

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14303
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21580067
 研究課題名（和文） 疾患モデルショウジョウバエとカイコ多角体病ウイルス機能を活用した新創薬プロセス
 研究課題名（英文） Development of novel drug screening process by using *Drosophila* disease models and silk worm Cypovirus function
 研究代表者
 山口 政光（YAMAGUCHI MASAMITSU）
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
 研究者番号：00182460

研究成果の概要（和文）：βサルコグリカンはその細胞外ドメインに EGF 様のアミノ酸配列を持っている。βサルコグリカンと EGFR との相互作用を in vitro で解析したところ両者の相互作用が確認され、またこの細胞外ドメインが EGFR との相互作用に必要であることを明らかにした。筋ジストロフィー関連遺伝子であるシントロフィン 1 と 2 遺伝子の二重変異系統の作製に成功し、両遺伝子の生体内機能を明らかにした。細胞質多角体ウイルスの VP3 由来の固定化シグナルをβサルコグリカントタンパク質に導入したコンストラクトを作製し、ショウジョウバエ培養細胞で発現させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：β-sarcoglycan contains EGF-like amino acid sequences in its extracellular domain. In vitro analyses demonstrated that β-sarcoglycan can interact with EGFR via this extracellular domain. Double mutant for Syntrophin 1 and 2 has been established. Analyses with this double mutant clarified in vivo roles of these two genes. Recombinant β-sarcoglycan tagged with Cypovirus VP3 has been successfully expressed in cultured *Drosophila* cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：遺伝学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、遺伝子、応用動物、生体分子、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

ジストロフィン関連糖タンパク質複合体 (DGC) は細胞膜に局在し、細胞外マトリックスと細胞内アクチン骨格を連結している (Circ. Res. 94, 1023-1031, 2004)。ジストロフィン遺伝子の突然変異はデュシェンヌ型やベッカー型筋ジストロフィーの原因となり、サルコグリカン複合体構成因子をコード

する遺伝子の突然変異は、常染色体劣性遺伝する肢帯型筋ジストロフィーの原因となる (Muscle Nerve 23, 1456-1471, 2000)。ヒト DGC 構成因子の遺伝子群がファミリーを作って存在しているのに対し、ショウジョウバエでは、それぞれの祖先型遺伝子が 1 つずつの場合が多く、遺伝学を用いた生体内機能解析に優れたモデルとなる (FEBS Lett, 482,

13-18, 2000)。

これまで哺乳動物培養細胞を用いた研究で、サルコグリカン複合体は、DGC 構成因子として、筋形質膜を機械的な負荷から保護し安定に保つと言われてきた (Muscle Nerve, 32, 563-576, 2005)。しかし、個体レベルでの研究が不十分なため、サルコグリカン複合体の生体内機能は未だ不明な点が多い。サルコグリカンの生体内機能を解明することは、肢帯型筋ジストロフィーの病態解明および治療法の確立に必要な不可欠である。研究代表者らは、 β サルコグリカンがショウジョウバエ発生過程で予想以上にダイナミックに、細胞内局在を変化させることを明らかにしている (Cell Struct. Funct. 31, 173-180, 2006)。また複眼原基特異的に β サルコグリカン遺伝子をノックダウンした系統を世界に先駆けて樹立し、それと種々のシグナル伝達関連因子突然変異系統の交配実験により β サルコグリカンが、Rhomboid 遺伝子を標的として EGFR (上皮増殖因子受容体) シグナル伝達経路を制御すること (Biochem. Biophys. Res. Commun. 348, 212-221, 2006) また転写関連因子 Mirror, Single-minded やカルシウムイオンチャンネル TRP と遺伝的相互作用することを世界で初めて明らかにしている。これらの成功は、さらにゲノムワイドな大規模遺伝的スクリーニングを本研究で行なうことにより、 β サルコグリカンと遺伝的相互作用する未知の遺伝子群の同定が可能であることを意味する。一方、研究分担者森はウイルス粒子が多角体に固定化される現象が、ウイルスコートタンパク質 VP3 と多角体タンパク質の相互作用によるものであることを明らかにしている (Nature 446, 97-101, 2007; Proteomics 6, 54-66, 2006)。この VP3 由来の固定化シグナルを機能性タンパク質に導入し、多角体タンパク質とともに発現させると、機能性タンパク質が多角体中に活性を保った状態で固定化されることがわかり、表面プラズモン共鳴等を利用した分子間相互作用の定量的解析に利用できるプロテインチップ開発への道を開いている。

