

ショウジョウバエ遺伝資源センター設立10周年記念行事

# バイオリソースシンポジウム

# BIORESOURCE SYMPOSIUM



DGRC

10th anniversary **DGRC**

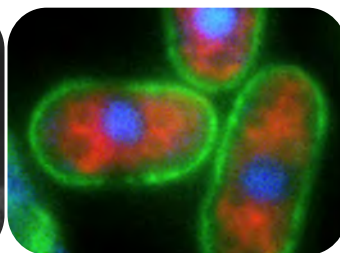
ナショナルバイオリソースプロジェクト

## “KYOTO BRAND” 高品質遺伝資源の開発

日時：平成21年10月23日（金）13:00～17:45

場所：京都工芸繊維大学 松ヶ崎キャンパス 総合研究棟4階多目的室

ショウジョウバエ、ラット、酵母を用いて第一線で活躍している研究者を招き、遺伝資源の高品質化と新規有用遺伝資源の開発にむけた先端研究の紹介を通じて、遺伝資源のあり方について考える。





## シンポジウムを企画するにあたって

2010年までに世界最高水準のバイオリソースを収集・維持・提供する基盤整備を目標とした国家プロジェクト「ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP)」が2002年度に発足し、現在も第2期 NPRP として継続実施されている。生物遺伝資源としてライフサイエンス、理学、薬学、農学などの研究に使用されるためには、そのシステムを使用する事そのものが、研究推進の確実な第一歩になると信頼されるシステムが最優良システムと位置づけられる。このようなシステムを開発するには、研究の評価が国際的に高く認知され、開発されたシステムの付加情報も正確・豊富でなければならない。しかも迅速な提供体制が整備されている必要がある。このように高く評価される高品質システム「京都ブランド (KYOTO BRAND)」をいかに創り出すかが重要である。

そこで、本シンポジウムでは、「京都ブランド (KYOTO BRAND)」という合い言葉を掲げ、優良遺伝資源の開発・維持・提供を目指しているショウジョウバエとラット、それに酵母から、第一線で活躍している先導的研究者及び若手研究者を招き、KYOTO BRAND から KANSAI BRAND への発展、各種先端研究における遺伝資源の重要性の広報、ならびにさらなる研究推進と新たなリソースの開発につながる活性化を狙いつつ、議論を交換する機会としたい。

謝辞：本シンポジウムの開催にあたり、バイオリソースプロジェクト経費、3大学連携研究支援費の援助を受けました。

京都工芸繊維大学  
ショウジョウバエ遺伝資源センター長  
山本雅敏

## 分子医学におけるショウジョウバエ研究の重要性

加藤 茂明・沢津橋 俊

(東京大学分子細胞生物学研究所、科学技術振興機構 ERATO)

多細胞生物を構成する種々の細胞は、遺伝情報として同じセットのゲノム DNA を有しており、同一の遺伝情報から選択的に遺伝子発現することで、細胞種固有の形質が規定される。このような遺伝子発現調節機構として、近年、DNA メチル化、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリングといったエピジェネティックな制御機構が注目されている。また、このエピジェネティクス制御系の破綻は、個々の細胞固有の形質が損なわれ、異常な細胞が生じる原因となるため、癌をはじめとする疾患の観点からも重要な問題である。

