tx で 5 時間、25℃でインキュベートした。これらのサンプルを PBS-Tx で一時間洗浄後、80%グリセリン(蛍光顕微鏡用, MERCK, Darmstadt)中に包埋した。イメージングは LSM710 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen)を用いて行った。取得した画像は Zen2009 light edition (Carl Zeiss, Oberkochen)と Photoshop (Adobe, San Jose)を用いて調整した。

2-2. 実験用個体の作製

野生型のショウジョウバエとして Canton-S を用いた。*drICE^{Δ1}/ drICE^{Δ1}* は、*drICE^{Δ1}/ TM3-Ser-GFP* 雌雄を交配して作製した。*dcp-1^{prev1}/ dcp-1^{prev1}* は、*CyO-GFP/ dcp-1^{prev1}* 雌雄を交配して作製した(図20 ②、④)。*drICE* のノックダウン系統として、*UAS-drICE IR* (HMS00398 NIG-FLY)を用いた。*elav-GAL4; +; UAS-drICE IR* は、*elav-GAL4; +; +*雌と*+Y; +; UAS-drICE IR* 雄を交配して作製した。*repo-GAL4/ UAS-drICE IR* は、*+/+; +; repo-GAL4/ TM3-Ser-GFP* 雌と*+Y; +; UAS-drICE IR* 雄を交配して作製した。*drICE¹⁷/ drICE¹⁷* は、*drICE¹⁷/ TM3-Ser-GFP* 雌雄を交配して作製した(図21)。

2-3. qPCR を用いた *drICE* mRNA 量の測定

成虫頭部(羽化後 0h から 6h)の口吻を除去し、TRIzol LS Reagent (life technologies Japan, Tokyo, Japan) 中でホモジナイズし、illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を用いて RNA を抽出した。PrimeScript RT regent Kit with gDNA Eraser (Takara Bio, Otsu, Japan)を用いて cDNA を合成した。qPCR を GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA) と Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara Bio, Otsu, Japan)を用いて行った。*drICE* mRNA の相対量は *Actin42A* mRNA の量を基準として (Ponton *et al.*, 2011) 計算して求めた。野生型サンプル中の *drICE* cDNA を用いて作製した検量直線から *elav> drICE IR* サンプル中の *drICE* cDNA 量を求めた。野生型サンプル中の *Actin42A* cDNA を用いて作製した検量直線から *elav> drICE IR* サンプル中の *Actin42A* cDNA 量を求めた。こうして求めた *elav>drICE IR* サンプル中の *drICE* cDNA 量を *elav> drICE IR* サンプル中の *Actin42A* cDNA 量で除して、野生型頭部の *drICE* mRNA 量を 1 とした時の *elav> drICE IR* 頭部の *drICE* mRNA の相対量を求めた。

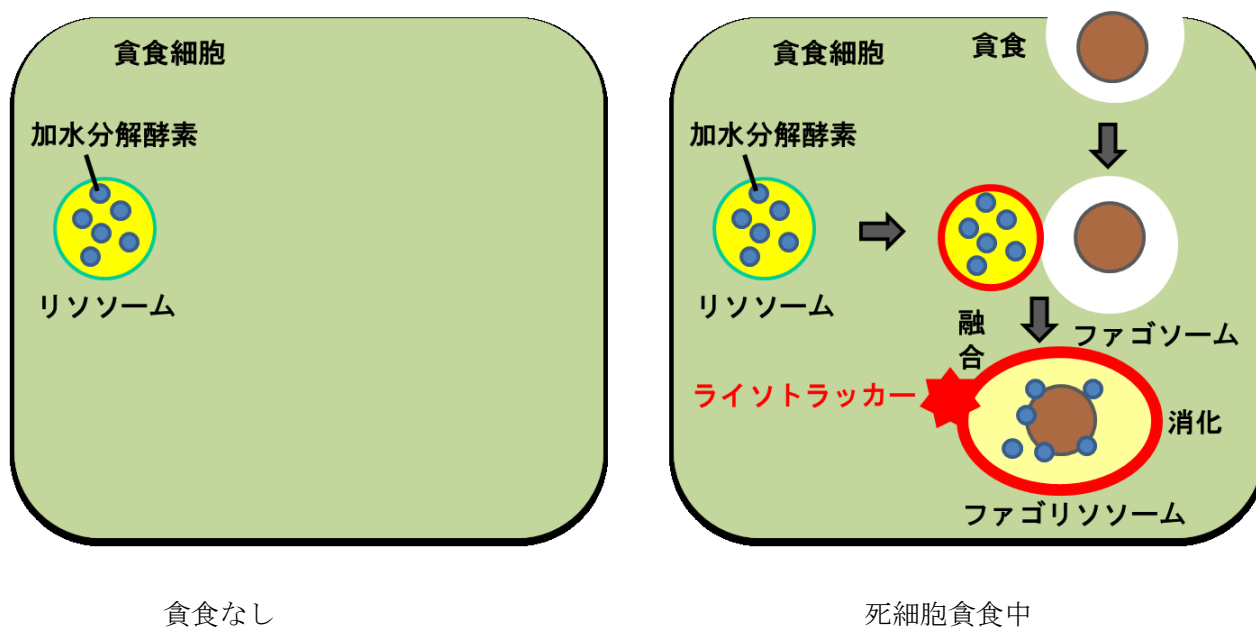


図 3 4 ライソトラッカーについての説明

死細胞は、貪食細胞により飢食され、ファゴソームとなる。

ファゴソームは加水分解酵素を持つリソソームと融合し、ファゴリソソームとなる。

ライソトラッカーはファゴリソソームを検出する染色剤である。

3. 結果

3-1. 野生型における死細胞除去活性

野生型では、0h APF と 12h APF には死細胞クラスターが存在する全ての領域(LAD、MALD、MAMD、MCD、TCD、PMCD、PMD、LPD、MCLD、MCMD)にライソトラッカー染色が見られた(図35 A1-B1)。蛹中期および後期ではライソトラッカー染色は死細胞クラスターの分布領域とほぼ重なり、その集積度も似ていた。24h APF では死細胞クラスターが存在する全ての領域(LAD、LPD、LUD、MCLD、MCMD、TCD、LopD、PMD)でライソトラッカー染色が見られた(図35 C1)。染色の分布状態も死細胞クラスターが集積している領域では集積し(LAD、LUD、MCLD)、散在している領域では散在して見られた。さらに36h APF では、死細胞クラスターが存在する領域の内 LPD 以外の領域(LMBD、MCMD、MPLD、LopD、PMD)でライソトラッカー染色が見られた(図35 D1)。染色分布状態も死細胞クラスターが集積している領域では集積し(LMBD、MPLD)、散在している領域では散在して見られた。48h APF では多数の死細胞の集積が見られる MPLD だけで染色が見られた(図35 E1)。72h APF にはライソトラッカー染色は全く見られなくなった(図35 F1)。したがって、死細胞クラスターでは、リソソームの関与する死細胞除去がさかんに行われることがわかった。死細胞の存在しない領域および時期には死細胞除去活性が殆どないことがわかった。

