

氏名	とらん たん めん TRAN THANH MEN
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第809号
学位授与の日付	平成28年9月26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	<i>Drosophila</i> as a genetic model for studying lipid storage droplet-associated genes (脂肪滴関連遺伝子研究のための遺伝モデルとしてのショウジョウバエ)
審査委員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 山口政光 教授 伊藤雅信 准教授 小堀哲生

論文内容の要旨

内臓型肥満はインスリン抵抗性を惹起し、高血圧、糖尿病、高脂血症、さらには動脈硬化へと至るメタボリックシンドロームの原因となるため、内臓型肥満の抑制は社会的に重要な課題である。一方、中性脂肪を蓄積する脂肪滴(lipid storage droplet)は全身の細胞に存在する細胞内小器官であり、脂質一重層に囲まれている。その脂質一重層に多くのタンパク質が存在し、脂肪滴を構成しているだけでなく、ヒトでは肥満、動脈硬化症、糖尿病、魚鱗病など種々の疾患と関連していることが明らかにされている。しかし、脂肪滴の生理的機能には未解明な部分が多い。本論文はこのような背景から、脂肪滴タンパク質に着目し、ヒトモデルとして有用なショウジョウバエを用いて、①肥満抑制剤のスクリーニング系の構築とその有用性の実証、②翅形成におけるLipid storage droplet 1(Lsd1)の機能解明を行っている。

本申請論文は「序論」第1章「肥満抑制剤スクリーニングのためのショウジョウバエモデル」第2章「キイロショウジョウバエの翅形成におけるlipid storage droplet 1(Lsd1)の機能」「結論」から構成されている。

序論では、本論文の背景と目的を述べている。モデル生物としてのショウジョウバエの特徴、治療薬スクリーニングを行う上でのショウジョウバエの有用性を概説している。また、生体における脂質代謝を解説するとともに、本論文の目的を述べている。

第1章「肥満抑制剤スクリーニングのためのショウジョウバエモデル」では、肥満抑制剤のスクリーニング系を構築するため、脂肪滴タンパク質の一つであるBrummer (bmm)に着目した。bmmはヒトAdipose triglyceride lipase (ATGL)のホモログであり、細胞内中性脂肪分解を担っている。bmmの変異によってショウジョウバエが肥満を示すという報告に基づき、bmmのプロモーター下流に蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を接続後、ショウジョウバエに導入し、bmmの発現をGFPの緑色蛍光によってモニターできるショウジョウバエ系統を樹立した。GFP遺伝子に核移行配列を含んでいるため、巨大な染色体を持つ唾液腺細胞に着目した。グルコース含量の異なる飼料を経口投与し、ショウジョウバエ個体における脂質含量が飼料中のグルコース含量に相関することを確認した。続いて、唾液腺細胞核のGFP由来の蛍光を観察し、蛍光強度と飼料中のグ

ルコース含量が逆相関することを明らかにした。これらは高グルコース投与によって肥満が誘導され、逆に *bmm* の発現が抑制されるという結果であり、構築した *bmm* 発現モニタージュウバエが肥満抑制剤のスクリーニング系として有用であることを示した。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤および各種野菜の経口投与によって *bmm* の発現が向上することを明らかにし、これらの肥満抑制剤としての可能性を見出した。

