

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良

所属 千葉大学薬学部
研究者 山崎 真巳

要旨

アントシアニン生合成の制御因子を単離し、分子エンジニアリングの材料として用いることを目指して、アカジソからの成分変種特異的に発現する新規 Myc 遺伝子および WD40 ホモログ遺伝子の探索および単離とコードされるタンパク質の機能解析を行った。

1. 研究目的

多くの植物種に広く分布するフラボノイド、アントシアニン、カテキン等のポリフェノール類は、強力な抗酸化活性をもち、活性酸素や種々のオキシダントで引き起こされる疾病を予防する機能を発揮することが、個体、細胞、分子レベルで明らかにされ、注目されている。また、植物体内ではこれらの抗酸化物質が、環境ストレスにตอบสนองして生産され植物体自体の保護に関わっている。そこで薬用植物における抗酸化物質生産能力を遺伝子エンジニアリングにより改良することにより、抗酸化物質を高生産あるいは安定に含有するトランスジェニック薬用植物を作出すれば、このようなトランスジェニック植物は、オキシダント耐性となり大気汚染の深刻な地域での栽培も可能になると考えられる。また、このような抗酸化物質を豊富に含む植物を摂取することで酸化に起因する疾病を予防することが期待される。植物におけるアントシアニン生合成の制御には、転写制御因子である Myc ホモログ、Myb ホモログならびに機能の詳細の不明な制御因子 WD40 因子が関与することが知られている。そこで本研究では、全草においてアントシアニン生産の高発現しているアカジソからアントシアニン生合成の制御因子を単離し、分子エンジニアリングの材料として用いることを目指して、(1) 成分変種特異的に発現する新規 Myc 遺伝子の探索、(2) アカジソからの WD40 ホモログ遺伝子の単離とコードされるタンパク質の機能解析を行った。

2. 研究方法

2-1 ディファレンシャルディスプレイ法によるアカジソ特異的 cDNA 断片の単離

アカジソとアオジソの葉からホットフェノール法 (Pawlowski et al., 1994) により全 RNA を抽出し、さらに mRNA Separator Kit (Clontech) を用いてポリ(A)+ RNA を精製した。このポリ(A)+ RNA を鋳型として、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech)により G、A、C のいずれかを付加した 3 種のアンカーオリゴ(dT)プライマーを用いて個々に cDNA (33 ml)を作成した。この cDNA を鋳型として、cDNA 作成に用いたアンカーオリゴ(dT)プライマーと任意の 10-mer プライマー(OPD-1~20、OPF-1~20、Operon) とを用いて以下の条件で PCR 増幅を行った。

反応組成	PCR 条件		
1 μ l cDNA 溶液	72 $^{\circ}$ C	0.5min	
0.2 μ M アンカーオリゴ(dT)プライマー	95 $^{\circ}$ C	0.5min	⌋
0.2 μ M 任意プライマー	36 $^{\circ}$ C	2.0min	40 cycles
0.2mM dNTPs	72 $^{\circ}$ C	0.5min	⌋
0.925 MBq [α - ³² P] dCTP	72 $^{\circ}$ C	0.5min	
10mM Tris-HCl (pH 9.0)			
50mM KCl			
0.01% TritonX 100			
1.25mM MgCl ₂			
1 unit Ex Taq (Takara)			

PCRに用いたアンカーオリゴ (dT) プライマー

H-T11G 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'

H-T11A 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'

H-T11C 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'

(下線部は *Hind*III 制限酵素サイト)

増幅産物を 5% Long Ranger Gel (FMC, USA) を用いたシークエンスゲル電気泳動によって分離した。ゲルを 3 MM 濾紙(Whatman)に圧着させ乾燥し、X 線フィルムに露光してオートラジオグラフィを行った。アカジソとアオジソにおける PCR 産物のオートラジオグラムの比較からアカジソ特異的に増幅された DNA 断片をゲルごと切り出した。切り出したゲルに 100 μ l の滅菌水を加えて 100°C で 10 分間処理して溶解した後、エタノール沈殿を行って DNA を回収した。得られた DNA を、20 μ l の滅菌水に溶解し、このうち 10 μ l の DNA 溶液を再度 PCR 増幅し、PCR 産物を pT7Blue (R)-T vector (Novagen)にサブクローニングした。

2-2 アカジソ葉の λ gt10cDNA ライブラリーから F3G1cDNA のクローニング

アカジソ葉由来の λ gt10cDNA ライブラリー約 20 万クローンをアカジソ特異的 DNA 断片をプローブとしてスクリーニングした。ブランクは Hybond N+にリフトし定法に従い変性・中和・洗浄を行った。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション緩衝液 [5 \times SSPE (0.9M 塩化ナトリウム, 0.05M リン酸ナトリウム (pH 7.7), 5mM EDTA), 0.5% SDS, 5 \times デンハルト溶液 (Sambrook et al., 1989), 20 μ g/ml サケ精子 DNA] 中、65°C にて終夜行った。最終洗浄は、洗浄緩衝液 [0.1 \times SSPE, 0.1% SDS] を用いて 65°C にて 10 分間行った。ポジティブクローンを選んで同様に二次スクリーニングを行った。得られた陽性 1 クローンの挿入配列を *Eco*RI により 1 DNA から切り出し、pBluescriptII SK-にサブクローニングした。

2-3 アカジソ葉の λ gt10cDNA ライブラリーから WD 遺伝子のクローニング

アカジソ葉由来の λ gt10cDNA ライブラリー約 20 万クローンをペチュニア由来の WD 遺伝子 *an11* をプローブとしてスクリーニングした。ブランクは Hybond N+にリフトし定法に従い変性・中和・洗浄を行った。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション緩衝液 [5 \times SSPE (0.9M 塩化ナトリウム, 0.05M リン酸ナトリウム (pH 7.7), 5mM EDTA), 0.5% SDS, 5 \times デンハルト溶液 (Sambrook et al., 1989), 20 μ g/ml サケ精子 DNA] 中、65°C にて終夜行った。最終洗浄は、洗浄緩衝液 [0.1 \times SSPE, 0.1% SDS] を用いて 65°C にて 10 分間行った。ポジティブクローンを選んで同様に二次スクリーニングを行った。得られた陽性 1 クローンの挿入配列を *Eco*RI により 1 DNA から切り出し、pBluescriptII SK-にサブクローニングした。

2-4 ノーザンブロット解析

アカジソおよびアオジソから抽出した 30 μ g の全 RNA または 5 μ g のポリ(A)+RNA を 1.2%ホルムアルデヒド/アガロースゲル電気泳動で分離し、Hybond-N+ (Amersham) に 20 \times SSPE を用いてトランスブロットした。この RNA メンブレンに対して 32P 標識されたアカジソ特異的増幅フラグメントをプローブとして各々ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、5 \times SSPE (0.9M 塩化ナトリウム, 0.05M リン酸ナトリウム (pH 7.7), 5mM EDTA), 0.5% SDS, 5 \times デンハルト溶液 (Sambrook et al., 1989), 20 μ g/ml サケ精子 DNA の存在下、65°C にて終夜行った。最終洗浄は 0.1 \times SSPE, 0.1% SDS, 65°C, 10 分間行った。

2-5 プローブの 32P 標識およびオートラジオグラフィ

ブランクハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーションに用いたプローブは、Random Primer DNA Labeling Kit (Takara) により、[α -32P] dCTP を用いて 32P 標識した。オートラジオグラフィは、バイオ・イメージングアナライザー BAS-2000II (富士フィルム)を用いて行った。

2-6 塩基配列の決定

シークエンス反応には、FITC ラベルした M13 ユニバーサルプライマーおよび Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP (Amersham) を用いた。ゲル電気泳

動およびシグナル検出は、自動蛍光式 DNA シークエンサー DSQ-2000 (島津) により行った。データ解析には、遺伝子情報処理プログラム DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング) および GENETYX (SDC ソフトウェア開発) を使用した。

2-7 シロイヌナズナの形質転換

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) の形質転換は、フラワーディップ法[S. J.Clough & A. F. Bent, Plant J. (1998) 16, 735-743]により行った。*A. thaliana* ecotype Columbia をロックウールに播種し、3-4 週後に 1 次花茎を摘心し 4-8 日後に伸長した二次花序を宿主植物として感染に用いた。形質転換用のミニ Tiplasmid を含有する *Agrobacterium tumefaciens* を LB 培地で 2-3 日間前培養し、感染培地 (5% sucrose, 0.05% Silwet L-77) にけん濁しする。この *Agrobacterium* 液に花序を 3-5 秒浸した後、植物に plastic dome を一晩かぶせ、翌日から dome を除いて 3-5 週間育成し、T0 種子を得た。これらの収穫した種子を滅菌し、選択マーカーであるカナマイシンを含む GM 培地に播いて選択した。

2-8 酵母 Two-hybrid system による WD40 因子と Myc 因子のタンパク質相互作用の解析

酵母 GAL1 プロモーターの GAL4 結合タンパク質による発現制御を利用した Two-hybrid system を用いて WD40 因子と Myc 因子のタンパク質相互作用を調べた。GAL4 タンパク質には DNA-binding domain (BD) と activation domain (AD) が存在し、BD によって GAL1 プロモーターに結合することにより GAL1 遺伝子の転写を活性化することが知られている。そこで、これらの BD, AD に異なるタンパク質 X と Y を融合した融合タンパク質を、GAL4 を欠損し GAL1 プロモーター制御下におかれたレポーター遺伝子を有する酵母で発現させると、X と Y の間にタンパク質相互作用がある場合にのみレポーター遺伝子の転写が起こる。そこで、WD40 因子と Myc 因子を AD, BD と融合したキメラタンパク質を酵母で発現させ、レポーター遺伝子の b-galactosidase 活性を測定することにより WD40 因子と Myc 因子のタンパク質相互作用を解析した。

3. 研究成果

3-1 ディファレンシャルディスプレイ法によるアカジソ特異的新規 Myc 遺伝子の単離と解析

アカジソとアオジソの mRNA についてディファレンシャルディスプレイを行った。3 種のアンカーオリゴ(dT)プライマーと 40 種の任意プライマーの 120 腫の組み合わせで mRNA の PCR 増幅を行った。その結果、44 個のアカジソ特異的増幅フラグメントが検出されたので、これらをプラスミドベクターにサブクローニングし単離した。さらに、これらのアカジソ特異的増幅フラグメントをプローブとして、アカジソとアオジソの葉の全 RNA に対してノーザン解析を行ったところ、2 クローン (F5RA1-16, F3G1) がアカジソ特異的に発現していることが示された (表 1)。これらの増幅断片のシークエンス解析とデータベース検索の結果、2 クローンのうちの F5RA1-16 は、アカジソから単離されたジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) cDNA であることが明らかになったため、このクローンについてはこれ以上の解析を断念した。一方の F3G1 は塩基配列および推定アミノ酸配列を用いたデータベース検索の結果、新規の遺伝子であることが明らかになった。そこで、この F3G1 について更に解析を進めた。F3G1 断片をプローブとしてアカジソ葉のノーザン解析を行ったところ、F3G1 遺伝子の発現が光照射によって経時的に誘導されることが示された。この誘導パターンは、アカジソにおけるアントシアニン生合成遺伝子の光照射による発現誘導パターンと一致していた。このようにアカジソ特異的発現と光による誘導を受けることなどアントシアニン生合成の構造遺伝子と一致した発現パターンを示したことから、F3G1 がアントシアニン生合成の発現制御に関与していることが示唆された。そこで、さらに F3G1 をプローブとして全長 cDNA の単離を行った。約 20 万クローンのアカジソ葉の cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、32 クローンの陽性クローンを得た。これらをセカンドスクリーニングに供し、このうち強いシグナルを与えた 20 クローンを単離した。そしてほぼ全長をコードする cDNA を単離し、その塩基配列を決定した。その結果、F3G1 はトウモロコシのアントシアニン生合成を制御する Myc 様遺伝子と相同性があることが示された。