3-2. *drICE* における死細胞除去活性

3-2-1. *drICE*^{Δ1} 変異体における死細胞除去活性

drICE^{Δ1} 変異体では 0h APF と 12h APF には、死細胞クラスターの存在する領域の殆どで(MCD、MAMD、TCD、PMCD、PMD、MCLD、MCMD)、ライソトラッカー染色が見られたが、そのシグナルは野生型より弱かった(図35 A2-B2)。死細胞が存在しない LAD と MALD、LPD 領域では染色はなかった(図35 A2-B2)。24h APF では、死細胞クラスターの存在する殆どの領域でライソトラッカー染色が見られたが、MCLD 領域では野生型で見られるような集積したシグナルは見られず(図35 C2,G1-G2)、TCD 領域でも野生型と比べ大幅に少なかった(図35 C2)。また、LPD と PMD では多くの死細胞が存在するにも関わらず、染色は見られなかった(図28 C2、図35 C2)。死細胞が全く、あるいは殆ど存在しない LAD、LUD、LopD 領域ではライソトラッカー染色がみられなかった(図35 C2,G1-G2)。36h APF には、多くの死細胞が集積する MPLD、LMBD 領域でわずかな染色が見られたが、野生型に見られるような集積した染色は見られなかった(図35 D2, H1-H2)。MCMD、TCD 領域ではごく少数の染色が散在して見られた(図35 D2)。LopD は野生型と同程度の死細胞が存在するが、わずかな染色しかなかった(図35 D2, H1-H2)。LPD、PMD は野生型より多くの死細胞が存在するが染色は見られなかった(図28 D2、図35 D2)。48h APF には野生型とは異なり多くの死細胞が存在するにも関わらず、染色は殆ど見られず、MPLD 領域にわずかな染色が見られただけだった(図35 E2, I1-I2)。72h APF でも野生型と異なりかなりの死細胞が存在するにも関わらずライソトラッカー染色が見られなかった(図35 F2)。以上の結果を図38にまとめた。*drICE*^{Δ1} 変異体では 0h APF から 36h APF までの多くの死細胞クラス

ターにおいてリソソームの関与する死細胞除去活性が野生型より弱く、一部の死細胞クラスターにおいて死細胞除去活性が無かった。また、48h APF、72h APF には死細胞が多く残存するにも関わらず、細胞死除去活性は見られなかった。これは、*drICE*^{Δ1} 変異体における 36h APF での大幅な死細胞数の増加と、蛹後期の死細胞の残存が、死細胞の除去不全による蓄積によることを示している。

3-2-2. *drICE* ノックダウンによる死細胞除去の解析

上記の実験により、*drICE* が死細胞除去活性化に重要な役割を持つことが示唆された。この *drICE* による死細胞除去活性化が細胞自律的な現象であることを証明するため、神経細胞とグリア細胞で特異的に *drICE* mRNA をノックダウンし、TUNEL 染色後に死細胞数を計数し、神経細胞特異的あるいはグリア細胞特異的に死細胞の除去が阻害されるかどうかを調べた。神経細胞で *drICE* IR を強制発現させると、多数の死細胞が 48 h APF に残存したが (図36 (A)、(B) a, b)、グリア細胞で発現させると死細胞数は野生型程度であった (図36 (A)、(B) c, d)。この結果は神経の死細胞除去に *drICE* が細胞自律的にはたらくことを示している。

また、*drICE* mRNA が確かに神経でノックダウンされているかどうかを直接的に調べるため、qPCR を用いて、成虫頭部 (0 day) における *drICE* mRNA 量の相対量を *elav > drICE* IR ハエと野生型ハエで比較した (図36 (C))。その結果 *elav > drICE* IR ハエで *drICE* mRNA 量の相対量は野生型の 37% となり、上記の実験結果の信頼性が示された。

3-3. *dcp-1*^{prev1} 変異体における死細胞除去活性

dcp-1^{prev1} では 0h APF から 24h APF まで野生型と同程度のライソトラッカー染色が見られた (図35 A3-C3)。36h APF では、野生型と同様の領域にライソトラッカー染色が見られたが、野生型のような集積したシグナルは見られず、シグナルが弱かった (図35 D3)。48h APF では、野生型と同様に MPLD 領域に集積した染色が見られた。また、この変異体で死細胞が残存する、前方 LMBD、MCMD でも染色が見られた (図35 E3)。72h APF では野生型と同様に全ての死細胞クラスターで染色が見られなかった (図35 F3)。以上の結果から、*dcp-1*^{prev1} では野生型とほぼ同様の死細胞除去活性が見られた。しかし、36h APF でライソトラッカー染色が弱かったことは、この時期の一定の死細胞除去不全が 48h APF における死細胞の残存の原因となっていることを示唆している (図26)。しかし、48h APF で残存する死細胞クラスターにおいて、死細胞除去活性が見られ、72h APF には死細胞はほぼ消失することから、この死細胞除去不全は軽いと考えられる。

3-4. *drICE*¹⁷ 変異体における死細胞除去活性

ラミナ領域では、0h APF から 72h APF まで一貫してライソトラッカー染色はなかった (図37 A-F)。特に 24h APF の LAD と LUD、24h APF ~ 72h APF の LPD では多数の死細胞があるにも関わらず、ライソトラッカー染色がなかった (図37 C-F)。したがってラミナ領域では *drICE*¹⁷ は、細胞死実行活性を持つにも関わらず、死細胞除去活性化機能は持たないこ

とがわかった。

メダラ皮質、T/C、ロビュラプレート皮質では、0h APF に死細胞クラスター(MALD、MAMD、MCD、TCD、PMCD、PMD)が存在する領域全てでライソトラッカー染色が見られた(図37 A)。12h APF でも死細胞クラスターが存在する領域の内、MCLD、MCMD、TCD、PMD でライソトラッカー染色が見られたが、MALD の領域での染色はなかった(図37 B)。24h APF では、死細胞が存在する領域の内、MCLD、MCMD、TCD でライソトラッカー染色が見られ、LopD、PMD では見られなかった(図37 C)。36h APF では、死細胞が存在する領域の内、LMBD、MCMD、MPLD、LopD で染色が見られたが、TCD、PMD では見られなかった(図35 D)。48h APF では死細胞が存在する領域の内、MPLD だけで染色が見られ、LMBD、MCMD、TCD、LopD、PMD で染色が見られなかった(図37 E)。72h APF では死細胞が存在する領域の全て(LMBD、MCMD、MPLD、TCD、LopD、PMD)で染色が見られなかった(図37 F)。まとめると、メダラ皮質、T/C、ロビュラプレート皮質では、*drICE*¹⁷ 変異体では 36h APF までは多くの領域で死細胞除去活性が見られたが、一部の領域では死細胞除去活性が見られなかった。48h APF 以後は多数の死細胞が残存しているにも関わらず、関係する殆どの領域での死細胞除去活性は見られなかった。したがって *drICE*¹⁷ 変異体は死細胞除去は行うがそのレベルはかなり低いことが明らかになった。