2. 研究の目的

- ・遺伝的スクリーニング実験により β サルコグリカン遺伝子と遺伝的相互作用する遺伝子群をゲノムワイドに探索し、同定するとともにそれらの生体内機能を解明する。
- ・カイコ多角体病ウイルス機能を利用して β サルコグリカン関連タンパク質や他の疾患関連タンパク質を固定化したマイクロフローセルチップを開発する。
- ・シントロフィン等の DGC 構成因子の突然変異系統やノックダウン系統を作製し、新たなモデルショウジョウバエを開発する。
- ・各種疾患モデルショウジョウバエを組み合

わせた合成薬剤・天然物由来機能性因子のスクリーニング方法を確立し、新しい創薬プロセスを開発する。

3. 研究の方法

・筋ジストロフィー病態解明のための β サルコグリカン遺伝子の生体内機能解明：研究代表者らはショウジョウバエ複眼原基特異的に β サルコグリカン遺伝子をノックダウンすると複眼形態異常 (rough eye 表現型) が誘導されることを見出している。この rough eye 表現型を EGFR シグナル伝達経路の構成因子であるロンボイド遺伝子の突然変異が抑圧すること、さらにノックダウン系統の網膜では、ロンボイド遺伝子の発現が亢進し、それに伴い ERK の活性化が起こる。ロンボイドはゴルジ装置に局在するセリンプロテアーゼで EGFR のリガンドを活性化するので、 β サルコグリカンはロンボイド機能を通常抑制していることが考えられる。また β サルコグリカンはその細胞外ドメインに EGF 様のアミノ酸配列を持っているので、これが細胞膜上で EGFR の機能を抑制する可能性も考えられる。このモデルを検証するため抗 β サルコグリカン抗体を用いた免疫沈降を行ない EGFR が共沈するか調べる。また両遺伝子を pETDuet プラスミドにクローン化し大腸菌で共発現させた後、in vitro プルダウンアッセイを行い、両タンパク質の相互作用ドメインを決定する。

・新規診断マーカー開発をめざした β サルコグリカン遺伝子と遺伝的相互作用する遺伝子群のゲノムワイドスクリーニングと同定した遺伝子群の機能解明：筋ジストロフィーの正確な診断には、患者に負担が伴う筋生検を要し、コストと時間がかかる遺伝子診断が当用されている。そこで、筋ジストロフィー患者の血清中や尿中に放出される因子など、検出しやすい因子を同定することができれば、有用な診断マーカーになり得る。そこで筋ジストロフィーモデルショウジョウバエとストックセンターから入手可能な 20,000 系統の突然変異系統を逐次交配し、表現型を回復させる突然変異をスクリーニングし、 β サルコグリカン遺伝子と遺伝的相互作用する遺伝子群を同定する。ヒトゲノムデータベースを探索して、同定した遺伝子のヒトホモログを同定する。これらの因子の中には病態化でその発現量や局在に顕著な変化を伴うものが存在すると予想され、抗体による検出などこれらの因子を検出するアッセイ系を樹立し、診断キット開発に発展させる。

・シントロフィン等の DGC 構成因子の突然変異系統やノックダウン系統を作製し、新たなモデルショウジョウバエを開発する。: DGC 構成因子であるシントロフィン 1, 2 の突然変異系統やノックダウン系統を樹立し、両遺伝子の生体内機能を明らかにする。

・カイコ多角体病ウイルス機能を利用したβサルコグリカン関連タンパク質のマイクロフローセルチップの開発：細胞質多角体ウイルス粒子が多角体に固定化される現象が、ウイルスコートタンパク質VP3と多角体タンパク質の相互作用によるものであることを利用し、このVP3由来の固定化シグナルをβサルコグリカントタンパク質に導入したコンストラクトを作製し、多角体タンパク質とともに発現させ、βサルコグリカンを多角体中に生物活性を保った状態で固定化する。

