

氏名	やない ひろし <b>梁井 啓史</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第731号
学位授与の日付	平成27年3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	<b>Cell biological and genetical studies on <i>Drosophila</i> myeloid leukemia factor (dMLF) and DRE/DREF transcriptional regulatory pathway</b> (ショウジョウバエ骨髄性白血病因子 dMLF と DRE/DREF 転写制御経路の細胞生物学的及び遺伝学的研究)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 遠藤泰久 教授 伊藤雅信

## 論文内容の要旨

申請論文は第1章「序論」第2章「ショウジョウバエ骨髄性白血病因子は DREF と共同し JNK シグナル経路を活性化する」、第3章「ショウジョウバエ DRE/DREF 転写制御経路の標的としての Hippo 経路」から構成されている。

第1章序論では、本論文の背景と目的が述べられている。最初にショウジョウバエ Myeloid leukemia factor (dMLF) が、ヒトの骨髄異形成症候群／骨髄性白血病因子 hMLF1 のショウジョウバエホモログであること、またショウジョウバエ転写制御因子 DREF をおとりにして行われた酵母 two-hybrid スクリーニングによって同定された因子でもあることが述べられている。これまでに、dMLF を翅原基で過剰発現させると、成虫翅の後部においてアポトーシスが誘導され、翅の委縮が引き起こされることが報告されているが、その仕組みの詳細はまだ明らかにされていない。一方、JNK シグナル伝達経路によって誘導されるアポトーシスが翅原基の形成において重要な役割を果たすことが知られている。そこで、申請者はアポトーシスを誘導する JNK 経路への dMLF の関与に着目し、研究を開始したことが記載されている。また DRE/DREF 転写制御システムは細胞増殖関連の遺伝子を始め、様々な機能を持つ遺伝子の転写制御に関わることが報告されている。ショウジョウバエの Hippo 経路はアポトーシスの誘導や細胞周期を停止させることで細胞増殖を抑制し、JNK 経路ともクロストークすることが知られている。これらの学術的背景のもとに、申請者は Hippo 経路に注目して研究を開始したことが述べられている。

第2章では dMLF が DREF のコファクターとして働き JNK 経路を活性化する仕組みについて記載されている。en-GAL4 ドライバーを用いて翅原基特異的に dMLF を過剰発現させると、翅の後部において萎縮が見られるが、bsk (ショウジョウバエ JNK) の突然変異系統との交配により、この翅の萎縮が抑圧された。また、免疫染色法によって、dMLF の過剰発現が翅原基の後極側領域で確かに bsk の活性化が見られることが示されている。さらに dMLF の過剰発現によって活性型カスパーゼ3のシグナルが増加することから、アポトーシスが誘導されていることを明らかにしている。これまでに bsk プロモーター内には DREF の結合配列である DRE 配列が存在することが報告されて

いる。そこで、申請者はショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞を用いて、ラビット抗 dMLF 抗体によるクロマチン免疫沈降と定量的リアルタイム PCR を行なった結果、*bsk* プロモーターに存在する DRE 配列を含むゲノム領域に dMLF が確かに結合していることを明らかにした。また dMLF と DREF が免疫共沈することも示している。これらの結果から、申請者は dMLF が DREF と *bsk* プロモーター内で協調的に働き、JNK 経路を活性化させることでアポトーシスを誘導すると結論している。

第3章では DRE/DREF 制御経路の新たな標的として Hippo 経路を同定したことについて記載されている。免疫染色法によって、*hpo* 遺伝子の突然変異系統では複眼原基の後極側において異所的な DNA 合成が見られたが、DREF の過剰発現により、DNA 合成が抑制されることを示した。また、S2 細胞を用いて行ったルシフェラーゼアッセイでは、*hpo* プロモーター上に存在する2つの DRE 配列の内、1つがそのプロモーター活性に重要であることを明らかにした。RNAi 法を用いて DREF をノックダウンした S2 細胞では、*hpo* プロモーター活性が減少し、定量的 RT-PCR 法により *hpo*mRNA 量の低下も見られた。さらに抗 DREF 抗体によるクロマチン免疫沈降を行なった結果、*hpo* プロモーター上に存在する2つの DRE 配列を含むゲノム領域に DREF が特異的に結合していることを明らかにした。これらの結果から申請者は、DRE/DREF システムが *hpo* 遺伝子を転写活性化して、Hippo 経路を活性化することで細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導すると結論している。

### 論文審査の結果の要旨

ショウジョウバエ Myeloid leukemia factor (dMLF) は、ヒトの骨髄異形成症候群／骨髄性白血病因子 hMLF1 のショウジョウバエホモログであり、ショウジョウバエの転写制御因子 DREF をおとりにして行われた酵母 two-hybrid スクリーニングによって同定された因子である。これまでに、engrailed-GAL4 システムを用いて dMLF を翅原基で過剰発現させると、成虫翅の後部でアポトーシスが誘導され、翅の委縮が引き起こされることが報告されていたが、その仕組みはまだ明らかにされていない。一方、JNK シグナル伝達経路によって誘導されるアポトーシスが翅原基の形成において重要であることが知られていた。そこで申請者はアポトーシスを誘導する JNK 経路への dMLF の関与に着目し、その役割を解析した。

翅原基特異的に dMLF を過剰発現させると、翅の後部において萎縮が見られるが、JNK のショウジョウバエホモログ *basket (bsk)* の突然変異系統との交配により、この翅の萎縮が抑圧されることを見出した。また、免疫染色法によって、dMLF の過剰発現が翅原基の後極側で確かに *bsk* を活性化していることを証明した。さらに dMLF の過剰発現によって活性型カスパーゼ 3 のシグナルが増加することから、アポトーシスが誘導されていることを明らかにした。これまでに *bsk* プロモーター内には DREF の結合配列である DRE 配列が存在することが報告されていた。そこで、申請者はショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞を用いて、抗 dMLF 抗体によるクロマチン免疫沈降法を行ない、*bsk* プロモーターに存在する DRE 配列を含むゲノム領域に dMLF が確かに結合していることを証明した。さらに dMLF と DREF が免疫共沈することも確認した。これらの結果から、申請者は dMLF が DREF と *bsk* プロモーター上で協調的に働き、JNK 経路を活性化させることでアポトーシスを誘導すると結論している。

次に申請者は JNK 経路とクロストークすることが知られている、がん抑制経路 Hippo 経路に着目し、DRE/DREF システムによる Hippo 経路の転写制御について解析を行った。*hpo* 遺伝子の突然変異系統では複眼原基の後極側で異所的な DNA 合成が見られたが、DREF の過剰発現により、DNA 合成が抑制されることを見出した。また、*hpo* プロモーター上に存在する2つの DRE 配列の内1つがそのプロモーター活性に必要であることを明らかにした。DREF をノックダウンした S2 細胞では、

*hpo* プロモーター活性が減少し、内在性 *hpo*mRNA 量の低下も見られた。さらに抗 DREF 抗体によるクロマチン免疫沈降を行なった結果、*hpo* プロモーター上に存在する 2 つの DRE 配列を含むゲノム領域に DREF が確かに結合していることを示した。これらの結果から申請者は DRE/DREF システムが *hpo* 遺伝子の発現誘導を介して Hippo 経路を活性化し細胞増殖の抑制とアポトーシスの誘導をもたらすと結論している。これらの結果を総合して申請者は、DREF が JNK 経路と Hippo 経路の転写制御を介して、JNK 経路でアポトーシスを誘導し、Hippo 経路で細胞増殖の抑制とアポトーシスの促進を行うと推測している。また申請者は DRE/DREF システムが細胞増殖の促進だけではなく、アポトーシスの制御も行うことで細胞増殖を制御し、正常な組織や器官の形成に関与することも示唆している。これらのオリジナルな知見は、dMLF と DREF の新たな生体内機能を明らかにしたものとして学問的な意義が大きい。学位論文は英文で丁寧に作成されており、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) **Yanai, H.**, Yoshioka, Y., Yoshida, H., Nakao, Y., Plessis, A. and Yamaguchi, M.: *Drosophila* myeloid leukemia factor acts with DREF to activate the JNK signaling pathway. *Oncogenesis* 3:e98. doi: 10.1038/oncsis.2014.13., 2014.
- 2) Vo, N., Horii, T., **Yanai, H.**, Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: The Hippo pathway as a target of the *Drosophila* DRE/DREF transcriptional regulatory pathway. *Sci. Rep.* 4, 7196, doi: 10.1038/srep07196. 2014.