

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(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570140
 研究課題名（和文） 発生過程におけるNADPHオキシダーゼの機能解明
 研究課題名（英文） Study on NADPH oxidase function in development

研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエの発生過程、特に翅形成におけるNADPHオキシダーゼ（活性酸素種産生酵素の一種）の機能を解析した。NADPHオキシダーゼは、チロシンの架橋とメラニン形成を介した翅の硬化に関与するとともに、発生過程においてアポトーシスを抑制することを明らかにした。また、遺伝学的スクリーニングを行い、ショウジョウバエ第3染色体に触媒ドメインdDuoxの機能を調節する領域を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase is an enzyme that produces reactive oxygen species. The function of NADPH oxidase in the development, especially in the wing formation, was analyzed using *Drosophila*. We revealed that NADPH oxidase is essential for normal wing development through the melanin formation and cross-linking of tyrosine for wing sclerotization and the suppression of apoptosis. By genetic screening, the genetic region on 3rd chromosome that could interact with dDuox (catalytic domain of NADPH oxidase) was found.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：(1) 昆虫 (2) ショウジョウバエ (3) NADPH オキシダーゼ (4) 活性酸素種 (5) 発生 (6) 翅形成

1. 研究開始当初の背景

NADPH（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）オキシダーゼは触媒サブユニット Nox/Duox、p22phox、p47phox、p67phox、および低分子量グアノシントリホスファターゼ（GTPase）である Rac1 により構成されている（図1）。

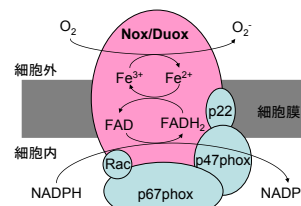


図1. NADPH オキシダーゼ。

触媒サブユニットは、5種類の Nox (Nox1~Nox5)と2種類の Duox (Duox1, Duox2)が同定されており、Nox/Duox ファミリーを構成している [Exp. Mol. Med. 2009, 41:217-25]。

NADPH オキシダーゼは食細胞において活性酸素種 (ROS) を産生し、体内に侵入したバクテリアを殺す生体防御が本来の機能と考えられてきた。一方、我々の体のすべての細胞は NADPH オキシダーゼのホモログを持っており、増殖因子やサイトカインの刺激に応じて ROS を産生する。産生された ROS は、細胞内のセカンドメッセンジャー (活性酸素シグナル) として機能し、シグナル伝達経路や転写因子の活性化を制御していることが明らかとなってきた。しかし、NADPH オキシダーゼが活性化状態として存在している時間は短く、その活性化機構など不明な点が多い。また、核にも存在することが分かっているが、その機能も不明である。

ショウジョウバエはその全ゲノム配列が解析され、ヒト遺伝子を含む任意の遺伝子を発生時期特異的かつ組織特異的に発現、あるいはノックダウンさせる方法が確立している。また、種々の突然変異系統や、染色体の特定の領域を欠失させた染色体欠失系統のバンクが存在しており、利用することができる。NADPH オキシダーゼの触媒サブユニット Nox/Duox スーパーファミリーのホモログ dDuox 遺伝子を、Act5C-GAL4 ドライバーを用いてショウジョウバエ個体全細胞でノックダウンした結果、幼虫期までに致死になることを見出した。これはショウジョウバエ dDuox 遺伝子がショウジョウバエの発生過程に必須であることを示唆しており、本研究の実施に至った。

2. 研究の目的

本研究は、ショウジョウバエを用い、発生過程における NADPH オキシダーゼの機能解明を目的とする。

- (1) NADPH オキシダーゼの触媒ドメイン dDuox をショウジョウバエ個体で発生時期・組織特異的にノックダウンさせ、発生過程への影響を調べる。dDuox のノックダウンによって形態異常が見られれば、その形態異常に至る仕組みを明らかにする。
- (2) 樹立した dDuox ノックダウンショウジョウバエ系統を、種々の突然変異系統と交配し、形態異常が次世代の個体において抑圧、あるいは増強される突然変異をゲノムワイドにスクリーニングする。これにより、dDuox 機能の促進的調節因子および抑制的調節因子といった dDuox と遺伝学的に相互作用する因子群 (Nox/Duox 細胞内情報ネットワーク) を同定する。同定した Nox/Duox 細胞内情報ネットワークを構成する各因子の機能を解析し、発生過程における NADPH

オキシダーゼの機能の全容を解明する。

3. 研究の方法

(1) dDuox ノックダウンと表現型の解析

ショウジョウバエ NADPH オキシダーゼ dDuox の RNAi を UAS 配列下流に接続したプラスミドをショウジョウバエ卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニック系統 (UAS-dDuoxIR₉₇₆₋₁₁₄₅) を樹立した。続いて、各種ショウジョウバエ GAL4 ドライバー系統と交配し、組織特異的に dDuox をノックダウンした系統を樹立し、その表現型を観察した。

(2) 抗 dDuox 抗体の作製

Canton S 系統の mRNA より、dDuox タンパク質 (418~591 番目の領域) の cDNA を作製した。pGEX-6P1 ベクターに挿入後、大腸菌 BL21 を用いて GST との融合タンパク質として発現した。GSH セファロースカラムを用いて精製後、Precision プロテアーゼ処理し、dDuox タンパク質を得た。続いて、完全フロイントアジュバントとともにモルモットに皮下注射し、抗血清を得た。抗血清を GST セファロースに通過させた後、GST-dDuox 融合タンパク質をリガンドにした Sepharose カラムに吸着させ、0.1 M グリシン-HCl (pH3) で溶出し、抗 dDuox 抗体を得た。

(3) ROS の検出

羽化直後の成虫の翅を 10 μ M CM-H2DCFDA (Molecular Probes) に 5 分間浸漬後、PBS で洗浄した。Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) を用いて封入し、蛍光顕微鏡 BX-50 (オリンパス) で観察した。

(4) チロシン 2 量体の解析

ショウジョウバエ (羽化後 3 日齢) 15 匹の翅を 6 M HCl を用いて減圧下、110°C、24 時間加水分解した。乾燥した分解物を PBS に溶解し、96 穴ウェルプレートに添加後、一晚インキュベートし、ウェルに吸着させた。洗浄後、抗チロシン 2 量体モノクローナル抗体、続いて西洋わさびペルオキシダーゼ標識 2 次抗体と反応させた。基質 α -フェニレンジアミンを添加後、492 nm の吸収をマイクロプレートリーダーによって測定した。

(5) カテコールの定量

成虫の翅 40 枚を 1 N HCl に溶解し、クエン酸鉄アンモニウムおよび 1,10-フェナントロリンと反応させた後、492 nm の吸収をマイクロプレートリーダーによって測定した。なお、L-ドーパをポジティブコントロールとして用いた。

(6) アポトーシス細胞の解析

解剖によって得た 3 齢幼虫の翅原基をパラホルムアルデヒドで固定した。続いて、ウサギ抗切断型カスパーゼ-3 抗体を反応させ、洗浄後、Alexa Fluor™ 388 (Molecular Probes) 標識抗ウサギ IgG と反応させた。翅原基は、蛍光顕微鏡 BX-50 (オリンパス) で観

察した。

4. 研究成果

(1) ノックダウン系統の表現型の解析

研究開始前に、Act5C-GAL4ドライバーを用いてdDuoxを個体全細胞でノックダウンすると、致死になることを見出していた。TubP-GAL4ドライバーを用いて個体全体でノックダウンした結果、Act5C-GAL4ドライバーと同様に致死になることを確認した。En-GAL4ドライバーおよびMS1096-GAL4ドライバーを用いて、翅原基特異的にdDuoxをノックダウンすると、オープンウイング型となった。さらに翅の色調が青味を呈し、翅脈が不明瞭となった(図2)。しかし、Ey-GAL4ドライバー、5053A-GAL4ドライバー、Ve-GAL4ドライバーを用いて複眼原基、胚縦走筋などでノックダウンした場合は、異常な表現型は認められなかった。

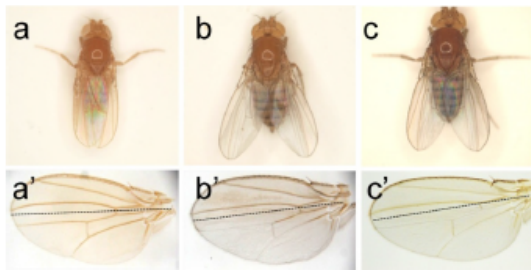


図2. 翅原基特異的dDuoxノックダウン。en-GAL4ドライバーを用いて翅原基posterior特異的(点線より下側)にdDuoxをノックダウン(b, b', c, c')すると、翅がオープンウイング型となった。また、コントロール(a, a')と比較すると翅が青味をおび、脆弱となった。なお、bとcは、dDuoxの異なる領域の配列に基づいて設計したRNAiによってノックダウンしたが、いずれも同じ表現型を示した。

(2) 翅原基特異的dDuoxノックダウンの表現型の解析

en-GAL4ドライバーによる翅原基posterior特異的dDuoxのノックダウンで得られた表現型は明瞭で容易に観察できることから、以後はen-GAL4ドライバーノックダウン系統を用い、翅形成におけるNADPHオキシダーゼの機能解析に取り組んだ。