表1 ディファレンシャルディスプレイによって得られたフラグメントの発現と相同遺伝子

Fragment	Expression		Homologous genes
	in green	in red	
D4RG	-	-	none
D4RC1	-	-	none
D4RC2	-	-	none
D5RG2	+	+	Luminal binding protein(tobacco etc.)
D5RG5	-	-	Superoxide dismutase(<i>S. pombe</i>)
D11RC	-	-	none
D12RA	-	-	none
D12RG1	+	+	Signal recognition particle receptor(canine)
F4RC1-5	+	+	<i>Plasmodium falciparum</i> chromosome 13
F4RC2-5	+	+	Chloroplast gene for OBprotein(tobacco etc.)
F5RA1-16	-	+	DFR(perilla)
F5RA2-13	+	+	<i>Trypanosoma brucei</i> genomic clone
F6RA-26	+	+	Cornell <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomato)
F6RC-26	+	+	<i>Drosophila melanogaster</i> chromosome 3
F11RC-37	+	+	<i>Triticum aestivum</i> protein kinase mRNA
F12RC1-19	+	+	Chloroplast rbcl gene(<i>Ostryopsis davidiana</i>)
F12RC2-19	+	+	Rice panicle at flowering stage cDNA
F4RC2-9	+	+	<i>Plasmodium falciparum</i> 307 chromosome
F3G1	-	+	<i>Plasmodium falciparum</i> heat shock protein
F3G2	+	+	<i>Drosophila melanogaster</i> chromosome
F14RC1-11	-	-	<i>Drosophila</i> mRNA partial
F14RC2-16	+	+	GA 2-oxidase(<i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)
F14RC1-4	+	+	GTP binding protein(<i>A. thaliana</i> etc.)
F16C-30	+	+	human ribosephosphate pyrophosphokinase
F16C-34	+	+	<i>Homo sapience</i> topoisomerase2
F20G	+	+	human ribosephosphate pyrophosphokinase
F2A	+	+	hypothetical protein(<i>Citrus paradisi</i>)
D1A-1	+	+	<i>L. esculentum</i> mRNA for Alu
D1A-5	+	+	Delta subunit of ATP synthase(<i>N. tabacum</i> etc.)
D18C2-8	+	+	none
D18C3-14	+	+	Beta-fructosidase(<i>N.tabacum</i>)
D18C3-15	+	+	a/b-binding protein(<i>Oryza sativa</i> etc.)
D18C4-23	+	+	none
D19A-29	+	+	Transcription factor TF 11B(<i>A.thaliana</i>)
D19A-30	+	+	<i>A.thaliana</i> genomic DNA chromosome 3
D20A-31	+	+	a/b-binding protein(<i>Vigna radiata</i> etc.)
D20A-32	+	+	UDP-glucuronosyl transferase(<i>Macaca fascicularis</i>)
F8A1-1	+	+	psaH gene(<i>N.tabacume</i> etc.)
F8A2-9	+	+	none
F8A3-12	+	+	psaH gene(<i>N.tabacume</i> etc.)
F8A-3-14	+	+	<i>A.thaliana</i> BACF4H6,chromosome IV
F9G-16	+	+	<i>A.thaliana</i> genomic DNA chromosome 5
F9G-17	+	+	<i>Bombus pllatus</i> cytochrome b gene
F10C-1	+	+	<i>Gossypium hirsutum</i> sucrose synthase
F10C-3	nd	nd	rRNA(<i>N.tabacume</i> etc.)

nd, not determined; none, no resemble gene

3-2 アカジソからの WD40 遺伝子のクローニングと機能解析

シソ葉 cDNA ライブラリーをペチュニア由来の WD 遺伝子 *an11* をプローブとしてスクリーニングし、全長 cDNA クローン *Pfwd* を得た。*Pfwd* は、1,411 塩基からなり、333 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。PFWD と AN11 の推定アミノ酸配列は 81.3%の同一性を示し、WD 反復配列の存在する C-末端領域は既知 WD40 因子との間で高度に保存されていた。

PFWD を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナでは、色素生産量と毛状突起数が増加し、PFWD がこれらの制御に関与することが示された。また、GUS-PFWD 融合タンパク質のタマネギ表皮細胞における一過性発現により PFWD の細胞質局在が示された。さらに酵母 Two-hybrid system により PFWD が色素生産を制御する MYC 転写制御因子(MYC-RP)と強く相互作用することが示された。

これらのことから、シソ PFWD タンパク質は、MYC 因子によるアントシアニン生合成遺伝子の発現制御を上位で制御することが示唆された。

4. 考察

これまでにアカジソとアオジソから Myc ホモログである MYC-RP と MYC-GP を単離した。これらの間には唯一のアミノ酸置換が存在し、MYC-RP の 132 番目のアラニンが MYC-GP ではセリンに置換しており、これらの立体構造が異なることが予想された。また、このどちらもタバコやトマトなどのヘテロな植物に導入して過剰発現させるとそれぞれのトランスジェニック植物におけるアントシアニン生産量を増加させ、これらの MYC 因子がアントシアニン生合成発現制御に管のすると考えられた。しかしながら、MYC-RP と MYC-GP の酵母における転写活性化能はとても低く転写活性化能の測定は困難であった。そこでより強力な活性化能を有するキンギョソウの *Delila* を用いて酵母内で発現させた変異体に夜転写活性化能を解析したところ、MYC-RP の 132 番目のアラニンに相当する *Delila* の 134 番目のアラニンの変異は、転写活性化能に影響しなかった。このことから、MYC-RP と MYC-GP の違いはアカジソとアオジソにおけるアントシアニン生産量の違いには影響しないことが推測された。そこで MYC-RP の他に成分変種特異的な制御因子の存在が予測されたので、さらにアカジソとアオジソの mRNA ディファレンシャルディスプレイを行った。その結果、アカジソでのみ発現する新規 Myc 遺伝子 F3G1 を単離した。さらにこの F3G1 遺伝子発現は、他の案押し亜人生合成に関与する遺伝子と同様に光照射によって誘導されることから F3G1 がアカジソ特異的なアントシアニン生合成の発現制御に関与していることが示唆された。

WD40 反復配列は、真核生物における様々な細胞機能の制御因子に見出される特徴的なアミノ酸配列である。最近、植物においてアントシアニン色素生産および毛状突起形成の制御に WD 因子が関与することが発見されたが、その制御機構の詳細は未だ不明である。本研究では、シソから新規 WD 因子遺伝子を単離し、機能解析を行った。

5. まとめ

MYC ホモログタンパク質の構造と転写活性化能の関係を明らかにした。この結果は、トランスジェニック植物における物質生産制御に応用されることが期待される。また、アカジソ特異的に発現する新規 Myc 遺伝子については、今後さらに詳細に解析することが必要である。

6. 研究発表

Gong, Z., Yamazaki, M., and Saito, K. Critical role of alanine-161 in *Delila* protein involved in regulation of anthocyanin pigmentation or transcriptional activation in yeast. *Plant Biotechnology*, 17, 309-314 (2000)

Nakajima, J., Tanaka, Y., Yamazaki, M., and Saito, K. cDNA cloning and gene expression of anthocyanidin synthase from *Torenia fournieri*. *Plant Biotechnology*, 17, 331-335 (2000)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社