

氏名	ぐえん とー ふう NGUYEN THO HUU
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第755号
学位授与の日付	平成27年9月24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	Structural and functional analysis of Drosophila organic solute carrier partner 1 (ショウジョウバエ organic solute carrier partner 1 の構造と機能の解析)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 伊藤雅信 教授 片岡孝夫

論文内容の要旨

申請論文は序論、第1章「ショウジョウバエ organic solute carrier partner 1 (OSCP1) の構造解析と細胞内局在」、第2章「癌抑制タンパク質 OSCP1/NOR1 の過剰発現はショウジョウバエ発生過程でERストレスとアポトーシスを誘導する」、第3章「癌抑制遺伝子 *OSCP1/NOR1* はショウジョウバエ複眼発生過程でアポトーシス、増殖、分化と ROS 産生を制御する」そして「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。最初に OSCP1 について概説している。OSCP1 はショウジョウバエからヒトまで広く保存されているタンパク質であるが、酵母にはそのホモログは存在していない。OSCP1 は様々な有機溶質のキャリアータンパク質であると言われており、様々な組織・器官で幅広く発現している。OSCP1 の細胞内局在に関してはこれまで様々な報告がなされており、細胞質基質や小胞体等の細胞内小器官そして細胞膜への局在が報告されている。また OSCP1 は上咽頭癌を始めとする様々な癌や急性白血病で発現レベルの低下が報告され、癌化との関わりが示唆されているが、癌細胞での発現低下の仕組みの詳細についてはまだ明らかにされていない。これまでの OSCP1 の研究は癌細胞を含む哺乳動物培養細胞を用いてなされており、多細胞生物個体内での OSCP1 の機能についてはまだ良くわかっていない。ショウジョウバエには OSCP1 のホモログとして dOSCP1 が存在する。そこで申請者はショウジョウバエをモデルとして dOSCP1 の生体内機能についての研究を進めたと記載されている。

第1章では dOSCP1 の構造解析と細胞内局在について述べている。これらの解析には、dOSCP1 に特異的な抗体が研究ツールとして重要であることから、遺伝子組換え dOSCP1 を大腸菌で産生し、これを精製後モルモットに免疫して抗 dOSCP1 抗体を作製した。またこの過程で dOSCP1 が溶液中で2量体や3量体を形成することを見出した。dOSCP1 はショウジョウバエでも様々な組織・器官で発現し、細胞膜、小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官、また一部核にも局在が認められた。これらの結果から dOSCP1 は細胞内の様々な部位で複数のパートナーと共同作業して複数の機能を担っていることが示唆されている。

第2章では *dOSCP1* 過剰発現がもたらす効果について述べられている。dOSCP1 を様々な組織で

過剰発現させることのできる遺伝子導入系統を樹立した。dOSCP1 をショウジョウバエ複眼原基で過剰発現させると、主にアポトーシスとそれに依存した細胞増殖の誘導が観察される。またその際に小胞体ストレスが誘導される。一方光受容細胞の分化へは影響を与えなかった。これらの知見は哺乳動物培養細胞で OSCP1 を過剰発現させた時の効果と一致しており、*dOSCP1* 過剰発現系統が将来抗癌剤等のスクリーニングに有用なツールとなる可能性が示唆されている。

第3章では *dOSCP1* ノックダウン系統を用いて解析した dOSCP1 の生体内機能について述べられている。dOSCP1 をショウジョウバエ複眼原基でノックダウンさせると、主にアポトーシスとそれによる細胞数減少を相補する細胞増殖誘導が観察される。この時に活性酸素種の過剰産生が伴われることも観察している。アポトーシスの誘導は *Debc1* や *Buffy* 等のアポトーシス関連遺伝子の発現レベルの変化に相関し、ミトコンドリアの断片化とその機能低下による ATP レベルの低下も観察された。*dOSCP1* ノックダウンによる光受容細胞の分化阻害は見られなかったが、cone 細胞や色素細胞分化の異常が観察された。また *dOSCP1* と EGFR 経路関連遺伝子との遺伝的相互作用も観察された。このように dOSCP1 は複数の経路を介して多数の生体内機能に関与していると結論している。

「結論と展望」では、結果のとりまとめとこの研究の今後の発展性について述べられている。特に *dOSCP1* ノックダウン系統が飢餓ストレスに高い感受性を示すと言う予備的な実験結果に言及し、オートファジー現象への dOSCP1 の関与の可能性やメタボロミクス解析導入の必要性について述べられている。

論文審査の結果の要旨

OSCP1 はショウジョウバエからヒトまで広く保存されており、様々な有機溶質のキャリアータンパク質であると言われている。また OSCP1 は上咽頭癌を始めとする様々な癌や急性白血病で発現レベルの低下が報告されており、癌の診断・治療の分子標的の一つとしても注目されている。これまでの OSCP1 の研究は癌細胞を含む哺乳動物培養細胞を用いてなされており、多細胞生物個体内での OSCP1 の機能についてはまだ良くわかっていない。ショウジョウバエには OSCP1 のホモログとして dOSCP1 が存在しており、申請者はショウジョウバエをモデルとして dOSCP1 の生体内機能を明らかにする研究に取り組んだ。

申請者は抗 dOSCP1 抗体や *dOSCP1* 遺伝子導入系統を作製して、オリジナルな研究ツールとして用いた。抗 dOSCP1 抗体を用いた解析により、dOSCP1 がショウジョウバエの様々な組織・器官で発現し、細胞膜、小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官、また一部核にも局在することを明らかにした。これらの結果から申請者は dOSCP1 が細胞内の様々な部位で複数のパートナーと共同作業して複数の機能を担っていることを示唆している。また dOSCP1 をショウジョウバエ複眼原基で過剰発現させると、主にアポトーシスとそれに依存した細胞増殖の誘導が見られ、その際に小胞体ストレスが誘導されることを見出している。これらの知見は哺乳動物培養細胞で OSCP1 を過剰発現させた時の効果と一致しており、*dOSCP1* 過剰発現系統が将来抗癌剤等のスクリーニングに有用なツールとなる可能性を示唆している。さらに dOSCP1 をショウジョウバエ複眼原基でノックダウンさせると、アポトーシスとそれによる細胞数減少を相補する細胞増殖誘導が観察され、その時に活性酸素種の産生を伴うことも観察している。アポトーシスの誘導はアポトーシス関連遺伝子の発現レベルの変化に相関し、ミトコンドリアの断片化とその機能低下による ATP レベルの低下も観察された。また *dOSCP1* ノックダウンによる光受容細胞の分化阻害は見られなかったが、cone

細胞や色素細胞分化の異常が観察された。さらに *dOSCP1* と EGFR 経路関連遺伝子との遺伝的相互作用も観察された。このように *dOSCP1* は複数の経路を介して多数の生体内機能に関与していると結論している。これらのオリジナルな知見は、ショウジョウバエをモデルに用いて、*OSCP1* の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。本論文の内容は、申請者が筆頭著者である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) Huu, N. T., Yoshida, H., Umegawachi, T., Miyata, S. and Yamaguchi, M.: Structural characterization and subcellular localization of *Drosophila* organic solute carrier partner 1. BMC Biochemistry, doi: 10.1186/1471-2091-15-11, 2014.

Huu, N. T., Yoshida, H. and Yamaguchi M.: Overexpression of tumor suppressor protein *OSCP1/NOR1* induces ER stress and apoptosis during development of *Drosophila melanogaster*. American J. Cancer Res., 5(5), 1718-1729, 2015.