我々はショウジョウバエにおいて脱皮・変態を制御する核内受容体型転写因子エクダイソンレセプター(EcR)とそのリガンドであるエクダイソン(Ec)依存的に誘引されるパフ(puff)を転写活性化に伴うクロマチン構造変換のモデルと捉え、このパフに局在化するクロマチン構造調節因子の探索を試みた。このスクリーニングには GFP プロテイントラップシステムライブラリーを利用し、GFP 融合タンパク質が EcR と共局在を呈する系統を選抜した。この結果、白血病関連因子ヒト DEK(hDEK)のショウジョウバエホモログ *Drosophila* DEK (dDEK)の同定に成功した。dDEK は EcR 標的遺伝子の発現に必要な新規転写共役因子であるとともに、カゼインキナーゼ(CK)2 と複合体を形成することで、ヌクレオソーム形成活性を発揮し、ヒストンの置換反応に関与する新規ヒストンシャペロンであることが判明した。これまでに、hDEK はある種の白血病患者における転座型変異(融合遺伝子 DEK-CAN)やがん細胞での発現亢進が報告されているものの、その分子機能についてはほとんど解析が進んでいない。驚くべきことに、変異型 DEK-CAN 融合タンパク質は hDEK-CK2 の複合体形成を阻害することが明らかとなり、そのヒストンシャペロン機能を失うことが推察された。

以上の結果、ショウジョウバエシステムライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングから、白血病関連因子 DEK のヒストン置換を介した新たなクロマチン構造調節因子としての機能を見出すことができ、さらには、このクロマチンリモデリングの破綻が、白血病をはじめとする疾患につながる可能性を示唆することができた。

# ショウジョウバエを用いた神経行動学

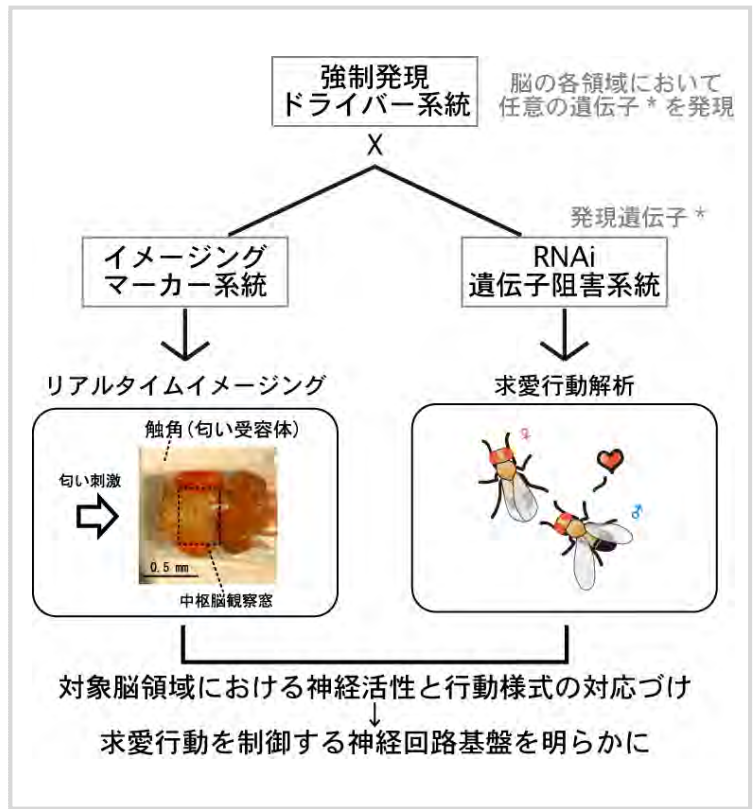
江島亜樹（京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット）

私たちは自身を取り巻く複雑な環境からどのように必要な情報を得、応じた行動判断を行っているのか？刻々と変化する環境に対応するためには、入力した全ての感覚情報を等しく処理するのではなく、新しく生じた新規の情報に特に注意を払う事が必要になってくる。ヒトを含む多くの動物の感覚系では、恒常シグナルへの感受性を低下させる順応機構が存在し、目新しい新規シグナルに選択的に反応する事を可能としている。しかし、その生理学および神経回路学的基盤は大部分が未知のままである。

本研究ではキイロショウジョウバエの求愛行動を制御するフェロモン受容機構をモデルシステムとして、オスがどのように自分の匂いであるオスフェロモンに邪魔されずに相手個体の性フェロモンを正しく判断するのか、昆虫微小脳内における神経活性を記録（*in vivo* リアルタイムイメージング）し、嗅覚系中枢領域におけるフェロモン応答活性を直接的に解析する。

