

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25年 6月3日現在

機関番号：14303
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2010～2012
課題番号：22241052
研究課題名（和文） 昆虫システムを活用したヒト疾患の発症機構の解析と新たな治療薬スクリーニング法開発
研究課題名（英文） Biomedical studies of insect models for human diseases to understand their pathogenic mechanism and development of a novel screening method to identify candidates of medicines for human diseases using the insect disease models
研究代表者
森 肇 (MORI HAJIME)
京都工芸繊維大学・工学科学研究科・教授
研究者番号：80201812

研究成果の概要（和文）：ヒト ALS 原因遺伝子のショウジョウバエホモログ Caz を神経特異的にノックダウンするとハエの ALS 様症状が表れた。この結果から細胞内の凝集体形成でなく原因タンパクの機能低下が ALS の要因と推測された。ショウジョウバエのインスリン産生細胞特異的にストレス等を与えて JNK 経路を活性化すると、細胞が死滅して糖尿病症状が表れることがわかった。昆虫ウイルスが作る多角体に再生医療に必須な増殖因子 BMP-2 を固定化したタンパクチップを作製し、それを移植すると骨再生に効果があることを示した。

研究成果の概要（英文）：A neuron-specific depletion of Drosophila orthologue of human responsible gene for ALS resulted in ALS-like phenotypes in Drosophila. It is possible to speculate that ALS may be caused by a reduction of the gene products rather than accumulation of abnormal aggregates. A developmental study of Drosophila diabetes model suggests that activation of the JNK cascade by several types of stress in insulin-producing cells resulted in diabetes-like phenotypes. We constructed polyhedra immobilized BMP-2 growth factor in polyhedral microcrystals from silkworm virus and showed that the implanted polyhedra have activity of bone regeneration on rat calvarial bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	15,500,000	4,650,000	20,150,000
2011年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2012年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
年度			
総 計	33,200,000	9,960,000	43,160,000

研究分野：昆虫ウイルス学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：(1) 昆虫 (2) 生体機能利用 (3) 遺伝学 (4) 蛋白質 (5) 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーの原因遺伝子は、細胞膜

に局在する糖タンパク複合体の構成因子（サルコグリカン等）をコードする。この病気の発症機構の解明には同複合体の生体機能の理解が必要であるが、不明な点が多い。最近注目を集めるメタボリック症候群も酸化ストレスとの関連が指摘されているが、発症要因の解明には個体レベルの解析が必須である。従来、発症機構の研究や治療薬の開発にはマウス等が使われてきたが、それには膨大な経費と時間がかかる。一方、詳細な遺伝学的解析ならびに発生生物学的解析に優れたショウジョウバエにも疾患遺伝子の8割が保存されているので、疾患モデルとして大変有望である。また、最近の治療薬の開発過程では疾患関連タンパクに結合する物質から有効なものを探索するという方法がとられている。それにはタンパク機能を損なわずに基盤に固定する必要がある。研究代表者らは、カイコウイルスが作る多角体の研究を続けてきた。この多角体は一般的なタンパク結晶とは異なり、非常に強固な構造を持つ。これまで細胞増殖因子をはじめ様々なタンパクを、活性を保ったまま多角体に固定化することに成功した。カイコとショウジョウバエという昆虫システムを活用すれば、従来の疾患研究の問題点を克服できると考えた。海外ではパーキンソン病の原因遺伝子の機能解析やその治療薬の1次スクリーニングにショウジョウバエの疾患モデルがすでに使われている。その成果をもとにベンチャー企業も設立されている。この成功により昆虫をヒト疾患の研究に広く応用しようとする機運が高まっており、国際競争に勝つためにも本研究の実施は急務である。国内では海外から帰国した研究者が個別の計画を立案しているが、本研究のような大規模なプロジェクト研究の実施例はなかった。

2. 研究の目的

カイコウイルスの機能を応用したタンパク工学研究と、ヒト疾患のモデルとなるショウジョウバエ突然変異体の発生遺伝学的研究とを組み合わせ「昆虫システム」を駆使して、筋ジストロフィーやメタボリック症候群の原因とされるタンパクの生体機能を明らかにする。活性酸素がショウジョウバエ体内の細胞増殖や分化に及ぼす影響についても解析し、酸化ストレスがメタボリック症候群様表現型を誘発する機構を理解する。これら疾患の関連遺伝子群も網羅的に同定する。以上の結果を哺乳類にフィードバックして、両疾患の発症機構の解明にせまる。さらに、両疾患の鍵を握るタンパクに結合する化合物を探索したのち、その中から疾患モデルショウジョウバエの“症状”を緩和できるものを探索する。これを治療薬の一次スクリーニング法として確立できないか検討する。

