

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670134

研究課題名(和文)カイコ個体内遺伝子導入による実験モデル生物の開発

研究課題名(英文) Establishment of gene expression system in Bombyx mori

研究代表者

畠山 鎮次 (Hatakeyama, Shigetsugu)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの疾患を解析するためのモデル生物を利用することは、医学研究にとって重要なことである。今回、遺伝子疾患解析のために、カイコ個体内での遺伝子発現システムの開発を試みた。AcNPVウイルスに感受性がある特殊なカイコ系統を使用することで、ウイルスベクターによる遺伝子発現法を開発した。具体的には、目的遺伝子(モデル遺伝子としてGFPタンパク質遺伝子)を組み込んだAcNPVウイルスを作成し、特殊なカイコ系統の幼虫に感染させ、GFPタンパク質を発現させることができた。

研究成果の概要(英文)：It is important to use animal models in order to analyze the etiology of human diseases in medical researches. We tried to establish gene expression system in Bombyx mori to analyze genetic diseases. We established viral expression system using special Bombyx strains, which can be infected by AcNPV. We made AcNPV virus containing a target gene (GFP gene as a model gene), infected the virus and then could express GFP protein in pupae of Bombyx.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ゲノム医科学

## 1. 研究開始当初の背景

機能未知のヒト遺伝子や遺伝子異常が原因とされる疾患を解析する場合、マウスやラットなど哺乳動物の遺伝子改変動物を作製することが従来から行われてきた。近年になり、下等生物からヒトまでのさまざまな生物のゲノム構造(遺伝子配列)が報告され、多くの遺伝子にヒトホモログ homolog (オソログ ortholog) が存在することが判明した。したがって、それぞれの遺伝子の解析の際、条件に合った実験生物モデルを選択することが重要となる。カイコ(幼虫: 約 8 cm、6 g) は個体サイズが成体マウス(5 cm、約 25 g) に近いので生化学的および形態学的解析が可能であり、かつショウジョウバエ研究のように遺伝子操作が容易であるので、ヒト疾患モデル生物として利用価値が高い。カイコはショウジョウバエとともにライフサイエンス分野で大きな役割を果たしており、実験昆虫として以下のような利点がある。

飼育や維持費が安価で、ライフサイクルが短い(約 500 もの卵を産む)。

人工孵化法、人工飼料による通年飼育が可能であり、幼虫は一定場所から逃げず、成虫は飛翔能力がないため管理が容易である。

国内に多くの実験システムを有し保存システムが確立され、多数の突然変異システムがある。

染色体の関連分析が進んでおり、遺伝子データベースが完成している。

## 2. 研究の目的

本申請では、カイコのさまざまな利点に基づき、ヒト遺伝性疾患解析のモデル生物としてカイコを利用するために、汎用性カイコ内遺伝子発現システムを樹立することを考えた。しかしながら、カイコの遺伝学的方法論として現在日本において農業生物資源研究所を中心に、GAL4/UAS 系やエンハンサーラップ法を利用したトランスジェニックカイコの作出が進められているが、まだ広範な領域の生物学者に利用されるには難しく、特殊な専門技術と期間が必要である。そこで、申請者は多くの研究室で既に利用されているバキュロウイルス発現系を使ったカイコ個体内での一過性遺伝子発現システムの樹立を試みた。さらに、目的遺伝子が継続的に子孫まで伝わる安定発現カイコの作出も目的とした。

## 3. 研究の方法

カイコに感染する *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) を使用した場合、その感染性及び病原性(致死性)のため、非致死性の遺伝子発現カイコ個体(ヒト疾患モデルカイコを含む)を作出することは困難である。現在、リコンビナントタンパク質を作製するために、ヤガ科キンウバ由来の Sf9 細胞に核多角体病ウイルス

*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) を感染させる方法が汎用されている。カイコ個体に BmNPV を感染させた場合、目的タンパク質の産生は行われるが、ウイルスによる病原性のため致死となり、目的遺伝子の発現による個体変化を観察することができない。また、AcNPV ではカイコ細胞に感染はするが、うまく増殖しないことも知られている。モデル生物としてカイコを使用可能にさせるためには、非致死性の状態で目的遺伝子を適度に発現させるシステムを樹立することが必要である。日本には、永い期間蓄積された養蚕技術があり、既に多くのカイコの系統が樹立維持されている(九州大学遺伝子資源開発研究センター)。AcNPV はヤガ科キンウバを本来の宿主とするが、AcNPV が感染可能なカイコ系統が数系統同定されている。そこで、目的遺伝子を組み込んだ AcNPV をこれらのカイコ系統に感染させ、一過性に発現させ個体の変化を観察することを試みた。さらに、生殖系細胞(精子や卵)に感染することにより、一部染色体上に遺伝子移入される可能性を検討した。