4. 研究成果

・βサルコグリカン遺伝子とEGFR遺伝子をpETDuetプラスミドにクローン化し大腸菌で共発現させた後、*in vitro*プルダウンアッセイを行った。その結果両タンパク質の直接的相互作用が示唆された。両タンパク質の欠失変異体を作製して*in vitro*プルダウンアッセイを行った結果、βサルコグリカンの細胞外ドメイン(EGF様配列を含む)がEGFRとの相互作用に必要なことが明らかになった(論文投稿中)。一方抗βサルコグリカン抗体を用いた免疫沈降を行ないEGFRが共沈するか試みたが、これまでのところ成功していない。

・筋ジストロフィー関連遺伝子であるシントロフィン1遺伝子とシントロフィン2遺伝子の二重変異系統の作製に成功した(Nagai, R. et al. *Exp. Cell Res.* 316, 272-285, 2010)。この二重変異系統では生存率の顕著な低下が見られた(Nagai, R. et al. *Exp. Cell Res.* 316, 2313-2321, 2010)。この生存率を向上させる低分子化合物のスクリーニングを行った。約1000種類の低分子化合物のスクリーニングを行った結果、約5%の確立で候補物質が得られた。しかしながら、これらの候補化合物について2次スクリーニングを行ったが再現性の良い結果が得られなかった。今後エサに添加する化合物の量を増やす等再現性の良い結果が得られる方法を検討する必要がある。

・細胞質多角体ウイルスのVP3由来の固定化シグナルをβサルコグリカントタンパク質に導入したコンストラクトの作製に成功した。ショウジョウバエ培養細胞でこれを発現させることにより、βサルコグリカが多角体中に固定化されていることを確認している。今後その生物学的活性を測定する必要がある。

・癌や白血病など筋ジストロフィー以外の疾患モデルショウジョウバエについてもあわせて開発し、一定の研究成果が得られている。今後これら種々の疾患モデルも並行して用いて、治療薬候補物質のスクリーニングシステムの開発を試みて行きたい。

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 27 件)

1. Shimizu, T., Ishikawa, T., Iwai, S., Ueki, A., Sugihara, E., Onishi, N., Kuninaka, S., Miyamoto, T., Toyama, Y., Ijiri, H., Mori, H., Matsuzaki, Y., Yaguchi, T., Nishio, H., Kawakami, Y., Ikeda, Y., Saya, H.: Fibroblast growth factor-2 (Fgf2) is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma. *Mol. Cancer Res.* 10, 454-468, 2012 (査読有)
2. Valadez-Graham, V., Yoshioka, Y., Velazquez, O., Kawamori, A., Vazquez, M., Neumann, A., Yamaguchi, M. and Zurita, M.: XNP/dATRAX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res.* 40(4), 1460-1474, 2012 (査読有)
3. Fujiwara, S., Ida, H., Yoshioka, Y., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: The warts gene as a novel target of the *Drosophila* DRE/DREF transcription pathway. *Am J. Cancer Res.* 2 (1) 36-44, 2012 (査読有)
4. Yoshioka, Y., Ly, L. L. and Yamaguchi, M.: Transcription factor NF-Y is involved in differentiation of R7 photoreceptor cell in *Drosophila*. *Biology Open* 1, 19-29, 2012 (doi:10.1242/bio.2011013) (査読有)
5. Nishishita, N., Ijiri, H., Takenaka, C., Kobayashi, K., Goto, K., Kotani, E., Itoh, T., Mori, H., Kawamata, S.: The use of leukemia inhibitory factor immobilized on virus-derived polyhedra to support the proliferation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biomaterials* 32, 3555-3563, 2011 (査読有)
6. Yamamoto-Kihara, M., Kotani, E., Mori, H.: Characterization of a novel C-type lectin cDNA, CLEM 20 cDNA, specifically expressed in mouthparts of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*. *J. Insect Biotech. Sericol.* 80, 31-39, 2011 (査読有)
7. Lee, S.-H., Kim, I.-J., Kim, J.-G., Kim, Y.-S., Yamaguchi, M. and Yoo, M.-A.: Regulation of intestinal stem cell proliferation by human methyl-CpG-binding protein-2 in *Drosophila*. *Cell Struct. Funct.* 36 (2) 197-208, 2011 (査読有)
8. Tu Anh, N. T., Nishitani, M., Harada, S., Yamaguchi, M. and Kamei, K.: Essential role of Duox in the stabilization of *Drosophila* wing. *J. Biol. Chem.* 286, 33244-33251, 2011 (査読有)
9. Kato, Y., Ushijima, Y. and Yamaguchi,

