

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659144

研究課題名（和文）カイコ個体内遺伝子発現システムによる疾患モデルの確立

研究課題名（英文）Disease models using gene expression system in Bombyx mori

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

研究成果の概要（和文）：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、カイコ内遺伝子発現システムを樹立することを進めた。そのために、AcNPV ウイルスの感染を受け、そのウイルスが適度に増殖できる、特殊なカイコ系統を利用した。実際には目的遺伝子（GFP タンパク質遺伝子）を組み込んだ AcNPV ウイルスを、これらのカイコ系統に感染させることで一過性に GFP タンパク質を発現させることができることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We tried to establish gene expression system in Bombyx mori in order to use Bombyx as a model for analyzing human disease. We used specific Bombyx strains which can be infected by AcNPV. After AcNPV containing a target gene (GFP gene) was infected in this specific Bombyx strains, GFP was transiently expressed in Bombyx.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ゲノム医化学

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに遺伝子改変マウスを作製することで、さまざまなヒトに存在する遺伝子の機能解析を進めてきた。申請者は下等生物での実験生物としては、世代時間が短く、形態学的解析が可能（例えば神経領域の遺伝子に関しては複眼で解析可能）であるショウジョウバエを利用してきた。ショウジョウバエは、マウスに比較して速く遺伝学的解析を進めることができるが、個体サイズが小さいために生化学的解析には困難を生じる。そこで、生化学的解析及び形態学的解析が可能な多細胞の下等生物を考えた場合、カイコ *Bombyx mori* が条件的に有利であることが考えた。また、これまでに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利点がある。本研究申請においては、

日本にとって重要な生物資源（歴史的遺産）であるカイコを実験生物として、農学以外の領域の生物学者（医学など）にも容易に利用できる遺伝子発現方法の樹立を試みた。

2. 研究の目的

カイコは高次機能研究において長所を有した実験動物であることがわかるが、トランスジェニック技術を含む遺伝学的解析などの方法論の充実がさらに必要な段階である。現在日本において農業生物資源研究所を中心に、GAL4/UAS 系やエンハンサート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とされる段階である。そこで、本研究申請で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

ったカイコ個体内遺伝子発現システムの樹立を試みた。

3. 研究の方法

現在までのところ、バキュロウイルスの特性（致死性）のため、それによって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。バキュロウイルス発現系としてはキンウバ由来の 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よく利用されている。また、カイコもしくはカイコ由来の BmN 細胞に *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) を感染させる方法もある。これまでの研究により、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、目的遺伝子の発現依存性の機能変化を観察することはできない。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おり、実質的に遺伝子の発現は困難であると言われている。

疾患解析において、目的遺伝子の過剰発現（遺伝子ノックダウンを含む）でのカイコの個体レベルの機能解析が重要であるので、本申請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を目的とした。そのためには、永い期間蓄積された日本の養蚕技術が重要な役割を果たす可能性が高い。これまでに既に多くのカイコの系統が樹立維持されており、九州大学遺伝子資源開発研究センターから分与可能な状態にある。これらの系統解析により、異種でありながらも AcNPV の感染を受けウイルスが適度に増殖し、カイコ個体自身を致死に至らせないカイコ系統が数系統スクリーニングされている。実際には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。これにより、生殖系列細胞(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

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進めた。EGFP や Ds-Red 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、レポーターコンストラクトを作製した。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。次に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 が感染し発現可能性の高いの各種のカイコ系統 (c11, d17, f10 系統など) を譲り受け、感染効率を検討した。さらに、目的遺伝子の安定発現カイコの作製に向けて、piggyBac 系によるトランスポゾンシステムの発現ベクター及びその改変バキュロウイルスウイルスを作製した。さらに、ヒトでは未だ機能が不明なユビキチン化酵素 (ユビキチンリガーゼ) の一つである RNF185 のカイコホモログを同定したので、ヒトから RNF185cDNA をクローニングし解析した。

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 16 件)

1. Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., ato, 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, in press.
2. Okumura, F., Okumura, A.J., Uematsu, K., Hatakeyama, S., Zhang, D.E. and Kamura, T.: Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *J Biol Chem.* 査読有, 288: 2839-2847. 2013. DOI:10.1074/jbc.M112.401851.
3. Hatakeyama, S.: Ubiquitin-mediated regulation of JAK-STAT signaling in embryonic stem cells. *JAK-STAT*, 査読有, 1, 168-175, 2012.
4. Shibata, M., Sato, T., Nukiwa, R., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM45 negatively regulates NF- κ B-mediated transcription and suppresses cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 423, 104-109, 2012. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.05.090
5. Kondo, T., Watanabe, M. and Hatakeyama, S.: TRIM59 interacts with ECSIT and negatively regulates NF- κ B and IRF-3/7-mediated signal pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 422, 501-507,

6. Tsukiyama, T., Matsuda-Tsukiyama, M., Bohgaki, M., Terai, S., Tanaka, S. and Hatakeyama, S.: Ymer acts as a multifunctional regulator in NF-kB and Fas signaling pathways. *Mol. Med.*, 査読有, 18, 587-597, 2012. DOI: 10.2119/molmed.2011.00435.
 7. Sato, T., Okumura, F., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM6 interacts with Myc and maintains the pluripotency of mouse embryonal stem cells. *J. Cell Sci.*, 査読有, 125, 1544-1555, 2012. DOI: 10.1242/jcs.095273
 8. Yaguchi, H., Okumura, F., Takahashi, H., Kano, T., Kameda, H., Uchigashima, M., Tanaka, S., Watanabe, M., Sasaki, H. and Hatakeyama, S.: TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuriteogenesis. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287, 12050-12059, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.307678
 9. Sato, T., Okumura, F., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM6 interacts with Myc and maintains the pluripotency of mouse embryonal stem cells. *J. Cell Sci.*, 査読有, 125, 1544-1555, 2012. DOI: 10.1242/jcs.088799
 10. Sato, T., Okumura, F., Iguchi, A., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM32 promotes retinoic acid receptor alpha-mediated differentiation in human promyelogenous leukemic cell line HL60. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 417, 594-600, 2012. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.12.012
 11. Hatakeyama, S.: TRIM proteins and cancer. *Nature Rev. Cancer*, 査読有, 11, 792-804, 2011. DOI: 10.1038/nrc3139
 12. Sato, T., Okumura, F., Kano, S., Kondo, T., Ariga, T. and Hatakeyama, S.: TRIM32 promotes neural differentiation through retinoic acid receptor-mediated transcription. *J. Cell Sci.*, 査読有, 24, 3492-3502, 2011. DOI: 10.1242/jcs.088799
 13. Okumura, F., Okumura, A.J., Matsumoto, M., Nakayama, K.I. and Hatakeyama, S.: TRIM8 regulates Nanog via Hsp90 beta-mediated nuclear translocation of STAT3 in embryonic stem cells. *BBA-Mol. Cell Res.* 査読有, 1813, 1784-1792, 2011. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.05.013
 14. Noguchi, K., Okumura, F., Takahashi, N., Kataoka, A., Kamiyama, T., Todo, S. and Hatakeyama, S.: TRIM40 promotes neddylation of IKK gamma and is downregulated in gastrointestinal cancers. *Carcinogenesis*, 査読有, 32, 995-1004, 2011. DOI: 10.1093/carcin/bgr068
 15. Sho, T., Tsukiyama, T., Sato, T., Kondo, T., Cheng, J., Saku, T., Asaka, M. and Hatakeyama, S.: TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60. *BBA-Mol. Cell Res.*, 査読有, 1813, 1245-1253, 2011. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.018
 16. Okumura, F., Yoshida, K., Liang, F. and Hatakeyama, S.: MDA-9/syntenin interacts with ubiquitin via a novel ubiquitin binding motif. *Mol. Cell. Biochem.*, 査読有, 352, 163-172, 2011. DOI 10.1007/s11010-011-0750-4
- [学会発表] (計 16 件)
1. Hatakeyama, S. TRIM proteins and cancers, 第 71 回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌, 札幌, 2012.9.19.
 2. 高橋秀尚, 佐藤智信, Conaway, J.W., Conaway, R.C., 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 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012.12.11-14.
 3. 奥村文彦, 畠山鎮次, ドンガー ザン, 嘉村巧, double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) は interferonstimulated gene 15 (ISG15) 修飾により活性化され, キャップ構造依存性のタンパク質翻訳を抑制する, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議