4. 考察

drICE^{Δ1} 変異体では死細胞の存在域における死細胞除去活性は、初期・中期には弱く、後期には観察されなかった。したがって、*drICE*^{Δ1} 変異体では死細胞除去活性は見られるが、そのレベルは低いことがわかった。*drICE*¹⁷ 変異体では、ラミナ領域では後期まで多数の死細胞が存在するにも関わらず、死細胞除去活性は全く見られなかった。またその他の領域では、初期・中期には死細胞の存在領域の殆どで弱い死細胞除去活性が見られ、後期には多くの死細胞が存在するにも関わらず、死細胞除去活性は見られなかった(図24、図29 D1-F1)。したがって、*drICE*¹⁷ 変異体では死細胞除去活性は見られるが、そのレベルは低いことがわかった。これにより *drICE* は視葉細胞死において死細胞除去活性化機能を持つことが示された。

drICE^{Δ1} 変異体では、細胞死は *dcp-1* で実行され、多くの死細胞が観察されるが、*drICE* 活性がないために、多くの死細胞が除去されずに蓄積し、その結果 *drICE*^{Δ1} 変異体では、野生型より細胞死のピークが遅れ、しかもその時の死細胞数が野生型より多くなったと考えられる。さらに死細胞除去不全のため、後期まで多く死細胞が残ったと考えられる。また、*drICE*¹⁷ 変異体では、細胞死は *dcp-1* と活性の低下した *drICE*¹⁷ で行われ、多数の死細胞が生じる。しかし、*drICE*¹⁷ の死細胞除去活性は低いために野生型よりはるかに多くの死細胞が蓄積し、後期まで残存すると考えられる。

これまでの研究では実行カスパーゼが細胞死にはたらくという報告はされてきたが、実行カスパーゼが死細胞除去にはたらくという報告はない。本研究では、変異体における死細胞数の時間的変化および、ライソトラッカー染色による死細胞除去活性の直接的検出により、*drICE* が視葉細胞死において死細胞除去活性を持つことをはじめて示した。しかも、

この死細胞除去活性は死細胞自律的にはたらくことが、はじめて示された。この結果は細胞死における *drICE* の役割の理解に大きな貢献をされると考えられる。一方 *dcp-1^{prev 1}* では、大きな死細胞除去不全は見られず、本研究では *dcp-1* の死細胞除去活性を示すことはできなかった。

