

## 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：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658020

研究課題名（和文） 新規核小体GTP結合タンパク質依存的な細胞死機構の解析

研究課題名（英文） The analysis of cell death mechanism that depended on newly isolated nucleolar GTP binding protein.

## 研究代表者

常泉 和秀 (TSUNEIZUMI KAZUHIDE)

独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学研究室・専任研究員

研究者番号：40280953

## 研究成果の概要（和文）：

*Drosophila* nucleostemin 1(dNS1)の細胞死制御機構への制御方法が p53 非依存的であることを明らかにし、脊椎動物の Nucleostemin による制御方法とキイロショウジョウバエとでは細胞内シグナル伝達経路に大きな違いがあることを明らかにした。dNS1 と相互作用する因子の同定に成功し、また、直接結合し、dNS1 の活性を制御する低分子化合物の探索にも成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, I made clear that an intracellular signal-transducing pathway of dNS1 to cell death was independent from p53 and there was big difference in intracellular mechanism between vertebrate and *Drosophila*. I succeeded in the isolation of interactive factors to dNS1 and the screening for small molecular compounds that directly modulate the activity of dNS1.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：nucleostemin, apoptosis, cell death, ribosomal biogenesis, GTP binding protein

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が新たに樹立した *dns1* 機能の欠失変異株は全て致死であり、*dns1* が正常な発生に必須であることを明らかにした。dNS1 タンパク質はNucleostemin (NS) ファミリータンパク質に属し、核移行シグナルとGTP 結合ドメインを含み、抗体を用いた免疫組織染色により、普遍的に核小体に局在するタンパク質であることを観察した。しかし、脊椎動物のNS は幹細胞のみに発現し、分化誘導後に発現が消失するのに対し、dNS1 は全ての組織、全ての細胞に普遍的に発現し、両者の発現パターンが大きく異なっている。脊椎動物では、幹細胞におけるNS の機能抑制では、p53 依存的な apoptosis により細胞死が生じるのに対し、*dns1* のホモ接合体変異細胞集団を個体組織内で形成させると、細胞死により速やかに除去されることを明らかにしてきたが、この機構がp53非依存性である幾つかの実験結果を得ていたが、決定的確証を得るまでに至っていなかった。

## 2. 研究の目的

申請者はキイロショウジョウバエの複眼および翅の発生に異常の生じる変異株を樹立し、その原因遺伝子を *Drosophila nucleostemin 1 (dns1)* と同定・命名し、その機能解析を行っている。Nucleosteminファミリーに属するdNS1は個体内での局在および細胞内シグナル伝達経路に脊椎動物と大きな違いが観察され、dNS1とNS では機能に大きな差のあることが示唆された。本研究では機能の差を決定的に証明すること、および*dns1* 機能欠失による未知細胞死機構に関与する因子の同定を行うことを目的としている。そしてNucleosteminファミリー

一において多くの生物ではp53非依存的な制御機構により制御が行われていることを提唱することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 1) 遺伝学的手法による証明

*dns1* 機能欠失細胞の細胞死がp53依存性であるかの決定的証明のため、*p53* 変異と *dns1* 変異との2重変異系統を樹立する。どちらの変異も3番染色体右腕に位置するため、組織内でホモ変異細胞を解析可能な *FRT<sup>62B</sup>* 染色体と相同組み換えにより *FRT<sup>62B</sup> dns1 p53* 系統を樹立する。p53依存性な細胞死であればp53欠失により細胞死が起こらなくなり、2重変異細胞は生存可能となる。一方、p53非依存性であれば、2重変異細胞は致死となり、組織から排除される。この差を利用して *dns1* による細胞死のp53依存性を決定する。

### 2) *dns1* 抑制細胞株の樹立

個体組織ではまさに細胞死が進行している状況の観察がとらえられない。細胞死が進行している状況の観察を行う目的で、キイロショウジョウバエ培養細胞 (S2 細胞) で *dns1* 遺伝子をコンディショナルに抑制可能な株を樹立する。S2 細胞では Metallothionein (Mt) プロモーターにより、培地に銅イオンを添加することにより、銅イオンの濃度依存的に下流遺伝子の誘導が可能である。Mt プロモーター下流に *dns1* の断片500bp を回帰文 (IR) 形式で組み込み、RNAi法により *dns1* を抑制可能なプラスミドを構築し、遺伝子導入後、選択培地中にて stable transformant を樹立する。銅イオン添加時に誘導される細胞死を観察する。

### 3) 相互作用因子の同定

平行してdNS1 タンパク質と複合体を形成する相互作用因子の同定を試みる。既にdNS1 特異的抗体を用いて免疫沈降により共沈するタンパク質の同定を試みたが、非特異的に共沈するタンパク質が多く、同定まで行うことが出来なかった。本研究ではFLAGタグをNS1に融合させ、キイロショウジョウバエ幼虫個体内で過剰発現させ、より特異性の高い抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行い、非特異的なタンパク質の混入を低減させ、MALDI-TOF 質量分析装置により相互作用因子の同定を行い、相互作用解析により細胞死機構の解析を検討する。