キイロショウジョウバエにおいては特定遺伝子の局所的発現を可能とする強制発現システムのコレクションが広く利用可能となっており、これを用いて脳の様々な領域において局所的にイメージングマーカーを発現させ、各嗅覚受容体神経グループの反応を調べる事ができる。また、内在性の遺伝子発現を阻害する RNAi 系統のライブラリと組み合わせたコンディショナル変異体の行動解析と対応させる事により、感覚系におけるバックグラウンド・キャンセリング機能を担う神経機構のモデルモジュールを構築する。

嗅覚受容体神経細胞、局在神経細胞および投射神経細胞によって構成される嗅覚系中枢構造はほほ哺乳類を含む多くの動物で高度に保存されており、キイロショウジョウバエの豊富な遺伝学手法と組み合わせた神経活性リアルタイムイメージングは、高次脳における感覚情報処理機構の根源的知見を提供するものと期待される。夜行性動物やガヤカを含む多くの昆虫にとって嗅覚シグナルはその生存／生殖において非常に重要な役割を担っているため、動物の嗅覚シグナル制御機構の解明は、広く脳神経研究の分野に貢献するだけでなく、害獣／害虫の制御手段の開発に直接的に寄与する事が期待される。



## ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」と新規ラットリソースの開発

芹川忠夫 (京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

実験用ラットは、取扱いが容易で外科的な処置や多様な目的に応じた生体試料の採取が可能な手頃な大きさである。それゆえ、ラットは古くから解剖学、栄養学、生理学、遺伝学、繁殖学、薬理学、病理学などにおける基礎研究や医薬品候補物質などの評価試験や安全性試験に多用されてきた。今では遺伝と環境を厳格にコントロールした実験を行うことができる優れたツールに高められており、ラットはライフサイエンスを支える代表的な実験動物の一つとして位置づけられる。

平成 14 年度より我々の動物実験施設が中核機関となり世界最高水準を目標にしたナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)が発足した。これは、日本のみならず諸外国をも対象にしたラット系統の「収集・保存・提供」事業であり、今では疾患モデルラットを含めて 500 以上のラット系統が収集され、個々のラット系統の基礎情報がユーザーフレンドリーなデータベースにより、以下のホームページから公開されている。<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/NBR/>

また、NBRP-Rat とは別に、新規の遺伝子変異ラットを開発することを目的に、化学変異原エチルニトロソウレア(ENU)を用いたミュータジェネシスの新たなリソース基盤を構築している。これは、ゲノム DNA にランダムな遺伝子変異が加えられた F344/NSIc ラットの G 1 雄 5,000~10,000 頭から得た個々の DNA と凍結精子のセットであり、京都大学ラットミュータントアーカイブ(KURMA)と名付けて保存している。そして、点突然変異を廉価で、短時間、効率的にスクリーニングできる MuT-POWER 法による DNA スクリーニングと、これに対応する保存精子の顕微授精により、ヒトと類似の遺伝子変異をもつ疾患モデルラットを作製している。ここでは、成功した熱性けいれんラットと大腸がんモデルラットの例を紹介する。



### 参考文献

1. Serikawa, T.: Colourful history of Japan's rat resources. *Nature* 429(6987):15, 2004.
2. Mashimo T, et al.: An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nature Genetics*. 40(5):514-515, 2008.
3. Serikawa, T. et al.: National BioResource Project-Rat and related activities. *Exp Anim* 58(4):333-341. 2009
4. Yoshimi K. et al. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc* mutant rat. *Cancer Sci*. 2009 Jul 17. [Epub ahead of print]