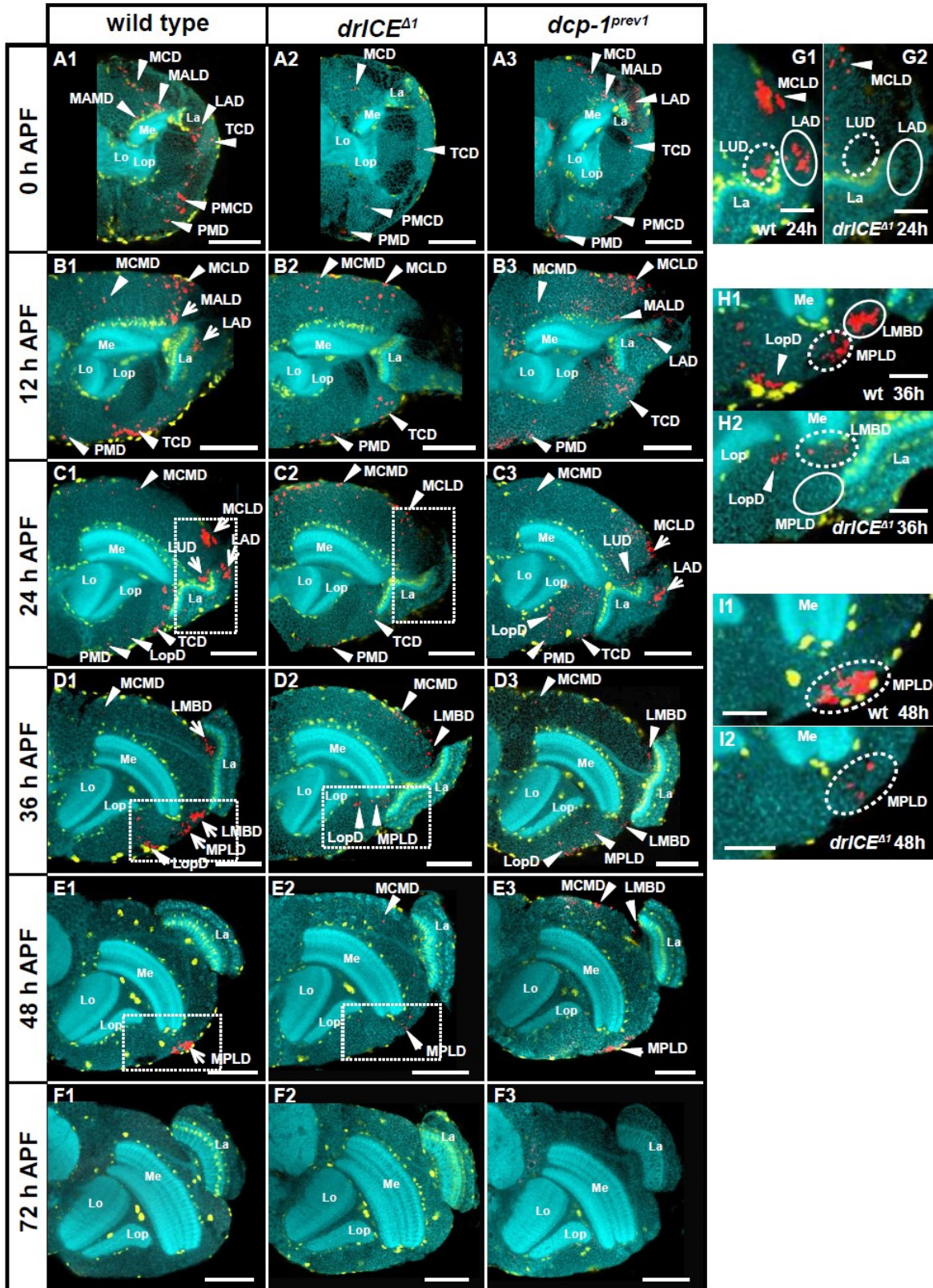


図35 *drICE Δ 1* 変異体、*dcp-1^{prev1}* 変異体のライトトラッカー染色による死細胞除去活性の解析

赤は lysotracker、青は anti-N-Cadherin、黄色は anti-Repo の各抗体によるシグナルである

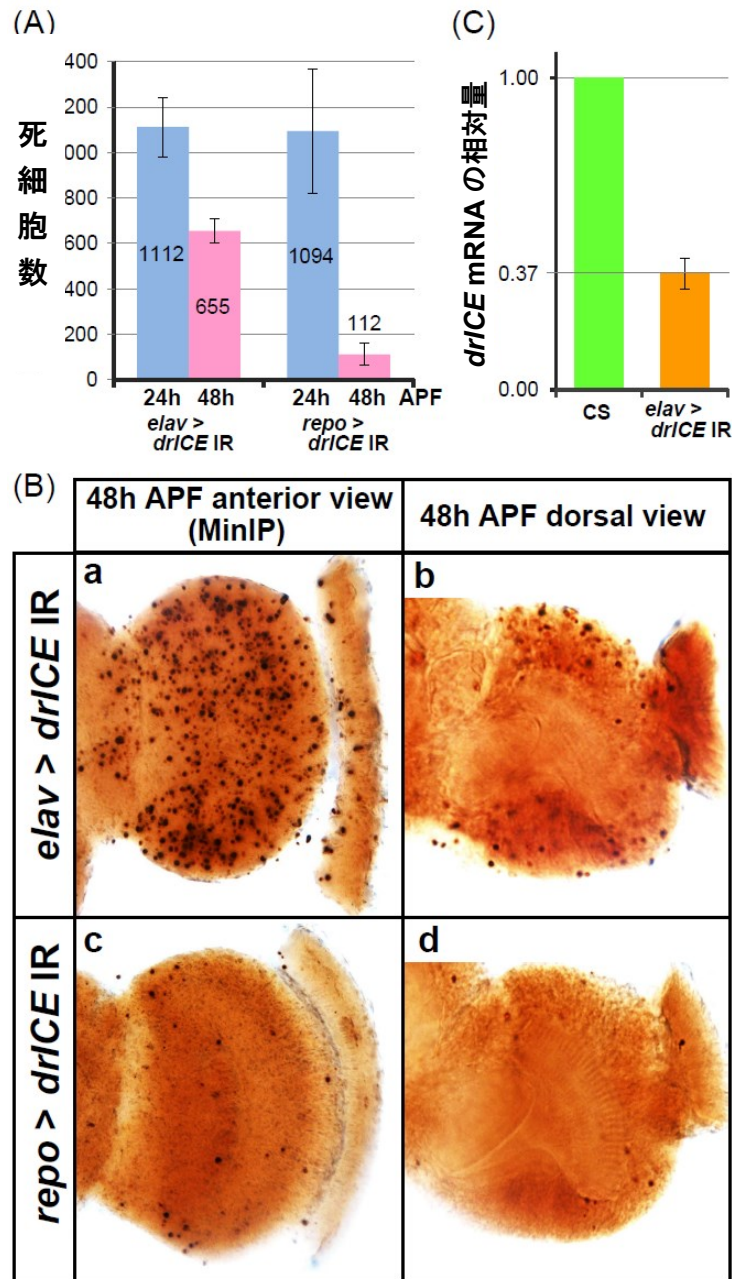


図 3 6 死細胞除去における *drICE* ノックダウンの作用

drICE を神経特異的(*elav > drICE IR*)、グリア細胞特異的(*repo > drICE IR*)にノックダウンした。

(A) 神経細胞、グリア細胞特異的に *drICE* をノックダウンした個体の視葉死細胞数

視葉全体の TUNEL 陽性死細胞数。*elav > drICE IR* では死細胞数が野生型より多かった。バーは標準偏差。

(B) 神経細胞、グリア細胞特異的に *drICE* をノックダウンした視葉の死細胞分布

48 h APF における TUNEL 陽性死細胞の画像。a と c は背側からの集積画像。b と d は背側からの一切片画像。*elav > drICE IR* で多数の死細胞が見られた。

(C) 神経細胞特異的に *drICE* をノックダウンした個体頭部の *drICE* mRNA 量の相対量

qPCR を用いて、成虫頭部 (0 day) における *drICE* mRNA 量の相対量を *elav > drICE IR* ハエと野生型ハエで比較した。ハウスキーピング遺伝子 *Actin 42 A* (Ponton *et al.* 2011) mRNA を基準とした。*elav > drICE IR* で *drICE* は有効にノックダウンされていた。バーは標準偏差。

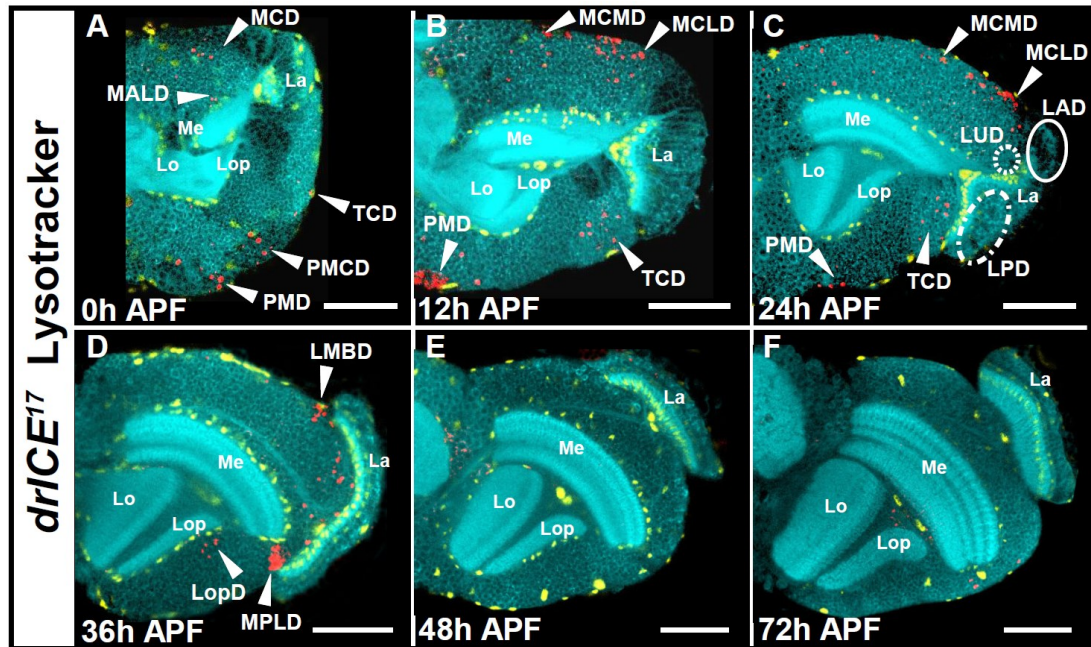


図37 *drICE*¹⁷ 変異体と *dcp-1*^{prev1}; *drICE*¹⁷ 変異体の死細胞クラスターと死細胞除去活性の解析

*drICE*¹⁷ 変異体のライソトラッカー染色。赤は lysotracker、青は anti-N-Cadherin、黄色は anti-Repo の各抗体によるシグナルである。

region		Lamina		Lamina-Medulla boundary			Anterior				Posterior				
APF	cluster	LAD	LPD	MALD	LUD	LMBD	MCLD	MCD	MAMD	MCMD	MPLD	TCD	PMCD	LopD	PMD
wild type	0h	L		L				L	L			L	L		L
	12h	L		L			L			L		L			L
	24h	L			L		L			L		L		L	L
	36h					L				L	L			L	
	48h										L				
	72h														
drICE $\Delta 1$	0h							I				I	I		I
	12h						I			L		I			I
	24h						I			L		I			I
	36h					I				L	I			I	
	48h									I	I				
	72h														
dcp-1 ^{pvev1}	0h	L		L				L				L	L		L
	12h	L		L			L			L		L			L
	24h	L			I		I			L		I		L	L
	36h					I				L	I			I	
	48h					I				I	L				
	72h														
drICE ¹⁷	0h			I				I				I	I		L
	12h						L			L		I			L
	24h						I			I		I			I
	36h					I					L			I	
	48h														
	72h														