- M.: Identification of nuclear localization signals of *Drosophila* G9a histone H3 methyltransferase. *Cell Struct. Funct.* 36, 121-129, 2011 (査読有)
10. Kawamori, A. and Yamaguchi, M.: DREF is critical for *Drosophila* bristle development by regulating endoreplication in shaft cells. *Cell Struct. Funct.* 36, 103-119, 2011 (査読有)
 11. Tu Anh, N. T., Nishitani, M., Harada, S., Yamaguchi, M. and Kamei, K.: A *Drosophila* model for the screening of bioavailable NADPH oxidase inhibitors and antioxidants. *Mol. Cell. Biochem.* 352, 91-98, 2011 (査読有)
 12. Tue, N. T., Yoshioka, Y. and Yamaguchi, M.: NF-Y transcriptionally regulates the *Drosophila p53* gene. *Gene* 473, 1-7, 2011 (査読有)
 13. Ijiri, H., Nakatani, T., Ido, H., Hamada, N., Kotani, E., Mori, H.: Immobilization of protein kinase C into cypovirus polyhedra. *J. Insect Biotech. Sericol.* 79, 15-20, 2010 (査読有)
 14. Watanabe S, Ohta M, Kokuho T, Mori H, Inumaru S.: Rapid and accurate method for isolation of recombinant baculovirus with an expanded host range. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 66-68, 2010 (査読有)
 15. Matsushima, K., Suyama, T., Takenaka, C., Nishishita, N., Ikeda, K., Ikada, Y., Sawa, Y., Jakt, L.-M., Mori, H., Kawamata, S. Secreted frizzled related protein 4 reduces fibrosis scar size and ameliorates cardiac function after ischemic injury. *Tissue Engineering Part A*, 16, 3329-3341, 2010 (査読有)
 16. Nagai, R., Hashimoto, R. and Yamaguchi, M.: *Drosophila* Syntrophins are involved in locomotion and regulation of synaptic morphology. *Exp. Cell Res.* 316, 2313-2321, 2010 (査読有)
 17. Park, J.-S., Kim, Y.-S., Kim, J.-G., Lee, S.-H., Park, S.-Y., Yamaguchi, M. and Yoo, M.-A.: Regulation of the *Drosophila p38b* gene by the transcription factor DREF in adult midgut. *Biochim. Biophys. Acta.* 1799, 510-519, 2010 (査読有)
 18. Tue, N. T., Thao, D. T. P. and Yamaguchi, M.: Role of DREF in transcriptional regulation of the *Drosophila p53* gene. *Oncogene* 29, 2060-2069, 2010 (査読有)
 19. Nagai, R., Hashimoto, R., Tanaka, Y., Taguchi, O., Sato, M., Matsukage, A. and Yamaguchi, M.: Syntrophin-2 is required for eye development in *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 316, 272-285, 2010 (査読有)
 20. Coulibaly, F., Chiu, E., Gutmann, S., Rajendran, C., Haebel, P. W., Ikeda, K., Mori, H., Ward, V. K., Schulze-Briese, C., Metcalf, P. The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106, 22205-22210, 2009 (査読有)
 21. Ijiri, H., Coulibaly, F., Nishimura, G., Nakai, D., Chiu, E., Takenaka, C., Ikeda, K., Nakazawa, H., Hamada, N., Kotani, E., Metcalf, P., Kawamata, S., Mori, H. Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized-cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials* 30, 4297-4308, 2009 (査読有)
 22. Muto, S., Tanabe, T., Matsumoto, E., Mori, H., Kotani, E. Molecular Characterization of a TIA-1 like RNA-binding protein in the cells derived from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 648-656, 2009 (査読有)
 23. Muto, S., Matsumoto, E., Tanabe, T., Mori, H., Kotani, E.: Functional analysis of the gene of BmTRN-1, an RNA-binding protein homologous to mammalian TIA-1 from the silkworm, *Bombyx mori*; a study of its overexpression and sub-cellular distribution during the baculovirus infection process. *J. Insect Biotech. Sericol.* 78, 39-51, 2009 (査読有)
 24. Kuraiishi, 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. and Nakanishi, Y.: Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *EMBO J.* 28, 3868-3878, 2009 (査読有)
 25. Puseenam A., Yoshioka Y., Nagai, R., Hashimoto R., Suyari, O., Itoh, M., Enomoto, A., Takahashi, M. and Yamaguchi, M.: A novel *Drosophila* Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size. *Exp. Cell Res.* 315, 3370-3380, 2009 (査読有)
 26. Suyari, O., Ida, H., Yoshioka, Y., Kato, Y., Hashimoto, R. and Yamaguchi, M.: Identification of the *Drosophila Mes4* gene as a novel target of the transcription factor DREF. *Exp. Cell Res.* 315, 1403-1414, 2009 (査読有)