## ラットを用いた糖尿病研究

横井伯英（神戸大学大学院医学研究科 細胞分子医学）

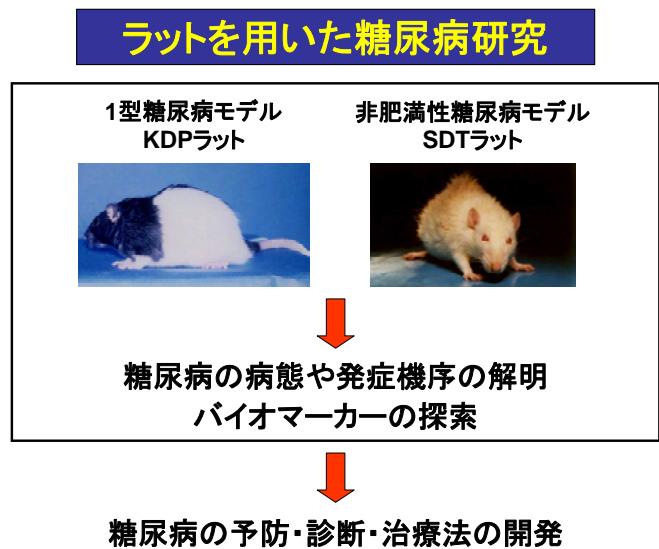
世界の2007年の糖尿病人口は2億4,600万人（有病率6%）、2025年には3億8,000万人（有病率7.3%）と試算されており、糖尿病は地球規模で増加している。我が国では2007年の統計によると糖尿病が強く疑われる人（約890万人）や可能性を否定できない「予備群」（約1,320万人）が、合わせて2,210万人と推計されている。糖尿病では重篤な合併症を伴うことが多く、網膜症による失明、腎不全による人工透析の導入、神経障害、動脈硬化症による心筋梗塞、脳梗塞や壊疽による下肢の切断など、著しくQOLを損なう。

現在、糖尿病はその成因によって分類されており、インスリンを分泌する膵β細胞が破壊されることによるものを1型糖尿病（糖尿病の5~10%）、インスリン分泌不全あるいはインスリンの標的臓器におけるインスリン抵抗性またはこの両方によるものを2型糖尿病（糖尿病の90%）という。どちらのタイプの糖尿病においても、遺伝因子と環境因子およびそれらの相互作用が発症に関与する。糖尿病を治療することは困難であるため、将来的には、発症を予知あるいは予備軍を早期発見し、予防する医療を実現することが最善である。

糖尿病の病態や発症機序を詳細に解析するには、動物モデルを用いた研究が不可欠である。特にラットにおいては、多くの優れたモデルが我が国で開発されてきた。近年では、1型糖尿病を自然発症する Komeda diabetes-prone (KDP) ラットや非肥満性糖尿病を自然発症する Spontaneously diabetic Torii (SDT) ラットなどが挙げられる。

これまで我々は、KDPラットの主要な1型糖尿病遺伝子として Cblb (Casitas B-lineage lymphoma b) を同定し、SDTラットにおいて7個ほどの糖尿病関連遺伝子座を同定するなど、主に遺伝学的解析を行ってきた。最近では、これらの動物モデルから採取した血液を試料として、質量分析計を用いたメタボローム解析による糖尿病のバイオマーカーの探索を行っている。

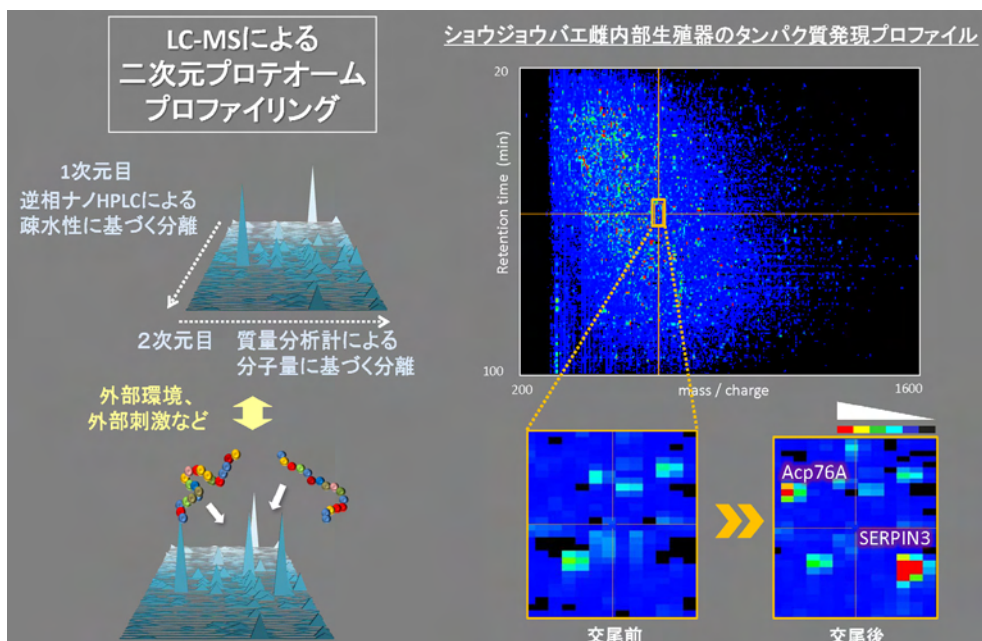
本シンポジウムでは、我々が行っているラットを用いた糖尿病研究を紹介すると共に、バイオソースの重要性や今後の展開について考えてみたい。



## 質量分析法によるショウジョウバエの分子プロファイリング

武森信暁・山本雅敏（京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センター）

生命科学分野の研究基盤となる遺伝資源は、高い再現性が求められる最先端研究に不可欠であり、変異体を始めとする各種系統の高品質管理が必須となる。世界最大規模のショウジョウバエ系統センターであるショウジョウバエ遺伝資源センターでは、研究者からの高い信頼性を得る系統維持を今後 10 年の計画として掲げ、国際的に最も優良な系統センターとなることを目指している。そのため、現行の表現型モニタリング作業に加えて様々な分子レベルでの品質管理を模索しており、現在は遺伝子の翻訳後産物であるタンパク質を対象にしたモニタリング技術の確立を目指し、最新の質量分析法と微量タンパク質分離技術を駆使した大規模タンパク質発現解析システムの構築を行っている。ゲル電気泳動やナノ流量での HPLC を用いたタンパク質分離とソフトイオン化質量分析による高速かつ高感度なタンパク質検出を組み合わせることによって、微小なショウジョウバエ組織より抽出した数十マイクログラムのタンパク質試料から、1,000 を超えるタンパク質の発現プロファイルを高スループットに解析することが可能になった。この卓越した微量解析技術による発現タンパク質の多次元マッピングは、定量性にも優れていることから、従来の生化学的手法では解析が極めて困難であったショウジョウバエプロテオームのダイナミクス解析においても極めて有効である。そこで我々はこの解析手法を、系統の長期保存を視野に入れたショウジョウバエ生殖プロセスのプロテオミクス研究にも応用している。ショウジョウバエでは、交尾に伴い雄から雌生殖器系に受け渡される多種多様な精液タンパク質によって、精子の受精能の獲得、雌における貯精、さらに排卵促進や再交尾拒否といった行動制御にいたるまで、様々な生殖活動が引き起こされることが知られている。雌生殖器系における精液タンパク質の分子動態は極めて複雑であり、また機能発現に翻訳後修飾が必要な成分も多数存在することから、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析だけでは生殖プロセスの全体像を把握することは不可能である。本講演では、我々が現在行っている ①新規精液タンパク質の探索 ②各種精液タンパク質の生殖器内での局在解析 ③発現レベルや翻訳後修飾状況を含む動態解析 ④組織別タンパク質発現プロファイルのデータベース化の試みについて議論を行う。