第2章「キイロショウジョウバエの翅形成における lipid storage droplet 1(Lsd1)の機能」では、ヒトペリリピン 1 のホモログであるショウジョウバエ Lsd1 の機能に関する研究成果をまとめている。Lsd1 は脂肪滴タンパク質の一つであり、通常時 Lsd1 は CGI-58 と複合体を形成しているが、カテコールアミン刺激によってリン酸化されると CGI-58 を遊離する。遊離 CGI-58 は脂質分解酵素 *bmm* と結合して活性化し、脂質分解を亢進させる。このように、脂質代謝における Lsd1 の機能に関しては多くの知見が蓄積されている。本研究は、発生・形態形成における Lsd1 の新たな機能を解明することを目的とした。まず、ショウジョウバエの種々の組織で Lsd1 をノックダウンし、その表現型を解析した。その結果、ショウジョウバエ全身でノックダウンすると致死となり、翅原基でノックダウンすると翅がカールし、よじれるなど異常な形態を示すことを見出した。これは発生・形態形成において Lsd1 が重要な役割を担っていることを示唆している。表現型が明瞭な翅原基特異的ノックダウンシステムを用いて、Lsd1 のノックダウンによって翅原基におけるアポトーシスおよびオートファジーによる細胞死が有意に亢進していることを明らかにした。細胞死に至る原因として、Lsd1 ノックダウンシステムで有意に活性酸素種の産生増加が認められ、酸化ストレスが増大していることを明らかにした。細胞内で活性酸素種は主にミトコンドリアで産生されることから、ミトコンドリア移行シグナルと蛍光タンパク質 GFP の融合遺伝子を導入した組換えショウジョウバエを用いて、Lsd1 をノックダウンした結果、ミトコンドリアが大きくなることを見出した。また、脂肪滴特異的 Lsd1 ノックダウンシステムで有意に ATP 含量が低下していた。これらはミトコンドリアがストレス状態にあることを示唆している。また、Lsd1 のノックダウンによってショウジョウバエ個体で遊離脂肪酸濃度が高くなることを明らかにした。以上の結果から、Lsd1 の発生過程における機能は CGI-58 との複合体形成を介して *bmm* の活性を調節し、ミトコンドリアストレスを抑制することであると結論した。

「結論」の章では、第1章、第2章の総括を述べている。

論文審査の結果の要旨

中性脂肪を蓄積する脂肪滴は全身の細胞に存在する細胞内小器官であり、脂肪滴を取り囲む脂質膜に存在する脂肪滴タンパク質は種々の疾患と関連していることが明らかにされている。しかし、脂肪滴の生理的機能には未解明な部分が多い。本論文は、脂肪滴タンパク質に着目し、ヒトモデルとして有用なショウジョウバエを用いて、①肥満抑制剤のスクリーニング系の構築とその有用性の実証、②翅形成における Lipid storage droplet 1 (Lsd1)の機能解明に関する研究成果をまとめたものである。

肥満抑制剤のスクリーニング系の構築にあたっては、ヒト Adipose triglyceride lipase のホモログであるショウジョウバエ *bmm* に着目した。*bmm* のプロモーター領域と蛍光タンパク質 GFP の遺伝子を接続後、ショウジョウバエに導入し、*bmm* 発現モニタージュウバエシステムを樹立した。申請者は GFP が核移行シグナルによって核に輸送されることに着目し、巨大な染色体を持

唾腺の蛍光強度を解析することを着想した。唾腺細胞核の GFP の蛍光強度がショウジョウバエ個体の脂質含量とは逆相関することを明らかにし、樹立したショウジョウバエ系統の肥満抑制活性のスクリーニング系としての有用性を証明した。また、樹立系統を用いてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤や野菜に *bmm* の発現を増強する活性が含まれていることを明らかにし、これらの肥満抑制剤としての可能性を見出した。これらの研究成果は、緻密で論理的な解析を行って得られたものであり、ショウジョウバエのスクリーニング系としての有用性を明らかにした点において高く評価できる。

次に、申請者は *bmm* の活性を制御する脂肪滴タンパク質であり、ヒトペリリピン1のホモログである *Lsd1* に着目した。*Lsd1* をショウジョウバエの様々な組織でノックダウンすることにより、*Lsd1* が発生・形態形成に重要な機能を担っていることを見出した。さらに、生化学や分子生物学の研究手法を駆使し、*Lsd1* が *bmm* の活性を制御することにより、ミトコンドリアにおけるストレスを抑制し、その結果、アポトーシスやオートファジーによる細胞死を抑制することを明らかにした。これは、発生・形態形成における *Lsd1* の機能を明らかにした意欲的、独創的な研究であり、学術的意義が非常に高いものである。

本論文の内容は、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。なお、いずれも申請者が筆頭著者である。

1. Tran Than Men, Dung Ngoc Van Thanh, Masamitsu Yamaguchi, Takayoshi Suzuki, Gen Hattori, Masayuki Arii, Nguyen Tien Huy, and Kaeko Kamei. A *Drosophila* model for screening antiobesity agents. *BioMed Research International*, (2016) 2016, 10 pages. doi: 10.1155/2016/6293163
2. Tran Than Men, Tran Duy Binh, Masamitsu Yamaguchi, Nguyen Tien Huy, and Kaeko Kamei. Function of lipid storage droplet 1 (*Lsd1*) in wing development of *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.*, (2016) 17(5), 648; doi: 10.3390/ijms17050648