

| | |
|----------|--|
| 氏名 | ぼーちーたんてー VO THI THANH THE |
| 学位(専攻分野) | 博士(学術) |
| 学位記番号 | 博甲第810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 | The molecular biological studies on roles of <i>Drosophila</i> Mcm10, RecQ4 and heterochromatin proteins in DNA replication, genome maintenance and photoreceptor cell differentiation (DNA複製、ゲノム維持そして光受容細胞分化におけるショウジョウバエ Mcm10, RecQ4 とヘテロクロマチンタンパク質の役割についての分子生物学的研究) |
| 審査委員 | (主査)教授 山口政光 教授 伊藤雅信 教授 宮田清司 |

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 Mini chromosome maintenance 10 (Mcm10) は DNA 複製と複眼の分化に必要である」、第2章「DNA 複製、ゲノム維持と光受容細胞分化における HP1a と Mcm10 の新たな役割」、第3章「ショウジョウバエ RecQ4 は S2 細胞において DNA 複製と紫外線ダメージへの応答に直接関与する」から構成されている。

序論では、本論文の背景が述べられている。最初に真核生物 DNA 複製開始と伸長そして終結の仕組みとそれに関わるタンパク質因子群について概説している。次にモデル生物としてのショウジョウバエの有用性について解説した後、第1章と第2章で解析システムとして用いている複眼原基細胞の増殖・分化の仕組みと、特殊なヒト細胞やショウジョウバエ唾腺細胞で見られるエンドレプリケーションに関するこれまでの知見についてまとめている。最後に DNA 複製とクロマチン構造制御の関わりについて、DNA 複製因子 ORC、ヘテロクロマチンタンパク質 1 やヒストン修飾酵素の機能と合わせて解説している。

第1章では、ショウジョウバエ Mcm10 (dMcm10)の複眼原基細胞における DNA 複製と光受容細胞分化における役割について焦点をあてている。Mcm10 は真核生物の DNA 複製の開始に必須なタンパク質であり、酵母、ショウジョウバエからヒトに至るまでそのアミノ酸配列が高度に保存されている。RNA 干渉により、ショウジョウバエ Mcm10 の複眼原基特異的にノックダウンすると、複眼原基細胞の S 期進行の遅延をもたらす、また同時にゲノムダメージとアポトーシスを誘導する。その結果成虫複眼の形態異常(ラフアイ表現型)をもたらす。これらの結果は、dMcm10 が S 期進行に重要な役割を果たしていることを意味し、従来から言われていた Mcm10 の細胞内機能を支持する。驚くべきことにこのノックダウン実験により、複製因子であるはずの dMcm10 が R7 光受容細胞の分化にも関与することを発見した。また dMcm10 のこの機能は、アポトーシスの誘導とは独立したものであることが明らかとなった。

第2章では、第1章で述べた研究をさらに押し進めて、dMcm10 だけでなくショウジョウバエ

の Heterochromatin protein 1a (HP1a) の複眼原基細胞における DNA 複製と光受容細胞分化における役割について述べている。HP1a はヘテロクロマチン領域でのクロマチン構造維持だけでなく、ユークロマチン領域に存在する遺伝子の発現制御にも関与するなど、核内で多様な役割を担っている。Mcm10 と HP1a の両タンパク質は DNA 複製に必要であることが報告されている。しかしながら、特に HP1a については、その基盤となる仕組みについてまだ明らかにされていない。HP1a と dMcm10 の両方を複眼原基でノックダウンすると、S 期の進行が妨げられた。Proximity Ligation Assay (PLA) により、HP1a が S 期に dMcm10、RFC140 や DNA ポリメラーゼ ϵ 255 kDa サブユニット等の複製タンパク質と細胞内で近接して存在していることを明らかにした。また興味深いことに dMcm10 と HP1a の PLA シグナルは、普通の体細胞分裂サイクルの細胞では観察されるが、唾腺で見られるエンドサイクルを行っている細胞では検出されない。dMcm10 と HP1a をダブルノックダウンした複眼原基の後極側で、アポトーシスを伴わない異所的な DNA 合成と DNA ダメージが誘導されることを観察した。これらの観察は、dMcm10 と HP1a のダブルノックダウンにより G1 期-S 期進行チェックポイントの障害が起こっている可能性を示唆する。これらの知見と腫瘍形成との関連についても言及している。また一連の実験により、dMcm10 と HP1a の両タンパク質が R1、R6 そして R7 光受容細胞の分化にも必要であることを明らかにした。

第 3 章では、RecQ ファミリーヘリカーゼの一つに分類されるタンパク質であるショウジョウバエ RecQ4 タンパク質の機能解析に焦点をあてている。ヒト RecQ4 遺伝子の突然変異は Rothmund-Thomson 症候群、Baller-Gerold 症候群や RAPADILINO 症候群と呼ばれる 3 つの劣性遺伝病と関連していることが報告されているが、RecQ4 の機能についてはまだ良くわかっていなかった。ショウジョウバエの培養細胞である S2 細胞を用いて、RecQ4 が DNA 複製に関与し、特にこのタンパク質の SLD2 と呼ばれるドメインがこの機能に必須であることを明らかにした。また RecQ4 が ORC2、PCNA や DNA ポリメラーゼ α などの複製タンパク質をクロマチン上にリクルートする役割を担っていることを明らかにした。さらに紫外線照射によるゲノムダメージに応答して誘導されるヌクレオチド除去修復経路にも、この RecQ4 が直接関わることについても言及している。