- 場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012.12.11-14.
4. 高橋秀尚, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 嶋山鎮次, 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 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012.12.14-16.
 5. 梶田安志, 高橋秀尚, 嶋山鎮次, TRIM29 による TRRAP/Tip60 複合体の機能制御とがん化との関わり, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012.12.14-16.
 6. 嶋山鎮次, TRIM タンパク質の多様性と機能, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡 2012.12.14-16.
 7. 築山忠維, 嶋山鎮次, RNF43 は NEDL1 と結合し, p53 依存性の転写を調節する, 第 71 回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌, 札幌, 2012.9.19.
 8. Tadasuke Tsukiyama, Akimasa Fukui, Sayuri Terai, Keisuke Shinada, Shigetsugu Hatakeyama, RNF43 は canonical/noncanonical Wnt シグナルの両方を抑制する, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012.12.11-14.
 9. Hidehisa Takahashi, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama, Human Mediator subunit Med26 plays a role in recruitment of "Little elongation complex" to small nuclear RNA genes, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡, 2012.12.11-14.
 10. 嶋山鎮次: 癌化を制御する TRIM ファミリーユビキチンリガーゼ, 日本実験動物技術者協会北海道支部第 59 回特別講演, 北海道大学, 札幌, 2012.4.26
 11. Hatakeyama, S., TRIM proteins in inflammation and carcinogenesis. 2nd international symposium: Infection-related cancers (Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Research Center for Infection-associated Cancer (RCIAC), Sapporo, 2012.3.12-13
 12. 嶋山鎮次, 特別講演「癌化を制御する TRIM ファミリーユビキチンリガーゼ」, 第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会, 北海道大学医学部学友会館「フラテ」, 札幌, 2012.2.10-11.
 13. Tsukiyama T., Tsukiyama M M., bohgaki M., Tanaka S., Hatakeyama, S., Ymer functions as a multifunctional regulator in NF- κ B and Fas signaling pathways., the 41st meeting of the Australasian Society for immunology 2011, Adelaide Convention Center, Adelaide, 2012.12.11-15.
 14. 丸山 覚, 築山忠維, 河津隆文, 佐藤 沢, 千葉博基, 安部崇重, 佐澤 陽, 篠原信雄, 嶋山鎮次, 野々村克也, ダイオキシン受容体内因性リガンドによる前立腺がん細胞におけるアンドロゲンレセプター発現低下と増殖抑制, 第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会, 北海道大学医学部学友会館「フラテ」, 札幌, 2012.2.10-11
 15. Otomo K, Atsumi T, Fujieda Y, Nakagawa H, Amengual O, Kato M, Horita T, Tasuda S, Matsumoto M, Hatakeyama, S., Koike T., Role of apolipoprotein B100 and oxidized low-density lipoprotein in anti beta2 glycoprotein I induced tissue factor expression on monocytes. , The 75th annual meeting of the American College of Rheumatology, Chicago, Illinois, 2011.11.5-9
 16. 渡部 昌, 嶋山鎮次, TRIM ファミリー分子による PPAR γ シグナルの制御, 第 84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 京都, 2011.9.21-24
- 〔図書〕 (計 3 件)
1. 嶋山鎮次, 医学書院, 「標準生化学」藤田道也, 351 頁, 2012.

2. 畠山鎮次, 羊土社 タンパク質分解系による生体制御, 「複雑化するユビキチンリガーゼの機能と多様性」,91-102, 2011.

3. Maruyama, S. , Nonomura, K, Hatakeyama, S., Nova Science Publishers, PSA and Prostate Cancer, 137-152, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：前立腺基底細胞の検出方法
発明者：畠山鎮次,田中伸哉
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-277980
出願年月日：平成 24 年 12 月 20 日
国内外の別：国内

[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

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：