

受賞者

松野 健治

東京理科大学大基礎工学部部生物工学科

研究テーマ

ショウジョウバエをモデル系としたペルオキシソーム病の病態研究

1. はじめに

ヒトとショウジョウバエの遺伝情報の高い相同性が示されたことで、ショウジョウバエの基礎医学研究への応用が本格的にスタートしています。申請者は、平成18年度の病態代謝研究会研究助成によって、ショウジョウバエをモデル系として、臓器で機能不全を誘発する遺伝子を網羅的に検索しました。その結果、ペルオキシソームの形成に必須な Pex16 遺伝子を同定しました。ショウジョウバエ Pex16 の機能喪失型突然変異体を作出したところ、この突然変異体の表現型が、ヒト Zellweger 症候群に代表されるペルオキシソーム形成異常症にみられる症状と類似していることがわかりました。そこで、本研究では、Pex16 の機能喪失型突然変異体をペルオキシソーム形成異常症のショウジョウバエ・モデルと位置づけ、不明な点が多い、ペルオキシソーム病の症候の発現機序を明らかにすることを目的としています。本研究で得られる、ペルオキシソーム形成異常に関する分子遺伝学的知見から、ペルオキシソーム病態解明のための基盤を提供できるものと考えます。

2. 方法

ショウジョウバエ Pex16 突然変異のホモ接合体は、成虫にまで発生するものの、矮小化 (図1) や短命化 (野生型の1/10以下の寿命)、重篤な運動障害を示しました。本研究では、まず、ショウジョウバエ Pex16 突然変異体が、ペルオキシソーム形成異常症のモデルとして妥当であることを検証します (実験1)。次に、Pex16 突然変異体の表現型を解析することで、ペルオキシソームの欠失に起因する異常を明らかにします (実験2)。

(実験1) ショウジョウバエ Pex16 突然変異体のペルオキシソーム形成異常症モデルとしての妥当性の評価

(a) 申請者は、ペルオキシソーム移行シグナルを付加した GFP を *in vivo* で発現させることで、ペルオキシソームを可視化することに成功しています。これを用いて、Pex16 突然変異体でペルオキシソームが欠失していることを確認します。

(b) ペルオキシソーム形成異常症では、極長鎖脂肪酸の蓄積が起きます。質量分析を用いて、Pex16 突然変異体において極長鎖脂肪酸の蓄積が起こっているかどうかを調べます。

(実験2) Pex16 突然変異体の表現型の解析

(a) Pex16 突然変異体の成虫では、運動障害が観察されます。例えば、「仰向け」にした成虫は、10秒以上たってももとに戻ることができません。この運動障害の原因となる器官を特定するために、Pex16 突然変異体において、脳、抹消神経系、筋肉などで、それぞれ特異的に Pex16 を強制発現さ

成虫



Pex16⁻ 野生型

精巣

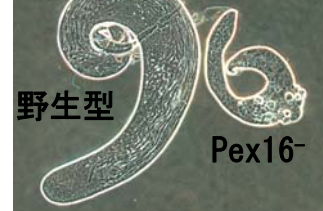


図1 Pex16 突然変異体 (Pex⁻) の表現型。Pex16⁻ 成虫は矮小である (上)。Pex16⁻ 精巣では、減数分裂が起らず、器官形成が異常になる (下)。

せ、運動障害の救済の有無を調べます。原因器官が特定できたら、その器官の発生や、細胞レベルでの異常を解析します。Pex16 突然変異体における短命化や矮小化に関しても、同様の実験を行います。

(b) Pex16 突然変異体の精巣では、減数分裂が起こらないことを明らかにしています。そこで、減数分裂の過程で発現する各種マーカーを用いて、減数分裂にいたるまでのどの段階で異常が起こっているのかを明らかにします。さらに、Pex16 突然変異体の精巣などの各種細胞で Pex16 を特異的に発現させ、減数分裂の異常を救済できる細胞を特定します。

3. 結果

(実験 1)

ペルオキシソーム局在型EGFP (EGFP-SKL)を用いてペルオキシソームを可視化することに、ショウジョウバエでは初めて成功しました。これを利用して、ショウジョウバエ個体内のペルオキシソームを観察したところ、Pex16 突然変異体では、ペルオキシソームが消失していることを明らかにできました。次に、極長鎖脂肪酸の蓄積が、ショウジョウバエ PEX16 突然変異体においても起こっているかどうかを調べるために、ガスクロマトグラフィーを用いた解析を行いました。この結果、PEX16 突然変異体の体内の C24 と C26 の極長鎖脂肪酸が、野生型に比べて 2~3 倍に増加していることがわかりました (図 2)。

(実験 2)

ショウジョウバエ Pex16 突然変異ホモ接合体は、成虫まで発生するものの、運動障害等を含む、Zellweger 症候群が示す臨床症状と類似の多くの表現型を示しました。また、運動障害や短命化は、神経系におけるペルオキシソームの欠失によって起こっていることがわかりました。