図 3 8 各クラスターにおけるライソトラッカーのまとめ

水色: 野生型で TUNEL 陽性死細胞が見られるクラスター。オレンジ色: 野生型には TUNEL 陽性細胞が見られないが、変異体には見られるクラスター。L: ライソトラッカーシグナルが見られるクラスター。I: 少数のライソトラッカーシグナルが見られるクラスター。

総合考察

本研究では、発生中のショウジョウバエの視葉における細胞死と、その後の死細胞除去における実行カスパーゼ *drICE* と *dcp-1* の役割について解析した。

実行カスパーゼはショウジョウバエの細胞死カスケードにおいて最も重要な因子である。しかしながら、ショウジョウバエの発生中の CNS の細胞死に関する研究は多数あるが (Fischbach and Technau, 1984; Kimura and Truman, 1990; Klambt *et al.*, 1991; Truman *et al.*, 1992; Robinaw *et al.*, 1993; Awad and Truman, 1997; Nakano *et al.*, 2001; Novotny *et al.*, 2002; Bello *et al.*, 2003; Lundell *et al.*, 2003; Miguel-Aliaga and Thor, 2004; Kimura *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006; Page and Olofsson, 2008; Rogulja-Ortmann *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Winbush and Weeksk, 2011)、ショウジョウバエの神経細胞死における実行カスパーゼの役割についての研究は少い (Lee *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013) (表2)。vCrz neurons では、*drICE* と *dcp-1* は細胞死実行に協同的に働き、時間通りに全ての vCrz neurons の細胞死を行う (Lee *et al.*, 2010) (表2)。vCrz neuron の細胞死は *drICE* と *dcp-1* が欠失すると完全抑制される。しかし、*dcp-1* は必須ではなく、*dcp-1* 変異体では細胞死が遅れるだけである。*drICE* 変異体では細胞死は完全に抑制されるが、vCrz neurons の数は発生の進行に伴い徐々に減少する。bursCCAP neurons では *drICE* は重要な実行カスパーゼとしてはたらくが、単独では細胞死には不十分である (Lee *et al.*, 2013)。*dcp-1* 変異体では bursCCAP neurons の細胞死はほぼ正常に起こる。これらの結果は *drICE* と *dcp-1* は vCrz neurons と bursCCAP neurons の細胞死には機能重複的にはたらくが、*drICE* の役割は *dcp-1* より重要であることを示唆している。

本研究では、*drICE* と *dcp-1* は発生中の視葉において重要な実行カスパーゼであることを示した。多くの死細胞クラスターにおいて殆どの神経細胞死には *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要とし、これらの遺伝子はこれらの神経細胞では重複的に機能する (図33)。これは vCrz neurons (Lee *et al.*, 2010) と bursCCAP neurons (Lee *et al.*, 2013) の場合と同じである。しかし、発生中の視葉には他の種類の神経細胞が存在する。少数の死細胞クラスターでは殆どの神経細胞は細胞死に *drICE* を必要とした (図33)。これらの神経細胞では *dcp-1* の必要性は潜在的で複雑である。*dcp-1* は正常なレベルの *drICE* の活性がある場合は必要とされないが、変異により *drICE* の活性が弱い場合は必要とされた (図39)。さらに、細胞種は同定されていないが、ごく少数の死細胞クラスターでは *drICE* と *dcp-1* のいずれも必要としない少数の細胞死が存在した。これらのデータは *drICE* と *dcp-1* は視葉細胞死において重要な役割を持つが、厳密なカスパーゼの必要性は状況依存的であり、神経集団やもう一方のカスパーゼの活性に依存して変化することを示している。

さらに、一部の死細胞クラスターのグリア細胞死に対するカスパーゼの必要性は神経細胞とは異なっていた。神経細胞で構成される多くの死細胞クラスターでは、全ての神経細胞は *drICE* と *dcp-1* の両方を必要とした (図33)。しかし、神経細胞とグリア細胞の両方で構成される一部の死細胞クラスターでは、細胞死に必要なカスパーゼは神経細胞とグリア細胞で異なっていた。一部の死細胞クラスターでは、神経細胞は *drICE* だけを細胞死に必要としたが、グリア細胞は *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要とした。他の死細胞クラスターでは、神経細胞は *drICE* か *dcp-1* のいずれかを必要としたが、グリア細胞は *drICE* だけ

を細胞死に必要とした。したがって、カスパーゼの必要性は同じ死細胞クラスターでも神経細胞とグリア細胞で異なるが、それは神経細胞やグリア細胞といった細胞種に特有なものではないと言える。これにより、グリア細胞死におけるカスパーゼの必要性もまた状況依存的で神経細胞とは異なる方法で制御されていると言える。

本研究における二つ目の注目すべき発見は、カスパーゼの死細胞除去に対する役割である。先行研究により実行カスパーゼは細胞死実行後の死細胞除去の活性化に重要な役割を持つことが示唆されてきた。例えば、哺乳類とセンチュウの研究では **eat-me** シグナルの一つは細胞膜外に露出したホスファチジルセリン(PS)であり、露出を触媒する酵素(CED-8/xkr8)が実行カスパーゼによって活性化されることが示されている(Suzuki *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013) (図41)。ショウジョウバエでも、この酵素の候補のホモログの存在が報告されたが(Stanfield and Horvitz, 2000)、死細胞除去に対するその役割はまだ、明らかにされていない(図41)。最近、Shklyar, *et al.* (2013)は生存細胞でPSが露出しても貪食されないことから貪食にはPS以外の因子が必要であると述べた(図41)。細胞死とそれに続く死細胞除去の活性化が死細胞でどのように制御されるのかは解明されるべき重要課題である。

本研究では、細胞死実行に加え、**drICE**と**dcp-1**の死細胞除去の活性化に対する重要性を初めて示した(図40)。**drICE^{Δ1}**変異体の視葉を用いた結果から、**drICE^{Δ1}**変異体バックグラウンドでは、ある細胞では**dcp-1**は細胞死実行後に死細胞除去を活性化できるが、一方、別の細胞では細胞死を起こしても、**dcp-1**は死細胞除去を活性化できないことが示唆された。これらのデータは、死細胞の除去は細胞死実行とは独立した径路で制御され、実行カスパーゼが細胞死を実行した場合でも死細胞の除去活性化は不十分である場合があることを意味している。この考えはまた、**drICE¹⁷**変異体を用いた細胞死実行と死細胞除去の解析によっても支持された。この変異体バックグラウンドでは、**drICE¹⁷**による低いDrICE活性と通常のDcp-1活性がLAD領域の細胞死を実行するが、死細胞除去には不全であった(図38、図39)。**dcp-1^{prev1}**変異体バックグラウンドでは、野生型**drICE**遺伝子は細胞死を実行した全ての死細胞で、除去を活性化することができるが、野生型**dcp-1**遺伝子と**drICE¹⁷**変異遺伝子は、細胞死実行後に除去できる場合もあるが、出来ない場合もあることを示した(図38)。これらの結果から、死細胞除去には細胞死実行より強いカスパーゼ活性が必要とされるのかも知れない(図40)。実行カスパーゼの死細胞除去におけるはたらきとしては、死細胞から発現されるイートミーシグナルの活性化あるいはDNA分解に引き続き起こるアポトーシス小体の形成などが考えられる。したがって、今後は**drICE**のイートミーシグナルの活性化やアポトーシス小体形成における**drICE**の役割の研究が死細胞除去研究に重要となると考えられる。