モルモットで作製した抗dDuox抗体を用い、幼虫の抽出液をウエスタンブロッティング解析し、dDuoxタンパク質量の低下を確認した(データ未掲載)。次に翅を用いてROSを検出した結果、翅posterior特異的にROSの産生量が

顕著に低下していた(図3)。これらより、dDuoxのノックダウンの成功を確認した。

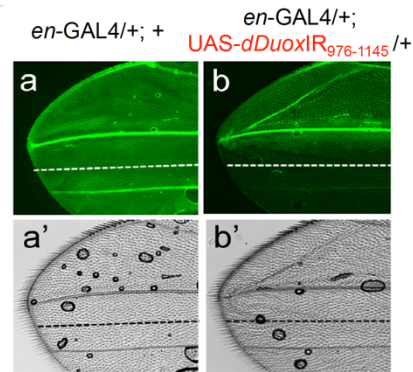


図3. ROSの検出。ノックダウン系統(b, b')では、翅posterior領域で活性酸素種の産生量が顕著に低下していた。

次に、ノックダウン系統の翅は、成虫となってからの日数とともに、ダメージが大きくなり、翅の破損が顕著になることを見いだした(図4)。

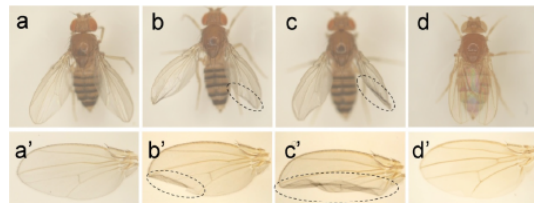


図4. 羽化後の翅の変化。羽化後、3日目(b, b')より翅posterior部分が破れはじめ、6日目(c, c')では観察したショウジョウバエ20匹すべてで翅の破損が顕著になった。一方、羽化後6日目のコントロール(d, d')では、すべてのショウジョウバエで翅の異常は認められなかった。なお、a, a'はノックダウン系統の羽化後1日目である。

(3) 翅の硬化およびメラニン形成の解析

dDuoxのノックダウンによって翅が青味がかかり、脆弱となったことから、NADPHオキシダーゼがクチクラの形成に関与している可能性が考えられた。クチクラのタンニングのメカニズムとして、チロシンヒドロキシラーゼが触媒するチロシンからドーパへの変換、続くドーパデカルボキシラーゼによるドーパからドーパキノンへの変換が知られている。ドーパキノンは反応性が高いため、非酵素的に起こる複雑な反応を経て、メラニンの生成に至る。ショウジョウバエにおいて、チロシンヒドロキシラーゼおよびドーパデカルボキシラ

一ゼは遺伝子*pale*および*Ddc*にコードされている。*Pale*および*Ddc*をそれぞれノックダウンした結果、いずれも*dDuox*ノックダウン系統と同様に、成虫の翅は青味を呈していた。しかし、いずれもオープンウィング型とはならなかった。よって、NADPHオキシダーゼが翅のタンニングに関与していることが示唆された。さらに、成虫翅に含まれるカテコールを定量した結果、コントロールと比較して有意にカテコール量が減少していた(図5左)。本結果も翅のタンニングにNADPHオキシダーゼが関与している可能性を支持している。

クチクラの硬化のメカニズムとして知られているタンパク質間の架橋を解析するため、チロシン2量体の定量を行った。図5右に示すように、ノックダウン系統の翅はコントロールと比較して有意にチロシン2量体が減少していることが明らかとなった。なお、翅の総タンパク質量およびチロシン量には有意差がない事を確かめている。

以上より、NADPHオキシダーゼの触媒ユニット*dDuox*は、活性酸素種を介してクチクラタンパク質の架橋とメラニン形成を行うことによって、翅の硬化に関与していることを明らかにすることができた。