### 4) ケミカルゲノミクスを用いる手法

dNS1 のGTPase活性を指標としてアッセイ系を構築し、dNS1の機能を制御可能な低分子化合物の探索を行い、探索した低分子化合物をケミカルプローブとして、標的タンパク質の機能解析を行う。

## 4. 研究成果

*dns1*と*p53*の2重変異をホモ接合体で持つ細胞が*dns1*変異の細胞と同様に細胞死を行う事を確認し、*dns1*変異による細胞死が*p53*非依存的であることを確定させた。このことは少なくともキイロショウジョウバエのdNS1と脊椎動物のNSによる生存維持機構とが異なることを明確に示している。本研究により予定していた*dns1* 抑制細胞株の樹立に関してはS2細胞のstable transformant 樹立の困難さにより大変難航した。細胞密度の低下による生存能力の低下を克服するために寒天培地の導入を行い、また培養上清の改良により極めて難しいS2細胞によるstable transformantの樹立を行う事に成功した。今後この細胞を用い

てdNS1の機能解析を継続する予定である。一方、相互作用因子の同定を行う事に成功し、多くのリボソーム関連タンパク質との相互作用が観察されると共に、興味深い相互作用因子を2種類同定した。哺乳類NSでも幾つかの相互作用因子が報告されているが、新たに同定したタンパク質との相互作用は未だ報告が無く、キイロショウジョウバエ特異的な相互作用因子と考えられる。これら2種のタンパク質は脊椎動物と異なるdNS1の生存維持機構に関与することが推定でき、今後詳細な解析を継続する予定である。ケミカルゲノミクスを用いた手法ではdNS1のGTPase活性を指標としたアッセイ系の構築に成功し、dNS1に結合する低分子化合物の探索により6種類の候補化合物の抽出に成功した。また、それらのうち、2種類においてdNS1のGTPase活性を変化させる活性を観察した。

## 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5件)

1. J.M. Lee, J.J. Hull, T. Kawai, K. Tsuneizumi, M. Kurihara, M. Tanokura, K. Nagata, H. Nagasawa and S. Matsumoto.

“Establishment of Sf9 transformants constitutively expressing PBAN receptor variants: application to functional evaluation.”

Frontiers in Experimental Endocrinology. 2012, In press. (査読有り)

2. E. Matsuo, T. Nagamine, S. Matsumoto and K. Tsuneizumi (corresponding author)

“*Drosophila* GTPase Nucleostemin 2

changes cellular distribution during larval development and GTP-binding motif is essential for the nucleoplasmic localization.”

Biosci. Biotechnol. Biochem. 75(8) : 1511-1515, 2011(査読有り)

3. A. Ohnishi, J. J. Hull, M. Kaji, K. Hashimoto, J. M. Lee, K. Tsuneizumi, T. Suzuki, N. Dohmae, and S. Matsumoto

“Hormone signaling linked to silkworm sex pheromone biosynthesis involves Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)-mediated phosphorylation of the insect PAT family protein *Bombyx mori* lipid storage droplet protein-1 (BmLSD1)”

The Journal of Biological Chemistry. 286(27) : 24101-24112, 2011(査読有り)

4. Y. Ogiso, K. Tsuneizumi, N. Masuda, M. Sato and T. Tabata

“Robustness of the Dpp morphogen activity gradient depends on negative feedback regulation by the inhibitory Smad, Dad.”

Development Growth and Differentiation. 53(5) : 668-678, 2011(査読有り)

5. E. Matsuo, S. Kanno, S. Matsumoto and K. Tsuneizumi (corresponding author)

“*Drosophila* nucleostemin 2 proved essential for early eye development and cell survival.”

Biosci. Biotechnol. Biochem. 74(10) : 2120-2123, 2010(査読有り)

[学会発表] (計3件)

1. 日本農芸化学会 2011 年度大会

“ショウジョウバエ新規遺伝子 *Drosophila* nucleostemin 2 の機能解析”  
松尾恵倫子、永峰俊弘、松本正吾、常泉和秀、2011/03/27、京都(東山区)

2. RIKEN Symposium on 2010 RIKEN Chemical Biology International Symposium

“Functional analysis of *Drosophila* nucleolar GTP binding protein 1 (dngbp1) in response to stress”

K. Tsuneizumi and S. Matsumoto, 2010/10/27, Saitama(Wako)

3. 日本農芸化学会 2010 年度大会

“ショウジョウバエ新規遺伝子 *Drosophila* nucleolar GTP binding protein 2 の機能解析”、  
松尾恵倫子、常泉和秀、松本正吾、2010/03/30、東京(文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常泉 和秀 (TSUNEIZUMI KAZUhide)  
独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学研究室・専任研究員  
研究者番号：40280953