3. 研究の方法

カイコウイルスに由来するタンパク固定化法を用いて、筋ジストロフィーおよび再生医療に必須な増殖因子を固定化したプロテインチップを作製する。それらを疾患のモデルとなるショウジョウバエ変異体あるいはラットなどの実験動物の体内に導入して、生体内の細胞、組織に及ぼす効果を明らかにする。筋ジストロフィーおよびALSの原因遺伝子に相同なショウジョウバエ遺伝子をノックダウンして、ヒト疾患の症状に類似した表現型が生じるか観察する。それらのショウジョウバエ系統がヒト疾患モデルとして有効か検討する。疾患モデルの表現型を変化させる突然変異をスクリーニングして、疾患関連遺伝子を網羅的に探索する。さらに1型糖尿病および2型糖尿病に相当する疾患モデルショウジョウバエを作製するために、インスリン産生細胞を欠く個体の作製およびインスリン受容体の発現が低下した突然変異体を作製する。その他、活性酸素の産生を担うヒト酵素NADPH オキシダーゼをショウジョウバエの組織特異的に強制発現できる系統、ならびに活性酸素のスキャベンジャーを産生するヘムオキシゲナーゼ(HO)をノックダウンできる系統を作製して、ヒト疾患の発症原因を明らかにする研究に有用なモデル系統を作製する。以上の疾患モデルショウジョウバエに種々の化合物、天然物を食べさせて、それらの表現型を緩和できるものを探索する。

4. 研究成果

(1) カイコウイルスが作る多角体に固定されたヒト MBP-2 を頭頂骨を除去したラットに移植したところ、骨の再生が促進された。(2) ショウジョウバエのインスリン ILP2 を固定化したカイコウイルス多角体はショウジョウバエ培養細胞のインスリンシグナル伝達経路を活性化し、増殖を促進した。これを移植した幼虫では成虫の翅等の成長促進が見られた。(3) ヒトALSの原因遺伝子の一つFUS遺伝子のショウジョウバエホモログCazを神経特異的にノックダウンすると成虫運動能力が顕著に低下した。またノックダウン3齢幼虫の運動神経・筋接合部でシナプスブランチの短縮が見られた。ALS発症のしくみとして、神経細胞でのFUS機能低下とFUSタンパク質凝集体形成のどちらが主要因かという論争があるが、凝集体の形成無しにCaz発現の低下のみでも上記表現型を示すことから、ヒトのFUS機能低下がALS発症の主要因であると推測された。(4) ショウジョウバエの活性酸素除去酵素Sod1, Sod2のノックダウン個体ではともに成虫寿命が短縮した。脳内のドーパミン神経の早期減少、筋肉内のミ

トコンドリアの損傷、ポリユビキチンを含む凝集体の早期蓄積がみられ、老化が促進されていた。また、ショウジョウバエのインスリン産生細胞 IPC 特異的にストレス等を与えて JNK 経路を活性化すると、IPC の消失、血糖値上昇がみられた。これは 1 型糖尿病の発症機構の理解に役立つ。2 型糖尿病モデルショウジョウバエの症状を緩和する化合物を 1300 種類のライブラリーを探索して候補を得た。(5)ヘムオキシゲナーゼをノックダウンしたショウジョウバエを用いてこれと遺伝学的相互作用を示す遺伝子の探索をおこない、ATM を同定した。H2A や p53 の活性化と ROS 発生の亢進を示した。(6)活性酸素産生酵素 Duox の発現を GFP でモニターできるショウジョウバエ系統、AMP キナーゼを複眼でノックダウンできる系統を作製した。これを用いて天然物(桑葉)にメタボリック症候群の抑制効果があることをみいだした。

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 64 件)