## 4. 研究成果

EGFP や DsRed cDNA を AcNPV 系バキュロウイルス発現ベクター系にサブクローニングした。その後、Bac-to-bac バキュロウイルス発現システムを使用して改変バキュロウイルスを作製した。また、九州大学遺伝子資源開発研究センターから分与可能なカイコ系統のうち、AcNPV が感染する可能性が高いカイコ系統(c11, d17, f10 系統など)を譲受し、感染効率を検討した。この系統の中で d17 系統に対する感染性および遺伝子発現性が最も高いことが判明した。各段階の幼虫にリコンビナントウイルスを感染させた後、生殖系細胞系列への移行を検討したが、安定発現する受精卵を得ることはできなかった。さらに、目的遺伝子の安定発現カイコの作製に対する方法として、piggyBac トランスポゾンシステムを導入したバキュロウイルス発現系を使用した。しかしながら現在までのところ、安定発現した受精卵は得られていない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

Tsukiyama, T., Fukui, A., Terai, S., Fujioka, Y., Shinada, K., Takahashi, H., Yamaguchi, T.P., Ohba, Y. and Hatakeyama, S.: Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 査読有, in press

DOI: MCB.00159-15

Kanno, Y., Mitsui, T., Kitta, T., Moriya, K., Tsukiyama, T., Hatakeyama, S., Nonomura, K.: The Inflammatory Cytokine IL-1b is Involved in Bladder Remodeling After Bladder Outlet Obstruction in Mice, *Neurouro. Urodyn.*, 査読有, 2015 (掲載予定)  
DOI: 10.1002/nau.22721

Takahashi, H., Takigawa, I., Watanabe, M., Anwar, D., Shibata, M., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Ranjan, A., Seidel, C.W., Tsukiyama, T., Mizushima, W., Hayashi, M., Ohkawa, Y., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Hatakeyama, S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex, *Nature Commun.*, 査読有, 5,5941, 2015  
DOI: 10.1038/ncomms6941

Sato, T., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Iguchi, A. and Ariga, T.: The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene*, 査読有, 34, 1280-1291, 2015  
DOI: 10.1038/onc.2014.68

Nakamaru, Y., Takagi, D., Homma, A., Hatakeyama, S., Fukuda, S.: Oxidative stress regulates IL-4 gene expression in mast cells through the reduction of histone deacetylase. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 査読有, 152, 48-52, 2015  
DOI: 10.1177/01945998114559189

Kameda, Y., Takahata, M., Mikuni, S., Shimizu, T., Hamano, H., Angata, T., Hatakeyama, S., Kinjo, M. and Iwasaki, N.: Siglec-15 is a potential therapeutic target for postmenopausal osteoporosis. *Bone*, 査読有, 71, 217-226, 2014  
DOI: 10.1016/j.bone.2014.10.027

Yabe, I., Tanino, M., Yaguchi, H., Takiyama, A., Cai, H., Kanno, H., Takahashi, I., Hayashi, Y., Watanabe, M., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Tanaka, S. and Sasaki, H.: Pathology of frontotemporal dementia with limb girdle muscular dystrophy caused by a DNAJB6 mutation. *Clin. Neurol. Neurosur.*, 査読有, 127, 10-12, 2014.  
DOI: 10.1016/j.clineuro.2014.09.013

Ai, L., Wan-Ju Kim, W., Alpay, M., Tang, M., Pardo, C.E., Hatakeyama, S., May, W.S., Kladd, M.P., Heldermon, C.D., Siegel, E.M. and Brown, K.D.: TRIM29 suppresses TWIST1 and invasive breast cancer behavior. *Cancer Res.*, 査読有, 74, 4875-4887, 2014  
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3579

Kanno, Y., Watanabe, M., Kimura, T., Nonomura, K., Tanaka, S. and Hatakeyama, S.: TRIM29 as a novel prostate basal cell marker for diagnosis of prostate cancer. *Acta Histochem.*, 査読有, 116, 708-712, 2014  
DOI: 10.1016/j.acthis.2013.12.009

Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Okumura, F., Takeuchi, A., Horiuchi, K., Kan, T., Kanda, A., Saito, W., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S. and Sasaki H.: Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J. Neurol.*, 査読有, 261, 224-226, 2014  
DOI: 10.1007/s00415-013-7134-5

Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., Sato, T., Hatakeyama, S., Isobe, T. and Hachiya, N.: 14-3-3 proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation, *J. Cell Sci.*, 査読有, 126, 2014-2026, 2013  
DOI: 10.1242/jcs.122069

Kameda, Y., Takahata, M., Komatsu, M., Mikuni, S., Hatakeyama, S., Shimizu, T., Angata, T., Kinjo, M., Minami, A. and Iwasaki, N.: Siglec-15 Regulates Osteoclast Cytoskeletal Organization in Association with Signaling Adaptor DAP12. *J. Bone Mineral Res.*, 査読有, 28, 2463-2475, 2013  
DOI: 10.1002/jbmr.1989

〔学会発表〕(計12件)

高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Delnur Anwar, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Amol Ranjan, Chris W Seidel, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Joan W Conaway, Ronald C Conaway, 畠山鎮次, メディエーター複合体による転写伸長制御、第37回日本分子生物学会年会、

2014年11月25~27日、パシフィコ横浜  
(横浜)

高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Anwar Delnur, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Ranjan Amol, Seidel Chris, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Conaway Joan, Conaway Ronald, 畠山鎮次, Med26は Little elongation complexをリクルートすることでsmall nuclear RNA遺伝子の発現を制御する、第87回日本生化学会、2014年10月15~18日、京都国際会議場(京都)

渡部昌, 高橋秀尚, 畠山鎮次, TRIMタンパク質による脂肪細胞分化制御、第87回日本生化学会、2014年10月15~18日、京都国際会議場(京都)

榊田安志, 高橋秀尚, Conaway Ronald C., Conaway Joan W., 畠山鎮次, TRIM29はヒストンH2AXのリン酸化を介してDNA二本鎖切断修復を制御する、第87回日本生化学会、2014年10月15~18日、京都国際会議場(京都)

鈴木正宣, 渡部昌, 中丸裕爾, 福田諭, 畠山鎮次, Tripartite motif protein39(TRIM39)の機能解析、第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2014年6月19~20日、北海道大学(札幌)

築山忠維, 福井彰雅, 寺井小百合, 藤岡容一朗, 品田恵佐, Yamaguchi Terry, 大場雄介, 畠山鎮次, がん抑制遺伝子RNF43は異なるメカニズムによってWnt/beta-catenin経路とnoncanonical Wnt経路を抑制する、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3~6日、神戸ポートアイランド(神戸)

築山忠維, 畠山鎮次, がん抑制遺伝子RNF43は異なるメカニズムによってWnt/beta-catenin経路とnoncanonical Wnt経路を抑制する、第72回日本がん学会学術総会、2013年10月3~5日、パシフィコ横浜(横浜)

畠山鎮次, TRIMタンパク質の多彩な機能、第86回日本生化学会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜(横浜)

榊田安志, 畠山鎮次, ATDCはヒストンH2A.Xのリン酸化とヒストンH4のアセチル化を介してDNA二本鎖切断修復を制御する、第86回日本生化学会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜(横浜)

Hatakeyama, S., Regulation of cellular function by TRIM proteins, The 35th Naito Conference (The

Ubiquitin-Proteasome System: from Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles), Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo (Japan), 2013年7月9~12日

Watanabe, M., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Involvement of linear polyubiquitination in PPAR $\gamma$  transcriptional activity, The 35th Naito Conference (The Ubiquitin-Proteasome System: from Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles), Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo (Japan), 2013年7月9~12日

Matsuda, Y., Takahashi, H, Matsumoto, M., Nakayama, KI., Hatakeyama, S., Functional analysis of a novel multiprotein complex containing ataxia telangiectasia group D-complementing (ATDC) gene product, TRIM29, The 35th Naito Conference (The Ubiquitin-Proteasome System: from Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles), Gateaux Kingdom Sapporo, Sapporo (Japan), 2013年7月9~12日

[その他]

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~d20505/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畠山 鎮次 (HATAKEYAMA, Shigetsugu)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 70294973