

平成 23 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570004

研究課題名 (和文) 腸管機能獲得に関わる因子の遺伝学的解析

研究課題名 (英文) Mechanisms of functional differentiation in the *Drosophila* midgut

研究代表者

中越 英樹 (NAKAGOSHI HIDEKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：50314662

研究成果の概要 (和文)：

ショウジョウバエの中腸中央部には銅吸収細胞と間質細胞が交互に存在する領域があり、銅吸収機能と酸分泌機能を担っている。転写制御因子 Dve の 2 種類のアイソフォーム (Dve-A, Dve-B) の発現が、細胞種・時期特異的に極めて厳密に制御されることで、これらの中腸機能の制御に関わることが明らかとなった。また、Rho ファミリー GTPase や V-ATPase の活性が、細胞種特異的に要求されることも明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

The *Drosophila* middle midgut has two functions, copper absorption and acid secretion. These functions are established by intercellular communication between copper and interstitial cells. The transcription factor Dve has two isoforms (Dve-A, Dve-B), and the spatio-temporal regulation of isoform switching is crucial for functional differentiation of the midgut. In addition, the cell-type specific activities of Rho GTPase and V-ATPase are also required for the midgut functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：発生遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝ゲノム動態

キーワード：ショウジョウバエ，腸管，機能分化，金属イオン，酸

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はショウジョウバエの新規ホメオボックス遺伝子 *dve* をクローニングし、これまで *dve* 遺伝子の時間・空間特異的な発現抑制がさまざまな生理活性制御に関与していることを明らかにしてきた。腸管の銅吸収細胞 (copper cell) においては、この *dve* 発現抑制が吸収機能獲得に必須である (Nakagoshi et al., *Genes Dev.* 1998, *Dev. Biol.* 2002, *Dev. Growth Differ.* 2005; Tanaka et al., *Dev. Biol.* 2007; Shirai et al., *Dev. Biol.* 2007)。

銅 (Cu)、鉄 (Fe)、亜鉛 (Zn) などの金属イオンは生体にとっての必須元素であり、多くの酵素の活性中心として要求される。銅イオン平衡の乱れは神経変性疾患を引き起こすことなども報告されており、銅吸収過程の制御メカニズムの理解は重要な課題である。

また、ショウジョウバエ腸管の銅吸収細胞領域が担う酸分泌機能には、プロトンポンプ V-ATPase の関与が推定されている (*J. Cell Sci.* 2006)。V-ATPase は細胞外環境や細胞内オルガネラ (エンドソーム、リソソームなど) を酸性化することによってさまざまな生理機能を制御するとともに (*Nature Review Mol. Cell Biol.* 2002)、細胞内外に形成されたプロトン勾配によって駆動されるイオンチャンネルやトランスポーターの活性制御にも重要な役割を果たす。たとえば、小腸や腎尿細管上皮細胞刷子縁膜に発現するプロトン駆動型ペプチドトランスポーター (PEPT1, PEPT2) はペプチド吸収活性を担うが、その基質選択性は低い。ペプチド構造を持つ薬剤なども吸収するため、創薬のターゲットとしても注目されており、腸管におけるプロトン勾配の制御機構を明らかにすることの意義は大きい。

研究代表者は、ショウジョウバエ銅吸収細

胞に隣接して交互に存在する間質細胞 (interstitial cell) で受容された Notch, Wingless (Wg), Dpp などのシグナルが隣の銅吸収細胞に伝達されることで2つの機能 (銅吸収機能, 酸分泌機能) が獲得されることを明らかにした (Tanaka et al., *Dev. Biol.* 2007)。このような「細胞間情報伝達を介した細胞機能制御」の分子の実体は、これまでほとんど明らかにされておらず、細胞機能分化の制御メカニズムを解析するための優れたモデル系を提供するものである。最近、膵臓ランゲルハンス島β細胞間の情報伝達がインシュリン分泌能を制御しているという興味深い報告が *Cell* 誌に掲載されたように (*Cell* 129, 359-370, 2007)、今後の研究の進展が期待される分野である。

さらに、癌細胞の転移能がプロトン勾配の生成機構の違いと相関するという興味深い報告もある (*Am J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C1443-C1452, 2004)。ショウジョウバエ腸管細胞をモデル系として、プロトン勾配の生成機構を分子遺伝学的に解析することは、進化的にも保存された普遍的な生理活性制御機構に新たな知見を与え得るものである。