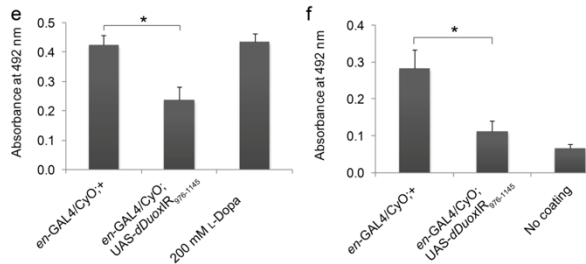


図5. 成虫翅におけるカテコール(左)およびチロシン2量体(右)の解析。平均値±SD、*P<0.05。

(4) ノックダウン系統の翅原基におけるアポトーシスの解析

遺伝子*Pale*および*Ddc*をそれぞれノックダウンすると、*dDuox*ノックダウン系統と同様に成虫の翅は青味を呈したが、いずれもオープンウィング型とはならなかった。これより、NADPHオキシダーゼのノックダウンによる表現型オープンウィング型は、翅の脆弱性をもたらす機構とは異なる可能性が示唆された。そこで、翅形成における翅原基でのアポトーシスの解析を試みた。3齢幼虫より翅原基を取り出し、抗切断型カスパーゼ-3抗体を用いた組織免疫染色を行った結果を図6に示す。*dDuox*ノックダウン系統のposterior(図6b, e)では、コントロール(図6a, d)と比較して

有意にアポトーシス細胞が増加していた。

ショウジョウバエでは、アポトーシスのポジティブ制御因子として3つの遺伝子

(reaper, head involution defective [hid], grim)が同定されており、それらはlocus 75C1-2に位置している。これらの3つの遺伝子を欠失した*Df*(3L)H99系統を*dDuox*ノックダウン系統と交配し、得られたヘテロ接合体の表現型を解析した。その結果、*dDuox*ノックダウンによる表現型は抑制され、ほぼコントロール系統と同じ表現型を示した。さらに、ヘテロ接合体の3齢幼虫について翅原基でのアポトーシスを検討した結果、アポトーシスが顕著に抑制されていた(図6c, f)。これらの結果から、*dDuox*のノックダウンによってもたらされる表現型に翅原基におけるアポトーシスの増加が関係しており、NADPHオキシダーゼはアポトーシスの抑制に機能していることが明らかとなった。

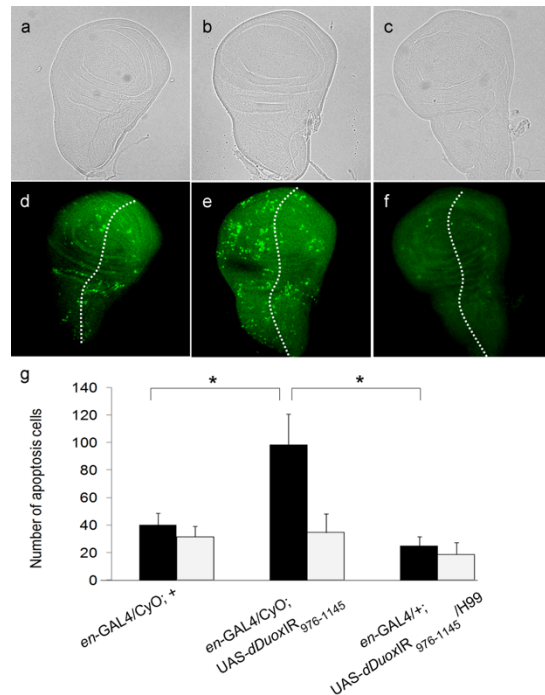


図6. 3齢幼虫の翅原基におけるアポトーシス細胞。各切片の写真に示した点線はanteriorとposteriorの境界で、点線の左側がposterior、右側がanteriorである。グラフはアポトーシス細胞の数を示しており、*dDuox*ノックダウン系統の翅原基posterior(b, e)では、コントロール(a, d)と比較して有意にアポトーシス細胞が増加していた。また、*dDuox*ノックダウン系統と*Df*(3L)H99系統の交配で得られるヘテロ接合体(c, f)では、*dDuox*ノックダウン系統と比較して、アポトーシス細胞が有意に減少していた。

(5) dDuoxと遺伝学的に相互作用する因子のスクリーニング

en-GAL4ドライバーによるdDuoxノックダウン系統は翅で顕著な表現型を示すが、それ以外は生殖も含めて正常に生育する。したがって、dDuox機能の促進的調節因子および抑制的調節因子といったdDuoxと遺伝学的に相互作用する因子のスクリーニングに有用である。本研究では、第3染色体欠失系統87種類を用いて、dDuoxノックダウン系統と交配し、得られるF1の翅の表現型を解析した。その結果、欠失系統12種類との交配において、dDuoxノックダウンによる翅の形態異常がF1の個体で抑圧され、野生型と同様の形態を示すことを見いだした(図7)。これらの欠失領域にはwinglessシグナルやNotchシグナルに関連する遺伝子が含まれており(表1)、dDuox機能の促進的調節因子の可能性が考えられる。