- ① Miyauchi, C., Kitazawa, D., Ando, I. and Inoue, Y. H. Orbit/CLASP is required for germline cyst formation through its developmental control of fusomes and ring canals in *Drosophila* males. : An essential gene for male germline cyst formation. PLOS One 査読有、8(3) 2013 e58220 DOI: 10.1371/journal.pone.0058220.
- ② Matsumoto, G., Ueda, T., Shimoyama, J., Ijiri, H., Omi, Y., Yube, H., Sugita, Y., Kubo, K., Maeda, H., Kinoshita, Y., Arias, D. G., Shimabukuro, J., Kotani, E., Kawamata, S., and Mori, H. Bone regeneration by polyhedral microcrystals from silkworm virus., Sci. Rep., 査読有、2 巻、2012、935. DOI: 10.1038/srep00935.
- ③ 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., 査読有、10 巻、2012、454-468 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0347.
- ④ 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., 査読有、1 巻、2012、1460-1474 DOI: 10.1093/nar/gkr865
- ⑤ Herz, H.-M., Mohan, M., Garrett, A.-S., Miller, C., Casto, D., Zhang, Y., Seidel, C., Haug, J. S., Florens, L., Washburn, M. P., Yamaguchi, M., Shiekhhattar, R. and Shilatifard, A., Polycomb repressive complex 2-dependent and independent functions of Jarid2 in transcriptional regulation in *Drosophila*., Mol. Cell. Biol., 査読有、32 (9), 巻、2012、1683-1693, DOI: 10.1128/MCB.06503-11.
 - ⑥ Bras, S., Martin-Lannere, S., Gobert, V., Auge, B., Breig, O., Sanial, M., Yamaguchi, M., Haenlin, M., Plessis, A. and Waltzer, L., MLF is a conserved regulator of RUNX transcription factor activity involved in hematopoiesis., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有、110 (13), 巻、2012、4986-4991, DOI: 10.1073/pnas.1117317109.
 - ⑦ Hiep, N. C., Kinohira, S., Furuyama, K. and Taketani, S. Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. J. Biochem. 査読有 152(6) 2012, 509-519. DOI:10.1093/jb/mvs097.
 - ⑧ Kitazawa, D., Yamaguchi, M., Mori, H. Inoue, Y. H. COPI-mediated membrane trafficking is required for cytokinesis in *Drosophila* male meiotic divisions. J. Cell Sci. 査読有、125 巻、2012、3649-3660 DOI: 10.1242/jcs.103317
 - ⑨ 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. 査読有 352(1-2) 巻 : 2011, 91-8. DOI:10.1007/s11010-011-0743-3.
 - ⑩ 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. 査読有、316 2010 272-285 DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.10.009.

[学会発表] (計 97 件)

①発表者名山本尚人・小谷英治・山本賢二・内野恵郎・瀬筒秀 樹・田村俊樹・森 肇
発表標題 カイコ後部絹糸腺における細胞増殖因子固定化多角体の発現

学会等名平成 24 年度日本蚕糸学会合同支部大会—昆虫機能・利用学 術講演会

発表年月日 2012 年 11 月 10 日~2012 年 11 月 11 日

発表場所上田市

②発表者名小谷英治・武藤清佳・森 肇

発表標題カイコ TIA-1 ホモログとバキュロウイルス核酸結合タンパク質との相互作用に関する研究

学会等名平成 24 年度日本蚕糸学会合同支部大会—昆虫機能・利用学 術講演会

発表年月日 2012 年 11 月 10 日~2012 年 11 月 11 日

発表場所上田市

③発表者名竹谷 茂

発表標題鉄シャペロン frataxin 発現の p53 による調節とミトコンドリアのヘム代謝の関係

学会等名第 85 回日本生化学会

発表年月日 2012 年 12 月 14 日~2012 年 12 月 15 日

発表場所福岡市

④発表者名島村 真衣、東 裕美子、笹山 博司、徳田 隆 彦、中川 正法、吉田 英樹、山口 政光

発表標題 Cabeza ノックダウンはショウジョウバエ成虫複眼の形態異常を誘導する

学会等名 第 35 回日本分子生物学会年会

発表年月日 2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日

発表場所 福岡市

⑤発表者名 Kitazawa, D., Miyauchi, C. and Inoue, Y. H.

発表標題 Polo and KLP3A-Feo complex are required for accumulation of Orbit/CLASP on contractile ring in Drosophila male meiosis.

学会等名 第 35 回日本分子生物学会年会

発表年月日 2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日

発表場所 福岡市

[その他]

<http://kit-ibrc.com/research/>

<https://sites.google.com/site/konchuukougaku/>

<http://www.bio.kit.ac.jp/chromosome/INDEX.html>

<https://sites.google.com/site/ibmrcdrosophila/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

竹谷 茂 (TAKETANI SHIGERU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：20121949

亀井 加恵子 (KAMEI KAEKO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：00214544

小谷 英治 (KOTANI EIJI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授
研究者番号：10273541

吉田 英樹 (YOSHIDA HIDEKI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号：30570600

井上 喜博 (INOUE YOSHIHIRO)

京都工芸繊維大学・昆虫バイオメディカル教育研究センター・准教授
研究者番号：90201938

(3) 連携研究者

()

研究者番号：