## ショウジョウバエプロテオミクスと医学との接点

松本博行・小森直香（オクラホマ大学医学部）

ショウジョウバエは医学生物学のモデル生物として大きな役割を果たして来た。これは特にDNA二重らせんの発見後に急速に発展した分子生物学の中で顕著に見られる。たとえば、ショウジョウバエの胚発生や成体の形態形成の研究過程で発見された転写因子や細胞シグナル伝達を担うタンパク質をコードしている遺伝子の多くは、ヒトを含む高等動物の細胞シグナル伝達にも関与している。ショウジョウバエのゲノムはヒトゲノムと70%以上の相同性を示すから、ショウジョウバエのモデル生物としての価値は継続するだろう。ショウジョウバエ研究の中で命名された奇妙な遺伝子の名前のために臨床の場で不適当な状況が生まれることから、本来のショウジョウバエ遺伝子の名前を臨床医療用に改名する必要性が説かれているほどである。この講演では、われわれのグループが他の2つの研究グループと共同で行ったレチノフィリンと呼ばれるMORNモチーフをもったリンタンパク質を紹介する。われわれのチームは、プロテオミクスから出発し、遺伝学的手法を用いてミュータントを作り、電気生理学の測定を行うことによって、レチノフィリンがショウジョウバエの視細胞の暗状態におけるランダムな脱分極を抑制していることを明らかにした。MORNモチーフは、PMとERを接合するジャンクトフィリンと呼ばれるタンパク質の中で発見され、ヒトを含む広い系統樹に渡って分布している。レチノフィリンはジャンクトフィリンのホモログで、PMのCaチャンネルとCaイオンを貯蔵しているERを係留するジャンクションコンプレックスの一員であるらしい。レチノフィリンをサプレスするとアポトーシスで死んだ細胞をクリアする貪食細胞の機能に異常が起こることから、この遺伝子はアンダーテーカー（葬儀屋）とも呼ばれている。ジャンクトフィリンの異常から起こるハンチントン病に似たヒトの疾患が知られていることから、このケースも将来臨床の場で物議をかもし出す恐れがある。モデル生物としてショウジョウバエが持つ多くの利点は反復するまでもないが、以上のような事情を考えに入れると21世紀においてもショウジョウバエを用いた研究と医学の接点はますます増えることが予想される。

# 分裂酵母の配偶子形成におけるメンブレントラフィック

中村太郎（大阪市立大学大学院理学研究科）

分裂酵母は栄養源が枯渇すると、耐久型休眠細胞である配偶子（孢子）に分化する（図1）。孢子は母細胞の細胞中に新たに形成されることから、細胞新生のモデルとしても魅力的な系である。孢子形成の最も重要なイベントは将来孢子の細胞膜となる前孢子膜の形成である。前孢子膜は細胞膜と同様、ゴルジ体由来の分泌小胞の融合によって形成される。前孢子膜は細胞質に形成されるため、孢子形成時には分泌小胞の目的地が細胞膜から前孢子膜への大きくと変化すると考えられる。

我々は細胞膜に局在するシンタキシン1が孢子形成時に細胞膜から前孢子膜へとダイナミックに局在を変化することを発見した（図2）。シンタキシン1は分泌小胞のターゲットとなるタンパク質である。すなわち、シンタキシンの局在変化により、分泌小胞の目的地が変わり、これにより前孢子膜形成を成し遂げると考えられる。本研究の目的は、孢子形成時にどのようにシンタキシン1が細胞膜から取りこまれ、前孢子膜へと局在変化するのか明らかにすることである。

蛍光タンパク質を使ってライブ観察したところ、シンタキシン1は第一減数分裂後からエンドサイトーシスによって取りこまれ、前孢子膜へと局在を変化させることがわかった。このエンドサイトーシスは栄養増殖時のエンドサイトーシスといくつかの点で異なる性質をもっていた。細胞膜タンパク質の中には、孢子形成開始後すぐに取りこまれるもの、孢子形成のある時期に取りこまれるもの、孢子形成時にとりこまれないものが存在したが、これは細胞膜の脂質組成と関係があることがわかった。分裂酵母はエンドサイトーシスの性質を変化させることにより、孢子形成時の膜小胞輸送（メンブレントラフィック）を変化させ、孢子形成を成し遂げると考えられる。