2. 研究の目的

本研究は、「細胞間情報伝達を介した機能制御」の解明を目指すものである。ショウジョウバエの腸管をモデル系として、銅吸収機能、酸分泌機能の制御に関わる新規因子の同定を目指す。これまでの解析から得られた新規因子の候補としては、Rho GTPase (Cdc42, Rac) と V-ATPase サブユニットの1つである *vha16* がある。V-ATPase は酸分泌に必要なことが推定されているものの、直接的な証拠はなく、その制御機構も不明である。

vha16 活性は、酸分泌機能だけでなく、銅吸収機能を獲得するためにも必要であるとの予備的な結果を得ているため、単純なプロトンポンプとしての機能だけでは説明できない新規のメカニズムが想定される。プロトン勾配と銅輸送がカップルしている可能性や Rho GTPase, V-ATPase とエンドソーム経路との関係を明らかにしたい。

また、細胞間情報伝達に関与すると思われる未解析のシグナル分子 (JAK/STAT, Eph/Ephrin など), Dve と協調的に働く可能性のある転写共役因子, 糖鎖修飾を含めた翻訳後制御に関わる因子について細胞種特異的な遺伝子機能阻害 (RNAi 法) を適用し, 細胞間情報伝達を介した機能制御に関わる新規因子の同定とメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究の特色は、生体内環境を維持した状態で細胞機能を可視化して解析できる点である。エサに銅イオンや pH 指示薬 BPB を混ぜて摂食させ、腸管を紫外光で励起すると銅吸収細胞は銅-メタロチオネイン複合体の蛍光シグナルを発する。また、腸管内腔の BPB の色調変化を観察することで酸分泌能を容易に判定できる。つまり、培養細胞系では再現することがむずかしい細胞内外の微小環境が完全に保持された状態での機能解析が可能である。

さらに、ショウジョウバエの分子遺伝学的な解析手法を駆使することで、様々な遺伝子の機能阻害を細胞種特異的 (銅吸収細胞 or 間質細胞) かつ時期特異的に誘導できるシステムが、研究代表者によって確立されている (Tanaka et al., *Dev. Biol.* 2007)。このシステムを用いて、中腸機能が獲得される分子メカニズムを遺伝学的に解析する。

4. 研究成果

(1) Rho GTPase の機能解析

ショウジョウバエ中腸の銅吸収細胞は明確な細胞極性を持つ。腸管内腔側 (アピカル面) はフラスコ状に陥入し、表面はアクチン束からなる微絨毛で覆われている。Rho ファミリー GTPase はアクチン細胞骨格や細胞内極性の制御に関わる重要な因子であるため、優性阻害型 (ドミナントネガティブ型) Rho GTPase を細胞種特異的に誘導し、腸管機能への影響を調べたところ、銅吸収機能には Dcdc42 の活性が間質細胞で要求され、酸分泌機能には Rho1 の活性が間質細胞で要求されることが明らかとなった。銅吸収機能の獲得に必要な Notch シグナルと Dcdc42 の上下関係を調べた結果、Dcdc42 が下流に存在し、Dcdc42 の適切な活性レベルが機能獲得に重要である可能性が示唆された。

(2) V-ATPase の機能解析

銅吸収細胞において発現する遺伝子スクリーニングの結果、プロトンポンプ V-ATPase のサブユニットをコードする *vha16* 遺伝子に注目し、*vha16::GFP* 発現系統、*vha16* 二本鎖 RNA 発現系統を樹立した。*vha16* 二本鎖 RNA を細胞種特異的に発現させて遺伝子機能阻害 (RNAi) を行った結果、Vha16 活性は、酸分泌機能には銅吸収細胞と間質細胞の両方で必要であり、吸収機能のためには銅吸収細胞が必要であった。この結果は、V-ATPase が銅吸収細胞アピカル面の微絨毛に集積してプロトンポンプとして機能する以外にも、エンドソーム経路などを介して腸管の機能制御に深く関わっていることを示している。