表 2 *drlCE* と *dcp-1* の細胞死実行に関する先行研究まとめ

実行カスパーゼの必要性	これまでの研究で明らかになった実行カスパーゼ細胞死に働く組織
<i>drlCE</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 胚期発生中の胚の正中線グリア Muro et al. (2006) ・ 蛹期の複眼の個眼間細胞 Muro et al. (2006) ; Xu et al. (2006) ・ 胚期の細胞 Xu et al.(2006) ・ X線照射した翅原基 Lee et al. (2010)
<i>dcp-1</i>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 飢餓下での卵巣の細胞死 Peterson et al. (2003)
<i>drlCE</i> か <i>dcp-1</i> のいずれか	<ul style="list-style-type: none"> ・ 胚期少数の細胞 Xu et al.,(2006) ・ 羽化後の bursCCAP neurons Lee et al. (2013) ・ 変態初期の VCrz neurons Lee et al. (2010)
<i>dcp-1</i> が <i>drlCE</i> の活性や局在に働く	<ul style="list-style-type: none"> ・ 飢餓誘導の中期卵形成中の卵室の<i>DrlCE</i> の局在Laundrie et al.(2003) ・ X線照射した翅原基の細胞死における<i>DrlCE</i> の適切な時期での活性化 Florentin and Arama (2012)

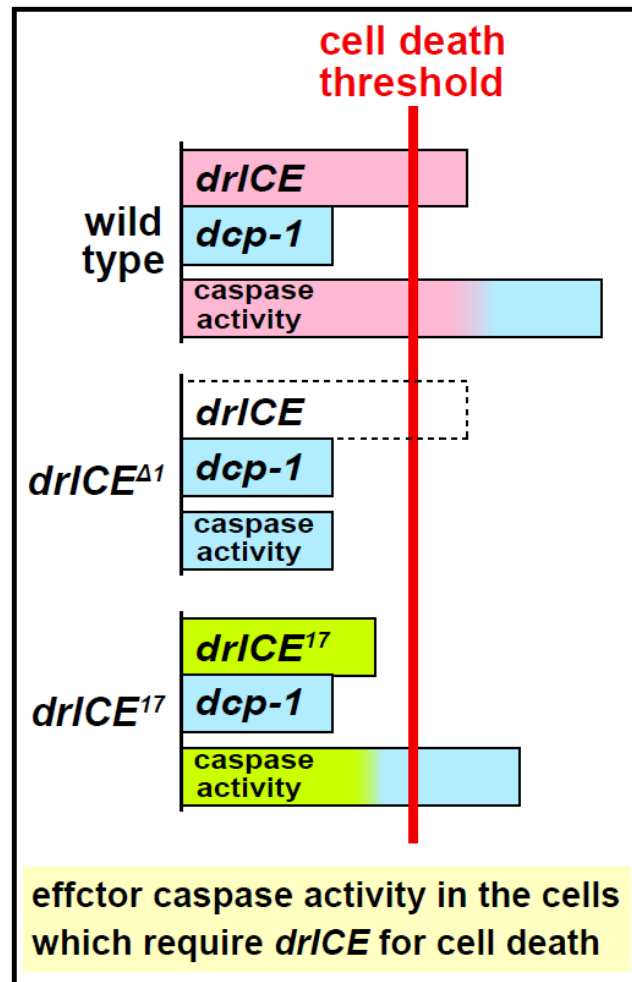


図 3 9 LAD の細胞死における *dcp-1* の必要性

上段のバー(ピンクあるいは緑)が *drICE* の活性、中段のバー(青)は *dcp-1* の活性、下段のバーは *drICE* の活性と *dcp-1* の活性の合計を示す。LAD で *drICE* と *dcp-1* の両方の活性が存在し、*drICE* の活性が *dcp-1* より高い場合、細胞死における *dcp-1* の必要性は *drICE* 活性の強さの違いで変化することがある。この場合、野生型では、細胞死に *drICE* が必要であるが、*dcp-1* は必要でない。*drICE*^{Δ1} 変異体では、細胞死は起こらない。*drICE*¹⁷ 変異体では、*drICE*¹⁷ と *dcp-1* の両方が必要となる。

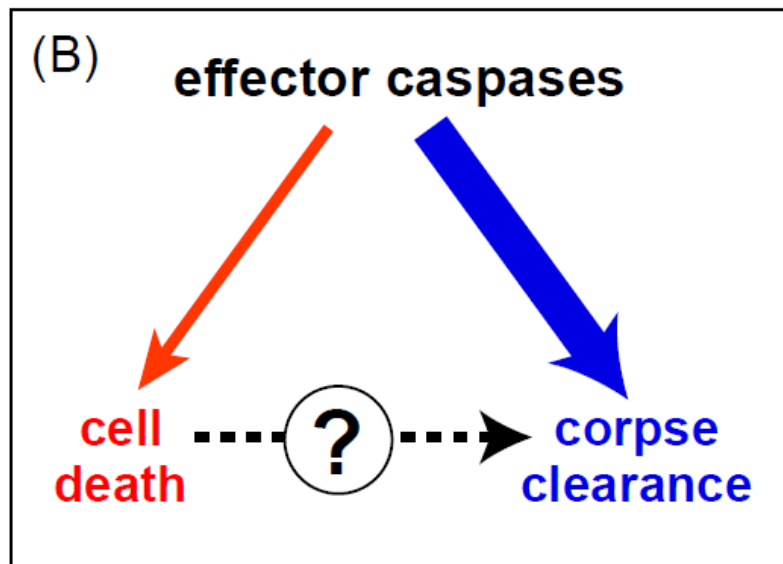
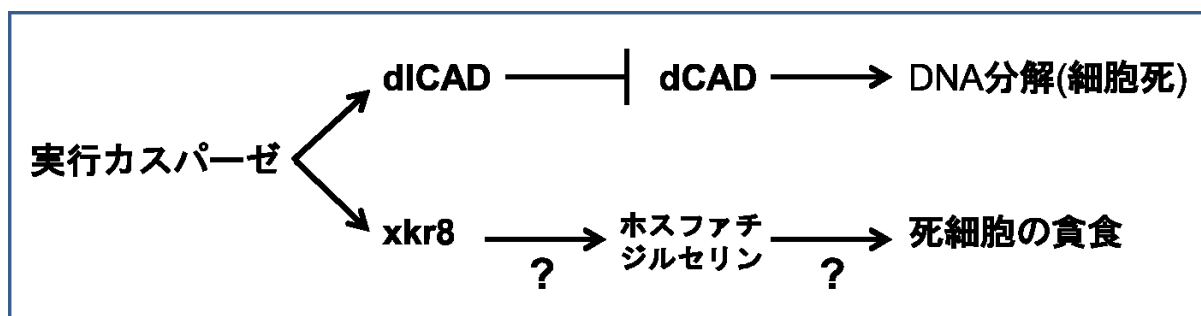


図 4 0 実行カスパーゼが働く細胞死実行と死細胞除去の関係模式図

実行カスパーゼは細胞死の実行と死細胞除去に独立してはたらく。細胞が実行カスパーゼの作用で死んでも死細胞は除去されない場合がある。ある種の実行カスパーゼ変異体では、細胞死が実行されても必ずしも死細胞除去は起こらない。この変異体では、低い実行カスパーゼ活性により細胞死が実行される。しかし、その活性は死細胞除去には不十分で、その結果、死細胞除去不全が起こる。死細胞除去には細胞死実行より強い実行カスパーゼ活性を必要とすると考えられる。



実行カスパーゼの貪食関与に関する報告

研究内容	論文著者
<i>dICE</i> がカスパーゼ依存性DNA分解酵素(dCAD)の阻害因子(dICAD)を切断・不活化する	Mukae <i>et al.</i> , 2000
ハエのホスファチジルセリンの外転酵素を報告	Stanfield & Horvitz, 2000
ファゴサイトによる死細胞除去にカスパーゼが関与	Shklyar, <i>et al.</i> , 2013
ホスファチジルセリン露出に実行カスパーゼが働く	Suzuki <i>et al.</i> , 2013; Chen <i>et al.</i> , 2013

図 4 1 実行カスパーゼが細胞死の実行のほかに死細胞におけるイートミーシグナルの露出を活性化する先行研究

活性化された実行カスパーゼが、DNA 分解酵素 dCAD の抑制因子 dICAD を分解し、その結果 DNA の分解が起こる。また、活性化された実行カスパーゼがイートミーシグナル(ホスファチジルセリン)の露出に関係する因子(xkr8)を活性化することにより死細胞の貪食を引き起こすことが、マウスとセンチュウで報告された。しかし、ショウジョウバエにおいては、その因子のホモログの存在は報告されているが、機能はまだ証明されていない。

謝 辞

本研究を行うにあたり、これまでの全ての研究活動において多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました辻村秀信准教授に厚く御礼申し上げます。また、博士課程における研究活動において多くのご指導を頂いた岩淵喜久男教授、平岡毅准教授に厚く御礼申し上げます。さらに、困難な時期を支えて下さった応用昆虫学のメンバーの皆様、実験にご協力下さいました福原敏行教授、森山裕充准教授、佐藤俊幸准教授、小山哲史助教、応用昆虫学の坂本卓磨様、研究の基礎を叩き込んで下さった応用生物科学科、生物制御科学科の諸先生方、研究の場を与えてくれた東京農工大学に心から感謝申し上げます。

最後に、陰ながら研究生活を支え励まし続けてくれた家族に心から感謝いたします。

参考文献

Alfonso TB, Jones BW (2002) gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. Dev Biol 248:369–383.

Awad T A, Truman J W (1997) Postembryonic development of the midline glia in the CNS of *Drosophila*: Proliferation, programmed cell death and endocrine regulation. Dev Biol 187:283-297.

Bardet PL, Kolahgar G, Mynett A, Mihuel-Aliaga I, Briscoe J, Meier P, Vincent JP (2008) A fluorescent reporter of caspase activity for live imaging. PNAS 105:13901-13905

Bello B C, Hirth F, Gould A P (2003) A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. Neuron 37:209-219.

Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118:401-415.

Chen YZ, Mapes J, Lee ES, Skeen-Gaar RR, Xue D (2013) Caspase-mediated activation of *Caenorhabditis elegans* CED-8 promotes apoptosis and phosphatidylserine externalization. Nat Commun 4:1-9

Choi YJ, Lee G, Park JH (2006) Programmed cell death mechanisms of identifiable peptidergic neurons in *Drosophila melanogaster*. Development 133:2223–2232.

Dekkers MPJ, Nikolettou V, Barde YA (2013) Death of developing neurons: New insights and implications for connectivity. J Cell Biol 203:385-393.

Egger B, Gold KS, Brand AH (2010) Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe. Development 137:2981–2987.

Fischbach KF, Heisenberg M (1981) Structural brain mutant of *Drosophila melanogaster* with reduced cell number in the medulla cortex and with normal optomotor yaw response. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:1105-1109

Fischbach KF, Technau G (1984) Cell degeneration in the developing optic lobes of the *sineoculis* and small-optic-lobes mutants of *Drosophila melanogaster*. Dev Biol 104:219–239.

- Fischbach KF, Hiesinger PR (2008) Optic lobe development. In Brain development in *Drosophila melanogaster*. Adv. Exp. Med Biol 628:115-136.
- Hara Y, Hirai K, Togane Y, Akagawa H, Iwabuchi K, Tsujimura H (2013) Ecdysone-dependent and ecdysone-independent programmed cell death in the developing optic lobe of *Drosophila*. Dev Biol 374:127–141.
- Hasegawa E, Kaido M, Takayama R, Sato M (2013) Brain-specific-homeobox is required for the specification of neuronal types in the *Drosophila* optic lobe. Dev Biol 377:90-99.
- Hay BA, Wolff T, Rubin GM (1994) Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. Development 120:2121-2129.
- Hofbauer A, Campos-Ortega JA (1990) Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. Roux's Arch Dev Biol 198:264-274.
- Huang Z, Kunes S (1996) Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. Cell 86:411-422.
- Huang Z, Shilo BZ, Kunes S (1998) A retinal axon fascicle uses Spitz, an EGF receptor ligand, to construct a synaptic cartridge in the brain of *Drosophila*. Cell 95:693–703.
- Kimura K, Truman JW (1990) Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. J Neurosci 10:403–411.
- Kimura K (1995) *Drosophila melanogaster*. In: The Newest Experimental Methods for Apoptosis Research (Tsujimoto Y, Tone S, Yamada T, ed), pp227–235. Tokyo, Japan: Yodosha.
- Kimura K, Ote M, Tazawa T, Yamamoto D (2005) fruitless specifies sexually dimorphic neural circuitry in the *Drosophila* brain. Nature 438:229–233.
- Klamt C, Jacobs JR, Goodman CS (1991) The midline of the *drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. Cell 64:801–815.
- Kuraishi T, Nakagawa Y, Nagaosa K, Hashimoto Y, Ishimoto T, Moki T, Fujita Y, Nakayama H, Dohmae N, Shiratsuchi A, Yamamoto N, Ueda K, Yamaguchi M, Awasaki T, Nakanishi Y (2009) Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. EMBO J. 28:3868-3878.

Kumar A, Bello B, Reichert H (2009) Lineage-specific cell death in postembryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 136:3433–3442.

Lannan E, Vandergaast R, Friesen PD (2007) Baculovirus caspase inhibitors P49 and P35 block virus-induced apoptosis downstream of effector caspase DrICE activation in *Drosophila melanogaster* cells. *J Virol* 81:9319–9330.

Laundrie B, Peterson JS, Baum JS, Chang JC, Fileppo D, Thompson SR, McCall K (2003) Germline cell death is inhibited by P-element insertions disrupting the *dcp-1/pita* nested gene pair in *Drosophila*. *Genetics* 165:1881–1888.

Lee GG, Kikuno K, Nair S, Park JH (2013) Mechanisms of postecdysis-associated programmed cell death of peptidergic neurons in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 521:3972–91.

Lee G, Wang Z, Sehgal, Chen CH, Kikuno K, Hay B, Park JH (2011) *Drosophila* caspases involved in developmentally regulated programmed cell death of peptidergic neurons during early metamorphosis. *J Comp Neurol* 519:34–48

Lin DM, Goodman CS (1994) Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13:507–523.

Lundell MJ, Lee HK, Perez E, Chadwell L (2003). The regulation of apoptosis by Numb/Notch signaling in the serotonin lineage of *Drosophila*. *Development* 130:4109–4121.

Meinertzhagen IA, Hanson TE (1993) The Development of the optic lobe. In: The development of *Drosophila Melanogaster*. (Bate M, Arias AM, ed) pp1363–1491. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Miguel-Aliaga I, Thor S (2004) Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Development* 131:6093–6105.

Muro I, Berry DL, Huh JR, Chen CH, Huang H, Yoo SJ, Guo M, Baehrecke EH, Hay BA (2006) The *Drosophila* caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process. *Development* 133:3305–3315

Nakano Y, Fujitani K, Kurihara J, Ragan J, Usui-Aoki K, Shimoda L, Lukacsovich T, Suzuki K, Sezaki M, Sano Y, Ueda R, Awano W, Kaneda M, Umeda M, Yamamoto D (2001) Mutations in the novel membrane protein spinster interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 21:3775–3788.

Ngo KT, Wang J, Junker M, Kriz S, Vo G, Asem B, Olson JM, Banerjee U, Hartenstein V (2010) Concomitant requirement for Notch and Jak/Stat signaling during neuro-epithelial differentiation in the *Drosophila* optic lobe. *Dev Biol* 346:284–295.

Novotny T, Eiselt R, Urban J (2002) Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 129:1027–1036

Oda H, Uemura T, Harada Y, Iwai Y, Takeichi M (1994) A *Drosophila* homolog of cadherin associated with *armadillo* and essential for embryonic cell–cell adhesion. *Dev Biol* 165:716–726.

Okada R, Nagaosa K, Kuraishi T, Nakayama H, Yamamoto N, Nakagawa Y, Dohmae N, Shiratsuchi A, Nakanishi Y (2012) Apoptosis-dependent Externalization and Involvement in Apoptotic Cell Clearance of DmCaBP1, an Endoplasmic Reticulum Protein of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 287:3138-3146.

Ozge E, Yilmaz T, Freeman M R (2014) Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes & Development* 28:20-33

Page DT, Olofsson B (2008) Multiple roles for apoptosis facilitating condensation of the *Drosophila* ventral nerve cord. *Genesis* 46:61–68.

Peterson JS, Barkett M, McCall K (2003) Stage-specific regulation of caspase activity in *drosophila* oogenesis. *Dev Biol* 260:113–123.

Ponton F, Chapuis M-P, Pernice M, Sword G A, Simpson S J (2011) Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 57:840-850.

Riedle S. J. and Shi Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 897-907

Rogulja-Ortmann A, Renner S, Technau GM (2008) Antagonistic roles for Ultrabithorax and Antennapedia in regulating segment-specific apoptosis of differentiated motoneurons in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* 135:3435–3445.

Robinow S, Talbot WS, Hogness DS, Truman JW (1993) Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* 119:1251–1259.

Sanes DH, Reh TA, Harris WA (2012) *Development of the nervous system*. Oxford, UK: Elsevier Inc.

Sato M, Suzuki T, Nakai Y (2013) Waves of differentiation in the fly visual system. *Dev Biol* 380:1-11.

Selleck SB, Steller H (1991) The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of *Drosophila*. *Neuron* 6:83-99.

Selleck SB, Gonzalez C, Glover DM, White K (1992) Regulation of the G1-S transition in post-embryonic neuronal precursors by axon in growth. *Nature* 355:253-255.

Sepp KJ, Schulte J, Auld VJ (2001) Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* 238:47–63.

Shi Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and Inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9:459–470.

Shklyar B, Levy-Adam F, Mishnaevski K, Kurant E (2013) Caspase activity is required for engulfment of apoptotic cells. *Mol Cell Biol* 33:3191-201.

Song Z, McCall K, Steller H (1997) DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science* 275:536–540.

Stanfield GM, Horvitz HR (2000) The *ced-8* gene controls the timing of programmed cell deaths in *C. elegans*. *Mol Cell* 5:423-433.

Suzuki T, Kaido M, Takayama R, Sato M (2013) A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the *Drosophila* visual center. *Dev Biol* 380:12-24.

Togane Y, Ayukawa R, Hara Y, Akagawa H, Iwabuchi K, and Tsujimura H (2012) Spatio-temporal pattern of programmed cell death in the developing *Drosophila* optic lobe. *Dev Growth Differ* 54:503–518.

Truman JW, Thorn RS, Robinow S (1992) Programmed neuronal death in insect development. *J Neurobiol* 23:1295–1311.

Tung TT, Nagaosa K, Fujita Y, Kita A, Mori H, Okada R, Nonaka S, Nakanishi Y (2013) Phosphatidylserine recognition and induction of apoptotic cell clearance by *Drosophila* engulfment receptor Draper. *J. Biochem.* 153: 483-491.

Umetsu D, Murakami S, Sato M, Tabata T (2006) The highly ordered assembly of retinal axons and their synaptic partners is regulated by Hedgehog/Single-minded in the *Drosophila* visual system. *Development* 133:791-800.

Wang W, Li Y, Zhou L, Yue H, Luo H (2011a) Role of JAK/STAT signaling in neuro epithelial stem cell maintenance and proliferation in the *Drosophila* optic lobe. *Biochem Biophys Res Commun* 410:714–720.

Wang W, Liu W, Wang Y, Zhou L, Tang X, Luo H (2011b) Notch signaling regulates neuro epithelial stem cell maintenance and neuroblast formation in *Drosophila* optic lobe development. *Dev Biol* 350:414–428.

Watts RJ, Schuldiner O, Perrino J, Larsen C, Luo L (2004) Glia Engulf Degenerating Axons during Developmental Axon Pruning. *Curr Biology* 14:678–684.

Winbush A, Weeks JC (2011) Steroid-triggered, cell-autonomous death of a *Drosophila* motoneuron during metamorphosis. *Neural Dev* 6:15–28.

Xu G, Cirilli M, Huang Y, Rich RL, Gmyszka D, Wu H (2001) Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature* 410:494–497.

Xu D, Wang Y, Willecke R, Chen Z, Ding T, Bergmann A (2006) The effector caspases *drICE* and *dcp-1* have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 13:1697–1706.

Xu D, Woodfield SE, Lee TV, Fan Y, Antonio C, Bergmann A (2009) Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 3:78–90.

Yasugi T, Umetsu D, Murakami S, Sato M, Tabata T (2008) *Drosophila* optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT. *Development* 135:1471–1480.

Yasugi T, Sugie A, Umetsu D, Tabata T (2010) Coordinated sequential action of EGFR and notch signaling pathways regulate proneural wave progression in the *Drosophila* optic lobe. *Development* 137:3193–3203.

Ziegenfuss JS, Doherty J, Freeman MR (2012) Distinct molecular pathways mediate glial activation and engulfment of axonal debris after axotomy. *Nat Neurosci* 15:979–987.