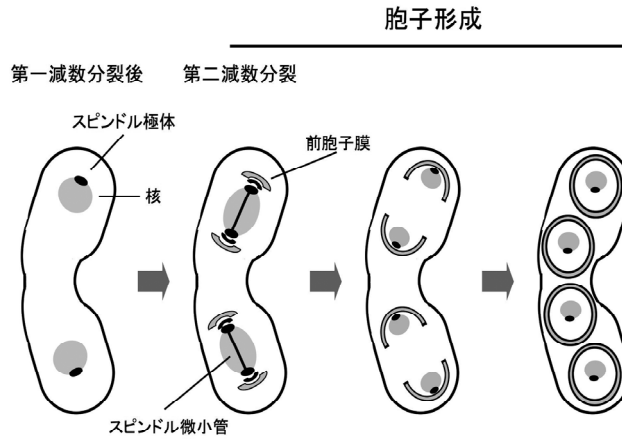


図1 分裂酵母の第二減数分裂と前孢子膜形成  
一番左は第一減数分裂後の細胞、第二減数分裂とともに将来孢子の細胞膜となる前孢子膜が形成されていく

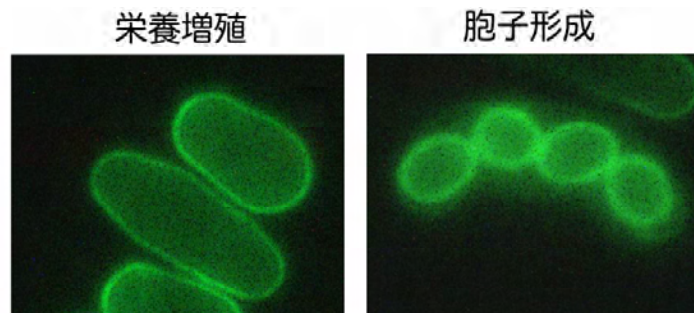


図2 分裂酵母のシンタキシン1の局在



# プログラム

司会：山本雅敏， 芹川忠夫

## はじめに：

竹永睦生（京都工芸繊維大学 副学長）  
石井康彦（文部科学省ライフサイエンス課長）

## 講演：

分子医学におけるショウジョウバエ研究の重要性  
加藤茂明（東京大学分子細胞生物学研究所・教授）

ショウジョウバエを用いた神経行動学  
江島亜樹（京都大学生命科学系キャリアパスユニット・特定助教）

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」と新規ラットリソースの開発  
芹川忠夫（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 施設長・教授）

ラットを用いた糖尿病研究  
横井伯英（神戸大学大学院医学研究科 細胞分子医学・特命准教授）

質量分析法によるショウジョウバエの分子プロファイリング  
武森信暁（京都工芸繊維大学 ショウジョウバエ遺伝資源センター・研究員）  
山本雅敏（京都工芸繊維大学 ショウジョウバエ遺伝資源センター・センター長）

ショウジョウバエプロテオミクスと医学との接点  
松本博行（オクラホマ大学医学部 生化学分子生物学科・教授）  
小森直香（オクラホマ大学医学部 生化学分子生物学科・准教授）

分裂酵母の配偶子形成におけるメンブレントラフィック  
中村太郎（大阪市立大学大学院理学研究科・准教授）

## おわりに：

多羽田哲也（東京大学分子細胞生物学研究所・教授）



### 【アクセス】

京都市営地下鉄烏丸線「松ヶ崎駅」下車、徒歩約8分。「松ヶ崎駅」の「出口1」から右(東)へ約400m、四つ目の信号を右(南)へ約180m

### 問合せ先：

京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センター

電話: 075-873-2660 FAX: 075-861-0881 <http://www.DGRC.kit.ac.jp/>