(3) 転写制御因子 Dve の機能解析

ショウジョウバエ Dve タンパク質は2個のホメオドメイン (HD) と1個のCOMPASSドメイン (CMP) を持つ。CMPは脊椎動物のクロマチン構造変換因子 **SATB** との間に高い相同性が認められる領域である。*dve* 遺伝子からは *dve-A* (4.9kb) と *dve-B* (3.5kb) の2種類の mRNA が転写される。Dve-A, Dve-B タンパク質は共通して CMP と2つの HD を有しているが、Dve-A にのみヒスチジンとグルタミンに富んだ領域 (HQ) が存在する。*dve-A* 欠失変異体 (*dve^{E181}*) および二本鎖 RNA を用いた遺伝子機能阻害 (RNAi) を用いて、細胞種および時期特異的な Dve 活性の要求性について検討を行った。

胚期の前胃予定領域では Dve-B, 中腸予定領域では Dve-A がそれぞれ発現していた。1齢幼虫期になると、前胃では Dve-A, 中腸間質細胞では Dve-B 発現 (*dve-B* のエンハンサー活性を反映する *dve^l-lacZ* 発現) への変換が認められた。興味深いことに中腸の銅吸収細胞では1齢幼虫への孵化前後に Dve タンパク質発現は一時的に抑制され、再び発現の回復が見られた。この銅吸収細胞では *dve^l-lacZ* 発現 (*dve-B* 活性) は検出されないことから、幼虫期に検出される Dve タンパク質は Dve-A であると考えられる。また、*dve-A* 欠失変異体では銅吸収細胞において *dve^l-lacZ* が異所発現することから、中腸銅吸収細胞では *dve-B* 発現への変換が Dve-A によって積極的に抑制されていることが明らかとなった。時期特異的な RNAi 誘導実験から、この *dve-B* 発現抑制には胚期における Dve-A 活性が必要であること、胚期の Dve-A 活性は中腸機能獲得にも必要であることが明らかとなった。

そこで、*dve-A*, *dve-B* を異所的・異時的に強制発現させ、その効果を検討した。胚期中腸では主に Dve-A が発現しているが、

孵化直前にはその発現が抑制される。この *dve-A* 発現抑制を阻害すると銅吸収、酸分泌の機能がともに低下した。また、胚期に *dve-B* を過剰発現させると、中腸形態が著しく乱れた。幼虫期間質細胞では Dve-B へのアイソフォーム変換が起きるが、このとき *dve-B* を過剰発現させると酸分泌が低下した。幼虫期銅吸収細胞ではアイソフォーム変換が抑制されるため Dve-A が発現しているが、*dve-B* を強制発現させることによって銅吸収が阻害された。このように、中腸細胞の機能獲得には Dve のアイソフォーム変換が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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1件)

- ① Yoshiki Nakagawa, Shinobu Fujiwara-Fukuta, Takeshi Yorimitsu, Suzuka Tanaka, Ryunosuke Minami, Lily Shimooka, Hideki Nakagoshi, Spatial and temporal requirement of Defective proventriculus activity during *Drosophila* midgut development, *Mechanisms of Development*, 査読有, vol. 128, 印刷中, 2011.

[学会発表] (計5件)

- ① 下岡リリー, ショウジョウバエ内胚葉におけるセプテートジャンクションの機能, 日本分子生物学会第33回年会, 2010年12月7日(神戸)
- ② 中川嘉規, ショウジョウバエ Dve の2種類のアイソフォームの時間空間的な要求性, 日本分子生物学会第32回年会, 2009年12月9日(横浜)
- ③ 坂本豊仁, ショウジョウバエ *dve* 遺伝子と遺伝的相互作用を示す新規因子の探索,

日本分子生物学会第 32 回年会, 2009 年 12 月 9 日 (横浜)

- ④ 中越英樹, Spatial and temporal requirement of Defective proventriculus activity during *Drosophila* midgut development, 50th Annual Drosophila Research Conference, 2009 年 3 月 5 日, シカゴ (アメリカ合衆国)
- ⑤ 中越英樹, ショウジョウバエ Dve の機能ドメイン解析, 日本分子生物学会第 31 回年会, 2008 年 12 月 11 日 (神戸)

[その他]

ホームページ等
<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/nakagoshi/Kinou.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中越 英樹 (NAKAGOSHI HIDEKI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号 : 50314662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし