

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570006

研究課題名(和文) 消化管の吸収・排泄機能による恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of homeostasis by absorption and excretion in the digestive tract

研究代表者

中越 英樹 (Nakagoshi, Hideki)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：50314662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエのマルピーギ管は哺乳類の腎臓に相当する器官であり、体液中の老廃物を体外に排出して適切なイオンバランスを保っている。ショウジョウバエのホメオドメイン型転写制御因子 Defective proventriculus (Dve) は、マルピーギ管細胞の機能分化、高塩分食などのストレスに対する応答に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* have functions homologous to those of mammalian kidney, and maintain homeostasis by excreting waste matter from the body fluid. This study has shown that the homeodomain transcription factor Defective proventriculus (Dve) is essential for functional differentiation of these cells and their stress response to high-salt diet.

研究分野：発生遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・ゲノム動態

キーワード：ショウジョウバエ マルピーギ管 ストレス応答

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はショウジョウバエの新規ホメオボックス遺伝子 *dve* をクローニングし、これまで *dve* 遺伝子の時間・空間特異的な発現制御がさまざまな生理活性制御に関与していることを明らかにしてきた。腸管の銅吸収細胞 (copper cell) における時間・空間特異的な *dve* 発現抑制は、銅吸収機能の獲得に必須である。

銅 (Cu)、鉄 (Fe)、亜鉛 (Zn) などの金属イオンは生体にとっての必須元素であり、多くの酵素の活性中心として要求される。銅イオン平衡の乱れは神経変性疾患を引き起こすことなども報告されており、銅吸収過程の制御メカニズムの理解は重要な課題である。

また、ショウジョウバエ腸管の銅吸収細胞領域が担う酸分泌機能には、プロトンポンプ V-ATPase の関与が推定されている (J. Cell Sci. 2006)。V-ATPase は、細胞外環境や細胞内オルガネラ (エンドソーム、リソソームなど) を酸性化することによってさまざまな生理機能を制御する (Nature Review Mol. Cell Biol. 2002)。また、細胞内外に形成されたプロトン勾配はイオンチャンネルやトランスポーターを駆動する。たとえば、小腸や腎尿管上皮細胞刷子縁膜に発現するプロトン駆動型ペプチドトランスポーター (PEPT1, PEPT2) はペプチド吸収活性を担うが、その基質選択性は低く、ペプチド構造を持つ薬剤なども吸収する。このため、創薬のターゲットとしても注目されており、腸管におけるプロトン勾配の制御機構を明らかにすることの意義は大きい。

研究代表者は、ショウジョウバエ銅吸収細胞と交互に隣接して存在する間質細胞 (interstitial cell) で受容された Notch, Wingless (Wg), Dpp などのシグナルが隣の銅吸収細胞に伝達されることで2つの機能 (銅吸収機能, 酸分泌機能) が獲得されるこ

とを明らかにした (Tanaka et al., Dev. Biol. 2007)。この成果は、「細胞間情報伝達を介した機能分化」のメカニズムを解析するための優れたモデル系を提供するものである。これまでの研究成果として、(1) V-ATPase がプロトンポンプとしてだけでなく、細胞内輸送経路を介して細胞間情報伝達に関与すること、(2) 銅吸収機能と酸分泌機能獲得過程には、異なる Rho ファミリー GTPase 活性が間質細胞で要求されること、(3) 腸管機能獲得過程において *dve* 遺伝子発現のアイソフォーム変換が起きていること、(4) 時間・空間特異的な *Dve* 活性が、*dve* 遺伝子発現のアイソフォーム変換と腸管機能獲得にきわめて重要であることを明らかにしてきた。また、細胞間の接着構造に注目して解析を行ったところ、腸管内胚葉上皮に特有の細胞接着構造 smooth septate junction (sSJ) の構成因子: Discs large (Dlg), Coracle (Cor) が腸管の機能獲得に重要であるという興味深い知見を得た。

また、体液循環の酸-塩基平衡を担う重要な器官としてマルピーギ管 (ヒトの腎臓に相当する器官) が知られており、マルピーギ管における *dve* の機能阻害も酸-塩基平衡に異常を引き起こすことを示唆する結果を得ていた。

2. 研究の目的

本研究は、ショウジョウバエの腸管およびマルピーギ管をモデルとして、銅吸収機能、酸分泌機能の制御に関わる因子としてこれまで研究代表者が同定してきた分子群の相互関係を明らかにすることで、「細胞間情報伝達を介した細胞機能分化」の解明を目指す。また、腸管とマルピーギ管における *dve* 遺伝子の機能解析から、酸-塩基平衡を制御する共通のメカニ

ムおよび組織特異的な制御機構を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) マルピーギ管における酸-塩基平衡の制御機構解析

研究代表者は、ショウジョウバエ腸管の機能制御に注目して解析を行い、腸管細胞の銅吸収機能および酸分泌機能の両方に必要な因子として V-ATPase の c サブユニットをコードする *vha16* 遺伝子を同定した。*vha16* 遺伝子の発現は、腸とマルピーギ管で強く認められた。さらに、標的細胞特異的に *vha16* の二本鎖 RNA (dsRNA) を発現させ、RNA 干渉によって *vha16* 遺伝子の機能阻害を誘導できる系統を樹立し、腸管細胞種特異的な *vha16* の要求性を明らかにした。ショウジョウバエは開放血管系であり、体液中の老廃物がマルピーギ管によって体外に排泄される際、プロトンポンプ V-ATPase の作用によって管腔内を低 pH にすることで老廃物を尿酸結晶として排泄している。*vha16* 阻害個体では尿酸結晶の生成が異常になるが、*dve* 変異体において観察された類似の表現型を詳細に解析し、腸管細胞の酸分泌制御との共通性を探る。

(2) マルピーギ管細胞の機能分化における Dve の要求性について

マルピーギ管発生過程における経時的な Dve 発現パターンを詳細に調べ、各種マーカー (Cut, *teashirt*, *unpaired*, STAT92E など) との比較によって、発現細胞種を特定する。

マルピーギ管特異的に *dve* 変異モザイクあるいは RNAi を誘導した際のマーカー発現、分化マーカーの発現を調べ、機能分

化における Dve 活性の要求性を検証する。

dve ノックダウン個体におけるマルピーギ管機能を評価する指標として、通常の飼育環境における寿命、および塩ストレス負荷をかけた場合の寿命への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) マルピーギ管における酸分泌の制御

dve 変異体において観察されていた前部マルピーギ管における異所的な尿酸結晶生成は、遺伝的背景に依存したものであり、*dve* RNAi の誘導によっても異所的な尿酸結晶は生成されなかった。

(2) マルピーギ管細胞の機能分化における Dve の要求性について

マルピーギ管は2種類の細胞、主細胞と星状細胞によって構成される。主細胞は外胚葉由来で核が大きく特異的に転写制御因子 Cut を発現する。それに対し、星状細胞は中胚葉由来で核が小さく特異的に転写制御因子 *Teashirt* (Tsh) を発現する。Dve には2種類のアイソフォーム (Dve-A, Dve-B) が存在し、Dve-A は3齢幼虫期以降の全ての領域で発現しており、星状細胞よりも主細胞での発現が強いこと、そして Dve-B は主細胞で強く発現し、星状細胞では発現していないことが明らかとなった。

Dve を強制発現した星状細胞の核は一回り大きくなり、主細胞特異的に発現する Cut の発現が誘導された。興味深いことに、Dve の発現が増加した星状細胞の細胞境界において、セプテートジャンクション構成因子 *Discs large* (Dlg), *Coracle* (Cor) の発現が増強していることも観察された。

Dve の発現が完全に消失した主細胞の核は有意に小さくなり、Cut の発現も消失した。また Dlg, Cor の発現も消失していた。つまり、一度決定されたマルピーギ管細胞の運命

は, *Dve* の発現レベルに応答して正しく維持されるという可能性が強くと示唆された。*dve* 変異細胞では, 主細胞で発現するプロトンポンプ V-ATPase の発現も低下していることが明らかとなり, 主細胞の形質維持に *Dve* の機能が非常に重要であることが示された。*dve* 変異細胞は主細胞の形質を失い, *Dve* を強制発現した星状細胞の核は一回り大きくなり, 主細胞特異的に発現する *Cut* の発現が誘導された。