27. Ida, H., Suzusho, N., Suyari, O., Yoshida, H., Ohno, K., Hirose, F., Itoh, M. and Yamaguchi, M.: Genetic screening for modifiers of the DREF pathway in *Drosophila melanogaster*: Identification and characterization of HP6 as a novel target of DREF. *Nucleic Acids Res.* 37, 1423-1437, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 江口晃一、吉岡泰秀、吉田英樹、宮田清司、日合弘、山口政光: キイロシヨウジョウバエ DOCK family CG31048 遺伝子の R7 光受容細胞分化への関与 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜市・パシフィコ横浜
2. Yanai, H., Nakao, Y., Yoshioka, Y., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: Involvement of dMLF in JNK signaling pathway. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜市・パシフィコ横浜
3. 梁井啓史、中尾祐美子、吉岡泰秀、吉田英樹、山口政光: ショウジョウバエ骨髄性白血病因子 dMLF の JNK シグナル伝達経路への関与 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 10 日、神戸市・神戸ポートアイランド
4. 笹山博司、島村真依、徳田隆彦、山口政光、中川正法: 遺伝性神経変性疾患 ALS (筋萎縮性側索硬化症 Amyotrophic Lateral Sclerosis) モデルシヨウジョウバエを用いた病態解析 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸市・神戸ポートアイランド
5. Yanai, H., Nakao, Y., Yoshioka, Y. and Yamaguchi, M.: Genetic screen for *Drosophila* myeloid leukemia factor (dMLF) interactants and analysis of dMLF in JNK pathway. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜市・パシフィコ横浜
6. Tue, N. T., Thao, D. T. P. and Yamaguchi, M.: DREF, a novel transcriptional regulatory factor of the *Drosophila p53* gene. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜市・パシフィコ横浜
7. Nagai, R., Hashimoto, R., Tanaka, Y., Sato, M., Matsukage, A. and Yamaguchi, M.: In vivo function of *Drosophila* Syntrophin, a component of the DGC. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜市・パシフィコ横浜
8. Mori, H.: Cypovirus polyhedra:

structure and application. International Symposium on Recent Bio-Research Works in KIT of Japan and PNU of Korea, 2009 年 9 月 11 日、韓国、釜山市・釜山大学

[その他]

ホームページ等
京都工芸繊維大学・応用生物学部門・染色体工学研究室ホームページ
(<http://www.bio.kit.ac.jp/chromosome/PUBLICATION.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 政光 (YAMAGUCHI MASAMITSU)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号: 00182460

(2) 研究分担者

森 肇 (MORI HAJIME)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号: 80201812

橋本 麗奈 (HASHIMOTO REINA)
京都工芸繊維大学・ベンチャーラボラトリー・研究員
研究者番号: 20467492

(3) 連携研究者

()

研究者番号: