

氏名	えぐち こういち 江口 晃一
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第730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	Studies on DOCK family protein Sponge during <i>Drosophila</i> development (ショウジョウバエ発生過程における DOCK ファミリータンパク質 Sponge の研究)
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 DOCK ファミリータンパク質 Sponge は R7 光受容細胞の分化に関与する」、第3章「ショウジョウバエ DOCK ファミリータンパク質 Sponge は 背部形成過程で JNK 経路を制御する」そして第4章「考察」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 DOCK ファミリータンパク質が低分子量 G タンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子であり、様々な細胞外シグナルを下流に伝えるアダプタータンパク質であることが述べられている。DOCK ファミリータンパク質は、その構造上の特徴からさらに4つのサブファミリー (DOCK-A, DOCK-B, DOCK-C, DOCK-D) に分類できることが述べられている。また主に哺乳動物の個々の DOCK サブファミリータンパク質について、これまでの研究で明らかになっていることがまとめられている。またこれらの遺伝子機能の欠損が、神経変性疾患、白内障や免疫不全など様々なヒト疾患に関与することが述べられている。ショウジョウバエにはこれら4つのサブファミリーに対応するタンパク質として、Myoblast city (Mbc), Sponge (Spg), Zizimin-related (Zir) そして Zizimin (Ziz) タンパク質がそれぞれ同定されている。Mbc はこれまでに良く研究されており、筋芽細胞の融合や筋肉分化に機能することが知られている。一方 Spg は神経系での高い発現が見られ、胚中枢神経系の発生に関与することが報告されている。Zir や Ziz に関してはまだ殆ど研究が進んでいないことが述べられている。これらの学術的背景のもとに、申請者は、DOCK-B ファミリーに属するショウジョウバエ Spg に着目し、研究を開始したことが述べられている。

第2章ではショウジョウバエ複眼形態形成における Spg の新たに見出された機能について記載されている。申請者は *spg* ノックダウンショウジョウバエ系統や Spg に特異的な抗体を作製して研究ツールとして用いている。複眼原基特異的に *spg* 遺伝子をノックダウンすると複眼の形態形成異常が誘導された。複眼原基において抗 lacZ 抗体と抗 Spg 抗体の二重免疫染色を行ない Spg の発現パターンを調べると、Spg が光受容細胞の1つである R7 細胞で強く発現していることがわかった。一方、*spg* 遺伝子ノックダウン系統では Spg シグナルと R7 細胞での lacZ シグナルの顕著な減少が観察された。R7 細胞の分化には ERK 経路が関与していることから、抗リン酸化 ERK 抗体

を用いた複眼原基の免疫染色を行ったところ、ノックダウン系統では活性型 ERK のシグナルが減少していることが明らかになり、Sponge が ERK 経路を正に制御することにより R7 光受容細胞の分化に関与すると結論している。

第 3 章ではショウジョウバエ背部形成における Spg の新たに見出された機能について記載されている。翅原基特異的に *spg* 遺伝子をノックダウンするとショウジョウバエ成虫背部において split thorax 表現型が誘導される。成虫背部形成には JNK 経路の関与が知られていることから、JNK のショウジョウバエホモログである *basket* 遺伝子の機能低下型変異系統と翅原基特異的 *spg* 遺伝子ノックダウン系統を交配し、F1 世代の成虫背部を観察したところ、split thorax 表現型の増強が見られた。また、翅原基において抗リン酸化 JNK 抗体で免疫染色を行ったところ、*spg* 遺伝子の発現低下領域特異的に JNK 活性が大きく低下していることがわかった。これらのことから Sponge は JNK 経路を正に制御することで背部形態形成に関与すると結論している。

第 4 章考察では、第 2 章と第 3 章で得られた結果の要約とこれらの知見に基づいた今後の研究の展望について考察が加えられている。

論文審査の結果の要旨

DOCK ファミリータンパク質は、低分子量 G タンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子であり、様々な細胞外シグナルを下流に伝えるアダプタータンパク質として知られている。DOCK ファミリータンパク質は哺乳類で 11 種類同定されており、これらの遺伝子機能の欠損が、神経変性疾患、白内障や免疫不全など様々なヒト疾患に関与することが知られている。主に DOCK1 は神経突起伸張、DOCK2 は血球の分化などに関与することが報告されているが、他の DOCK ファミリーについてはまだ研究が進んでいない。申請者はアミノ酸配列の相同性からヒト DOCK3・DOCK4 に近い *sponge* (*spg*) 遺伝子をショウジョウバエゲノムデータベースから同定し、生体内での機能解析を行うために RNAi 系統を樹立し、特異的な抗体を作製した。複眼原基特異的に *spg* 遺伝子をノックダウンすると複眼の形態形成異常が誘導された。次に特定の光受容細胞特異的に lacZ を発現する enhancer-trap 系統を利用して複眼原基において抗 lacZ 抗体と抗 Spg 抗体の二重免疫染色を行ない Spg の発現パターンを調べた。その結果 Spg が光受容細胞の 1 つである R7 細胞で強く発現していることを明らかにした。一方、*spg* 遺伝子ノックダウン系統では Spg シグナルと R7 細胞での lacZ シグナルの顕著な減少が見られた。R7 細胞の分化には ERK 経路が関与していることから、抗リン酸化 ERK 抗体を用いた複眼原基の免疫染色を行ったところ、ノックダウン系統では活性型 ERK のシグナルが減少していることを明らかにした。

一方、翅原基特異的に *spg* 遺伝子をノックダウンすると成虫背部の開裂した split thorax 表現型が誘導される。成虫背部閉鎖には JNK 経路の関与が知られていることから、JNK のショウジョウバエホモログである *basket* (*bsk*) 遺伝子の機能低下型変異系統と翅原基特異的 *spg* 遺伝子ノックダウン系統を交配し、F1 世代の成虫背部を観察したところ、split thorax 表現型の増強が見られた。また、翅原基において抗リン酸化 JNK 抗体で免疫染色を行うと、*spg* 遺伝子の発現低下領域特異的に JNK 活性が低下していることを見出した。

さらに申請者は Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay 法を用いて、Spg と相互作用することが推測される Rap1 と Rac1 が実際に複眼原基と翅原基において相互作用しているかについて調べた。その結果、複眼原基においては Spg と Rap1 が相互作用しており、翅原基においては Spg と

Rac1 が相互作用していることを見出した。以上の結果から申請者は、Spg は Rap1 または Rac1 と相互作用することで ERK 経路または JNK 経路をそれぞれ活性化することで組織分化において重要な役割を担っていると結論している。これらのオリジナルな知見は、Spg の新たな生体内機能を明らかにしたものであるとして学問的な意義が大きい。また他の様々な組織の発生過程にも Spg が関与する可能性があることを示唆し、今後の更なる研究を喚起するものとしても高く評価できる。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) **Eguchi, K.**, Yoshioka, Y., Yoshida, H., Morishita, K., Miyata, S., Hiai, H. and Yamaguchi, M.: The *Drosophila* DOCK family protein Sponge is involved in differentiation of R7 photoreceptor cells. *Exp. Cell Res.*, 319 (14), 2179-2195, 2013.
- 2) Morishita, K., Ozasa, F., **Eguchi, K.**, Yoshioka, Y., Yoshida, H., Hiai, H. and Yamaguchi, M.: *Drosophila* DOCK family protein Sponge regulates the JNK pathway during thorax development. *Cell Struct. Funct.* 39, 113-124, 2014.