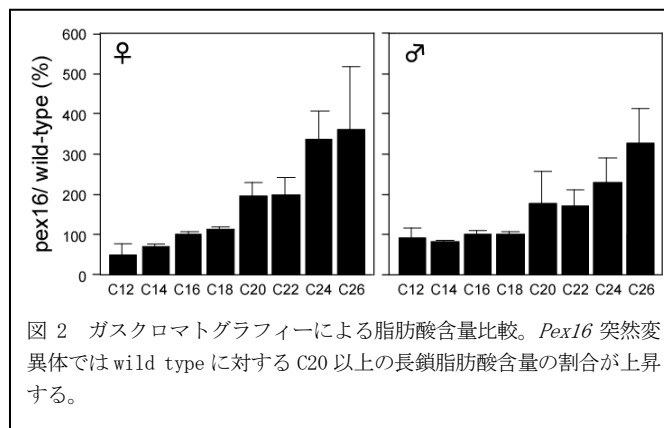


図 2 ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸含量比較。Pex16 突然変異体では wild type に対する C20 以上の長鎖脂肪酸含量の割合が上昇する。

4. 考察

ペルオキシソーム形成異常症に関しては、これまでの多大な努力にも関わらず、有効な治療手段が開発されていませせん。このような状況を打開するためには、これまでの視点と異なるアプローチを用いた研究が必要であると考えられます。ショウジョウバエのペルオキシソーム病疾患モデルを用いることで、これまで見落とされてきた治療法開発のための新たな糸口を見出すことができるものと考えられます。

5. 発表論文、参考文献

- (1) Okumura, T., Utsuno, H., Kuroda, J., Gittenberger, E., Asami, T., and Matsuno, K. The development and evolution of left-right asymmetry in invertebrates: lessons from *Drosophila* and snails. *Dev. Dyn.* 237, 3497-3515 (2008).
- (2) Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi-Kanai, M., Okumura, T., Taniguchi, K., Kawakatsu, Y.,

- Nakazawa, N., Hatori, R., and Matsuno, K. The head region of unconventional Myosin I family members is responsible for the organ-specificity of their roles in left-right polarity in *Drosophila*. *Dev. Dyn.* 237, 3528-3537 (2008).
- (3) Wilkin, M. B., Tongngok, P., Gensch, N., Clemence, S., Motoki, M., Yamada, K., Hori, K., Taniguchi-Kanai, M., Franklin, E., Matsuno, K., and Baron, M. *Drosophila* HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of Notch in the endosomal trafficking pathway. *Dev. Cell* 15, 762-772 (2008).
- (4) Kagesawa, T., Nakamura, Y., Nishikawa, M., Akiyama, Y., Kajiwara, M., and Matsuno, K. Distinct activation patterns of EGF receptor signaling in the homoplastic evolution of eggshell morphology in genus *Drosophila*. *Mech. Dev.* 125, 1020-1032 (2008).
- (5) Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in *Drosophila* epithelial cells. Sasaki N., Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Kanai, M., Ueda, R., Saigo, K., Aigaki, T. and Matsuno K. *Genes to Cells* 12, 89-103 (2007).
- (6) Roles of single-minded in the left-right asymmetric development and tissue specifications of the *Drosophila* embryonic gut. Maeda, R., Hozumi, S., Taniguchi, K., Sasamura, T., Murakami, R., and Matsuno, K. *Mech. Dev.* 124, 204-217 (2007).
- (7) The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. Araki, Y., Kawano, T., Taru, H., Saito, Y., Wada, S., Miyamoto, K., Kobayashi, H., Ishikawa, H. O., Ohsugi, Y., Yamamoto, T., Matsuno, K., Kinjo, M. and Suzuki, T. *EMBO J* 26, 1475- 1486 (2007) .
- (8) The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Sasaki, N., Higashi, S., Kanai, M., Nakao, S., Ayukawa, T., Aigaki, T., Noda, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N. and Matsuno, K. *Development* 134, 1347-1356 (2007).
- (9) Soma-dependent modulations contribute to divergence of rhomboid expression during evolution of *Drosophila* eggshell morphology. Nakamura, Y., Kagesawa, T., Nishikawa, M., Hayashi, Y., Kobayashi, S., Niimi, T. and Matsuno, K. *Development* 134, 1529-1537 (2007).
- (10) Mastermind-1 is required for Notch signal-dependent steps in lymphocyte development in vivo. Oyama, T., Harigaya, K., Muradil, A., Hozumi, K., Habu, S., Oguro, H., Iwama, A., Matsuno, K., Sakamoto, R., Sato M., Yoshida, N. and Kitagawa, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9764-9769 (2007).
- (11) D-JNK signaling in visceral muscle cells controls the laterality of the *Drosophila* gut. Taniguchi, K., Hozumi, S., Maeda, R., Ooike, M., Sasamura, T., Aigaki, T. and Matsuno, K. *Dev. Biol.* 311, 251-263 (2007).
- (12) Roles of type I Myosins in *Drosophila* handedness. Taniguchi, K., Hozumi, S., Maeda, R., Okumura, T. and Matsuno, K. *Fly* 1, 287-290 (2007).