論文審査の結果の要旨

Mini chromosome maintenance 10 (Mcm10) は生物の生存に必須なタンパク質であり、DNA 複製の開始に必要であることが知られていた。申請者はショウジョウバエ Mcm10 (dMcm10) を複眼原基特異的にノックダウンすると細胞周期 S 期と M 期の遅延をもたらし、またゲノムダメージとアポトーシスを誘導することを見出した。また驚くべきことにこのノックダウン実験により、複製因子である dMcm10 が R7 光受容細胞の分化にも関与することを発見した。Heterochromatin protein 1a (HP1a) は、ヘテロクロマチン領域での構造維持だけでなく、ユークロマチン領域に存在する遺伝子の制御にも関与し、核内で多様な役割を担っている。Mcm10 と HP1a の両タンパク質はそれぞれ DNA 複製に必要であることが報告されていた。しかしながら、特に HP1a については、その基盤となる仕組みについてはまだ明らかにされていない。申請者は HP1a と dMcm10 の両者を複眼原基でノックダウンすると S 期の進行が遅れることを見出した。Proximity Ligation Assay (PLA) により、HP1a が S 期に dMcm10、RFC140 や DNA ポリメラーゼ ϵ 255 kDa サブユ

ニット等の複製タンパク質と細胞内で近接して存在していることを明らかにした。dMcm10 と HP1a の PLA シグナルは、普通の体細胞分裂サイクルの細胞では観察されるが、endocycle を行っている唾腺細胞では検出されない。dMcm10 と HP1a をダブルノックダウンした複眼原基の後極側では、アポトーシスを伴わない異所的な DNA 合成と DNA ダメージが誘導されることを観察した。これらの観察は、dMcm10 と HP1a のダブルノックダウンにより G1 期-S 期進行チェックポイントの障害が起こっていることを示唆する。また一連の実験により、申請者は dMcm10 と HP1a の両タンパク質が R1、R6 そして R7 光受容細胞の分化にも必要であることを明らかにした。一方 RecQ4 は RecQ ファミリーヘリカーゼの一つに分類されるタンパク質である。この遺伝子の突然変異は Rothmund-Thomson 症候群等のヒト劣性遺伝病と関連していることが報告されているが、RecQ4 の機能についてはまだ良くわかっていなかった。申請者はショウジョウバエの培養細胞である S2 細胞を用いて、RecQ4 が DNA 複製に関与し、特にこのタンパク質の SLD2 と呼ばれるドメインがこの機能に必須であることを示した。また RecQ4 が ORC2、PCNA や DNA ポリメラーゼ α などの複製タンパク質をクロマチン上にリクルートする役割を持っていることを明らかにした。さらに紫外線照射によるゲノムダメージに応答して誘導されるヌクレオチド除去修復経路に、この RecQ4 が関わることも明らかにした。

これらの一連の研究は、DNA 複製、ゲノム維持、細胞分化等分子生物学分野での新しい知見を示すものであり、その学問的意義は高く評価できる。また癌化の仕組みに関する基礎的知見を提供するものとしても評価でき、今後の当該分野の進展にも大きく貢献するものであると判断できる。

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発表済みの下記の 2 編の論文を基礎としている。

- 1) Vo, N., Taga, A., Inaba, Y., Hideki, Y., Cotterill, S. and Yamaguchi, M.: *Drosophila* Mcm10 is required for DNA replication and differentiation in the compound eye. PLoS ONE, 9 (3): e93450, 2014.
 - 2) Crevel, G., Vo, N., Crevel, I., Hamid, S., Hoa, L., Miyata, S. and Cotterill S.: *Drosophila* RecQ4 is directly involved in both DNA replication and the response to UV damage in S2 cells. PLoS ONE 7 (11): e49505, 2012.
- また、参考論文として以下のものが公表もしくはリバイス中である。
- 3) 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), 1-13, 2014.
 - 4) Nakazawa, M., Matsubara, H., Matsushita, Y., Watanabe, M., Vo, N., Yoshida, H., Yamaguchi, M. and Kataoka, T.: The human Bcl-2 family member Bcl-rambo localizes to mitochondria and induces apoptosis and morphological aberrations in *Drosophila*. PLoS ONE, 11 (6): e0157823, 2016.
 - 5) Vo, N., Dang, S., Cotterill S., Yoshino, N., Yoshida, H. and Yamaguchi, M.: Novel roles of HP1a and Mcm10 in DNA replication, genome maintenance and photoreceptor cell differentiation. Nucleic Acids Res. under revision.

Goto, M., Toda, N., Shimaji, K., Dang, S., Vo, N., Kimura, H., Yoshida, H., Inoue, Y. H. and Yamaguchi, M.: Polycomb-dependent nucleolus localization of Jumonji/Jarid2 during *Drosophila* spermatogenesis. Spermatogenesis, under revision