

氏名	るうん りい りん LUONG LY LINH
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第675号
学位授与の日付	平成25年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	dNF-Y plays dual roles in cell death and cell differentiation during <i>Drosophila</i> eye development (ショウジョウバエ発生過程で dNF-Y は細胞死と細胞分化の両方に役割を果たしている)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 伊藤雅信 教授 亀井加恵子

論文内容の要旨

申請論文は第1章「序論」、第2章「転写因子 NF-Y はショウジョウバエ R7 光受容細胞の分化に関与する」、第3章「dNF-YB はショウジョウバエ複眼分化の過程で細胞死と細胞分化に二重の役割を果たしている」、第4章「結論と展望」から構成されている。

序論では、本論文の背景と目的が述べられている。転写因子 Nuclear transcription factor Y (NF-Y)は真核生物の間で良く保存されており、NF-YA, NF-YB and NF-YC の3つのサブユニットから構成される3量体として機能する。NF-YA のみが DNA 結合ドメインを持つが、特異的な認識配列 CAAT ボックスへの結合には3量体形成が必須である。哺乳動物 NF-Y は細胞周期関連遺伝子や造血細胞異常や癌などのヒト疾患関連遺伝子を制御することが知られている。これまでの研究が主に培養細胞を用いて行われてきたので、個体レベルでの NF-Y の機能については不明な点が多い。そこで申請者は、ショウジョウバエをモデル生物として用いて、ショウジョウバエ NF-Y (dNF-Y) の個体レベルでの機能解析を行った。

第2章では、まずショウジョウバエ *NF-YA* (*dNF-YA*) 遺伝子の複眼原基特異的ノックダウンが複眼形態異常 (rough eye 表現型) を誘導するしくみについて解析した。*seven up-LacZ* や *deadpan-lacZ* などのエンハンサートラップシステムを用いて光受容細胞を標識し、8種類の光受容細胞の分化を解析した結果、申請者は *dNF-YA* 遺伝子ノックダウンが R7 光受容細胞の分化を特異的に阻害することを明らかにした。R7 細胞の分化は MAPK シグナル伝達経路により制御されていることが知られているので、その構成因子である *sevenless* 遺伝子や *D-raf* 遺伝子の過剰発現により *dNF-YA* ノックダウンが誘導する rough eye 表現型と R7 細胞分化異常がレスキューされることが明らかになった。*sevenless* 遺伝子プロモーターには、dNF-Y 結合コンセンサス配列が存在し、それがプロモーター活性に重要であることを明らかにした。また抗 dNF-YA 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、dNF-YA が細胞内で *sevenless* 遺伝子プロモーターに結合していることも明らかになった。これらの結果から申請者は dNF-Y が *sevenless* 遺伝子の転写を正に制御し、R7 細胞の分化に関与していると結論している。

第3章では、dNF-YB に注目し、dNF-YA の解析だけでは得られなかった新たな知見について記載

している。*dNF-YB*を複眼原基特異的にノックダウンすると、*dNF-YA*ノックダウンと同様に rough eye 表現型を示す。*dNF-YB*ノックダウンは複眼原基細胞にアポトーシスとそれに依存した細胞増殖を誘導する。また *dNF-YB*ノックダウンは MAPK シグナル伝達経路に依存した R7 細胞の分化も抑制するが、この抑制はアポトーシスの誘導とは独立に起こる現象であることを明らかにした。アポトーシス抑制因子として知られる Bcl-2 のショウジョウバエホモログ *debc1* 遺伝子プロモーターには、dNF-Y 結合コンセンサス配列が存在し、それがプロモーター活性に重要であることを明らかにした。また抗 dNF-YA 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、dNF-YA が細胞内で *debc1* 遺伝子プロモーターに結合していることも明らかになった。これらの結果から申請者は dNF-Y が *debc1* 遺伝子の転写を正に調節し、アポトーシスの制御に関与していると結論している。

第 4 章では、以上の研究結果のとりまとめと今後の展望について述べられている。転写因子の生体内機能解析におけるショウジョウバエモデルの有用性についてまとめている。また野生型と *dNF-YA* をノックダウンした 3 齢幼虫から単離した RNA を次世代型シーケンサーを用いて行った RNA-seq 解析から、脂質代謝に関わる遺伝子群が今後転写因子 NF-Y の新たな標的遺伝子群となるであろうと述べられている。

論文審査の結果の要旨

転写因子 NF-Y は真核生物の間で良く保存されており、NF-YA, NF-YB and NF-YC の 3 つのサブユニットから構成される 3 量体として機能する。NF-YA のみが DNA 結合ドメインを持つが、特異的な認識配列 CAAT ボックスへの結合には 3 量体形成が必須である。哺乳動物 NF-Y は細胞周期関連遺伝子や造血細胞異常や癌などのヒト疾患関連遺伝子を制御することが知られているが、個体レベルでの NF-Y の機能については不明な点が多い。そこで申請者は、ショウジョウバエをモデル生物として用いて、ショウジョウバエ NF-Y (dNF-Y) の個体レベルでの機能解析を行った。まずショウジョウバエ *NF-YA* (*dNF-YA*) 遺伝子の複眼原基特異的ノックダウンが複眼形態異常 (rough eye 表現型) を誘導するしくみについて解析し、dNF-Y が MAPK シグナル伝達経路の構成因子の一つである *sevenless* 遺伝子の転写を正に制御し、R7 光受容細胞の分化に関与していることを明らかにした。これらは dNF-Y の生体内機能についての新たな知見であり評価できる。

次に申請者は dNF-YB に注目し、dNF-Y の生体内機能について dNF-YA の解析だけでは得られなかった新たな知見を得た。*dNF-YB*ノックダウンは複眼原基細胞にアポトーシスとそれに依存した細胞増殖を誘導する。また *dNF-YB*ノックダウンは MAPK シグナル伝達経路に依存した R7 細胞の分化も抑制するが、この抑制はアポトーシスの誘導とは独立に起こる現象であることを明らかにした。アポトーシス抑制因子として知られる Bcl-2 のショウジョウバエホモログ *debc1* 遺伝子プロモーターには、dNF-Y 結合コンセンサス配列が存在し、それがプロモーター活性に重要であることを明らかにした。また抗 dNF-YA 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、dNF-YA が細胞内で *debc1* 遺伝子プロモーターに結合していることも明らかになった。これらの結果から申請者は dNF-Y が *debc1* 遺伝子の転写を正に調節し、アポトーシスの制御に関与していると結論している。これらの研究は、dNF-Y の生体内機能について新たな知見を加えるとともに、dNF-Y の新規標的遺伝子の同定に成功したこととなり、その学問的意義は高く評価できる。学位論文は英文で丁寧な作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、申請者が筆頭著者である 1 編を含む、査読制のある国際的学会誌にすでに発表済みの下記の 2 編の論文を基礎としている。

- 1) Yoshioka, Y., Ly, L. L. and Yamaguchi, M.: Transcription factor NF-Y is involved in differentiation of R7 photoreceptor cell in *Drosophila*. Biol. Open 1, 19-29, 2012.
- 2) Ly, L.L., Suyari, O., Yoshioka, Y., Tue, N.T., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: dNF-YB plays dual roles in cell death and cell differentiation during *Drosophila* eye development. Gene, 520 (2), 106-118, 2013.

また参考論文として以下の論文も掲載が確定している。

- 1) Ly, L.L., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: Nuclear transcription factor Y and its roles in cellular processes related to human disease. Am. J. Cancer Res. in press. 2013.