このような *Dve* 強制発現星状細胞では, 星状細胞形質 (水輸送チャンネル *Drip* の発現) が抑制されていることが予想されたが, *Drip* の発現はむしろ上昇していた。この興味深い現象は, *Dve* によって発現量あるいは安定性が増加したセプテートジャンクション構成因子によって *Drip* が安定化した結果であるという知見を得た。機能獲得のために *Dve* 活性を必要とする中腸細胞においても, セプテートジャンクション構成因子が機能分化を制御していることから, セプテートジャンクションを介した制御が細胞機能分化に重要な役割を果たしている可能性が強くと示唆された。

マルピーギ管特異的な *dve* ノックダウン個体は, 通常飼育条件下での寿命には影響を与えないものの, 塩ストレス条件下では有意に寿命が短縮することが明らかとなり, ストレス応答による体液恒常性の維持に *Dve* の機能が重要であることが明らかとなった。

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4件)

Ryunosuke Minami, Miyuki Wakabayashi, Seiko Sugimori, Kiichiro Taniguchi, Akihiko Kokuryo, Takao Imano, Takashi

Adachi-Yamada, Naoko Watanabe, Hideki Nakagoshi

The homeodomain protein Defective proventriculus is essential for male accessory gland development to enhance fecundity in *Drosophila*

PLoS ONE 7, e32302 (2012) 査読有

doi:10.1371/journal.pone.0032302

Takeshi Yorimitsu, Naruto Kiritooshi, Hideki Nakagoshi

Defective proventriculus specifies the ocellar region in the *Drosophila* head

Dev. Biol. 356, 598-607 (2011) 査読有

doi:10.1016/j.ydbio.2011.06.015

Yoshiki Nakagawa, Shinobu

Fujiwara-Fukuta, Takeshi Yorimitsu, Suzuka Tanaka, Ryunosuke Minami, Lily Shimooka, Hideki Nakagoshi

Spatial and temporal requirement of Defective proventriculus activity during *Drosophila* midgut development

Mech. Dev. 128, 258-267 (2011) 査読有

doi:10.1016/j.mod.2011.02.003

Robert J. Johnston Jr., Yoshiaki Otake, Pranidhi Sood, Nina Vogt, Rudy Behnia, Daniel Vasiliasuskas, Elizabeth McDonald, Baotong Xie, Sebastian Koenig, Reinhard Wolf, Tiffany Cook, Brian Gebelein, Edo Kussell, Hideki Nakagoshi* and Claude Desplan* (* corresponding authors)

Interlocked feedforward loops control cell-type-specific Rhodopsin expression in the *Drosophila* eye

Cell 145, 956-968 (2011) 査読有

doi: 10.1016/j.cell.2011.05.003

[学会発表](計5件)

廣瀬篤, 高橋一男, 中越英樹
ショウジョウバエ熱ショックタンパク質

HSPs による幼虫中腸機能の制御
中国四国地区生物系三学会合同大会 (2014
年5月10-11日, 岡山)

中越英樹

ショウジョウバエ中腸細胞の機能分化制御
(招待講演)

第 58 回 日本応用動物昆虫学会大会 (2014
年 3 月 28 日, 高知)

Naoto Kifuku and Hideki Nakagoshi

Functional analysis of the transcription
factor Dve in *Drosophila* malpighian
tubules

The 2nd Asia-Pacific *Drosophila* Research
Conference (May 13-16, 2013, Seoul, Korea)

来福七央人, 中越英樹

ショウジョウバエマルピーギ管における転
写制御因子 Dve の機能解析

日本分子生物学会第 35 回年会 (2012 年 12
月 11-14 日, 博多)

田中鈴香, 下岡リリー, 中越英樹

Intercellular communication through
septate junctions is required to establish
midgut functions in *Drosophila*

日本分子生物学会第 34 回年会 (2011 年 12
月 13 日, 横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/nakagoshi/Kinou.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中越 英樹 (NAKAGOSHI, Hideki)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号 : 50314662

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者

来福 七央人 (KIFUKU, Naoto)

岡山大学・大学院自然科学研究科・大学院生