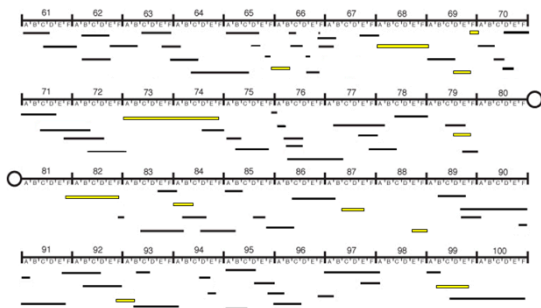


図7. 第3染色体欠失系統を用いた遺伝学的スクリーニング。唾液腺染色体の領域番号を示しており、用いた系統の染色体欠失領域を横線で表している。dDuoxノックダウン系統との交配によって得られるF1において、dDuoxノックダウンの表現型と変化がないものを黒色、表現型が抑圧されたものを黄色で示している。

(6) まとめ

触媒ドメインdDuoxの組織特異的ノックダウンにより、ショウジョウバエにおけるNADPHオキシダーゼの機能の一端を明らかにすることができた。特に、翅形成におけるNADPHオキシダーゼの機能について解析し、NADPHオキシダーゼが産生するROSによるチロシン2量体化(タンパク質間架橋)およびメラニン形成による翅の硬化、アポトーシスの抑制が正常な翅形成に必須であることを明らかにした。また、第3染色体欠失系統を用いた遺伝学的スクリーニングにより、NADPHオキシダーゼの機能を促進する染色体領域を見いだした。本研究結果はNADPHオキシダーゼの機能解明に迫るものである。今後、それらの遺伝子領域に含まれるNADPHオキシダーゼの機能調節因

子の本体を同定し、その調節機構の解明が望まれる。

| DGRC Number | Genotype | Break points/Insertion Site |
|-------------|--|--|
| 106707 | Df(3L)pbl-X1 / TM6B, Tb[1] | 065F03;066B10 |
| 106722 | Df(3R)Scr, p[p] e[s] / TM3, Sb[1] | 084A01-02;084B01-02 |
| 107089 | Df(3R)L127 / TM6, Dp(3;1)B152 | 099B05-06;099E04-F01, 098F:100F |
| 107518 | Df(3L)81k19 / TM6B, Tb[1] | 073A03;074F |
| 107523 | Df(3R)ry615 / TM3, Sb[1] Ser[1] | 087B11-13;087E08-11 |
| 107708 | In(3LR)C190[L]Ubx[42TR], Ubx[-] / st[1] | 070A01-02;070C03-04 + 089;089 (small df somewhere in 89) |
| 107882 | Df(3R)3-4, ru[1] th[1] st[1] / TM3, Sb[1] Ser[1] | 082F03-04;082F10-11 |
| 108498 | y[1] w[1]; Df(3L)HD1 / TM6C, Sb[1] Tb[1] | 079D03-E01;079F03-06 |
| 108785 | Df(3L)BSC10, rho[ve-1] e[1] / TM3, Ser[1] | 069D04-05;069F05-07 |
| 108786 | Df(3L)BSC12, rho[ve-1] e[1] / TM3, Ser[1] | 069F06-070A01;070A01-02 |
| 108899 | Df(3R)Jea, kni[ni-1] p[p] / TM3, Ser[1] | 088E07-13;089A01 |
| 130351 | Df(3R)BSC43, st[1] ca[1] / TM2, p[p] | 92F7-93A1;93B3-6 |

表1. dDuoxの調節因子を含む遺伝子領域。dDuoxノックダウン系統との交配によって得られるF1において、dDuoxノックダウンの表現型が抑圧された系統の遺伝子型を示す。

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2件)

1. Nguyen Thi Tu Anh, Maiko Nishitani, Shigeharu Harada, Masamitsu Yamaguchi, and Kaeko Kamei. Essential role of Duox in stabilization of *Drosophila* wing. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(38), pp. 33244-33251 (2011). 査読有

2. Nguyen Thi Tu Anh, Maiko Nishitani, Shigeharu Harada, Masamitsu Yamaguchi, and Kaeko Kamei. A *Drosophila* model for the screening of bioavailable NADPH oxidase inhibitors and antioxidants. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 352(1-2), pp. 91-98 (2011). 査読有

[学会発表] (計2件)

1. Nguyen Ti Tu Anh, 西谷真依子, 山口政光, 亀井加恵子. Essential role of Duox in stabilization of *Drosophila* wing. 日本分子生物学会, 2011年12月13日、横浜市。

2. Nguyen Ti Tu Anh, 西谷真依子, 山口政光, 亀井加恵子. Role of Duox oxidase in wing development of *Drosophila melanogaster*. 日本分子生物学会, 2010年12月7日、神戸市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：