

氏名	うめがわち たかなり 梅河内 隆成
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第822号
学位授与の日付	平成29年3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	Functional analysis of subcellular localization of oncogene products in <i>Drosophila</i> (ショウジョウバエにおけるがん遺伝子産物の細胞内局在の機能解析)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 遠藤泰久 教授 宮田清司

論文内容の要旨

ショウジョウバエにおけるがん遺伝子産物の細胞内局在とその生物学的意義について論じている申請論文は、英文で記述されている。序論として第1章、本論として第2章「がん遺伝子 *yorkie* の mRNA 3'非翻訳領域による組織サイズと発生の制御」と第3章「がん遺伝子 *Rpd3* は飢餓ストレス耐性に必要である」そして第4章謝辞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。mRNA は細胞質に均一に存在しているのではなく、様々な部位に局在化していることが明らかになりつつある。一般的に小胞体へ局在化する mRNA はシグナル配列を持つが、明確なシグナル配列を持たないにもかかわらず小胞体へ局在化する mRNA も存在することが知られている。それらの mRNA が小胞体へ局在化する仕組みやその生物学的意義についてはまだ明らかになっていないことが解説されている。次に本論文で焦点を当てたがん遺伝子である *yorkie* (*yki*) について解説している。*yki* 遺伝子はショウジョウバエからヒトまで広く保存されていること、また多くのがん細胞で *yki* のヒトホモログである Yes-associated protein (YAP) タンパク質が高発現しがん化を亢進させているが、高発現するメカニズムはまだ分かっていないことが述べられている。さらにショウジョウバエのヒストン脱アセチル化酵素 *Rpd3* が細胞周期の制御や、DNA ダメージ応答に役割を果たしていること、またそのヒトホモログ HDAC1 がヒトがん細胞で高発現しており、その阻害剤が抗がん剤として開発されつつあることが紹介されている。

第2章では、小胞体へ局在化する mRNA の解析を行う中で、*yki* の mRNA が小胞体近傍へ局在し foci を形成することを見出したことが述べられている。詳細な解析により *yki* mRNA の foci は小胞体に隣接する Processing bodies (P-bodies) と共局在することが明らかになり、この局在には 3'非翻訳領域の Stem-loop 2 (SL2) のステムの形成及びループ内のピリミジン塩基が必要であることも明らかにしている。この SL2 には microRNA である miR-8 の結合配列が存在し、*yki* mRNA は miR-8 依存的に分解されること、またこの miR-8 を介した分解は P-bodies への局在化を必要としないことも明らかにしている。次に SL2 のステム部分の破壊及び miR-8 の結合配列を塩基置換した変異 *yki* mRNA を発現する遺伝子導入ショウジョウバエを樹立した。これらの系統を用いた解析

で、P-bodies へ局在できない *yki* mRNA を発現させると野生型に比べ Yki タンパク質量が 3 倍に増加することが明らかになり、mRNA 局在化がその翻訳抑制に関わることが示唆された。一方、miR-8 の結合配列に変異を導入すると、mRNA 量が 10 倍増加した。更に、P-bodies への局在に必要な部位及び miR-8 の結合配列を同時に破壊した *yki* mRNA を発現させると、野生型に比べ mRNA とタンパク質量が共に 10 倍に増加し、成虫複眼の著しい形態異常が観察されることを示している。このように *yki* mRNA の分解と翻訳抑制を介したタンパク質量の制御が、ヒトがん細胞での YAP タンパク質の高発現のメカニズムを説明しうると述べられている。

第 3 章では、飢餓条件下におけるがん遺伝子 *Rpd3* がコードするタンパク質が核小体へ局在化することについて述べられている。近年がん細胞などの飢餓ストレス耐性の獲得にエピジェネティック制御遺伝子が関与することが示唆されている。種々のエピジェネティック制御遺伝子のノックダウンシロウジョウバエ系統で飢餓アッセイを行ったところ、*Rpd3* をノックダウンした系統で著しく早死にすることを見出した。*Rpd3* は飢餓条件に応答して発現量が増加し、核小体内に移行することを明らかにしている。*Rpd3* をノックダウンすると飢餓条件下で rRNA の転写量が減少し、クロマチン免疫沈降法により、*Rpd3* が rRNA プロモーターを含むゲノム領域に結合していることを明らかにしている。次にポリソーム解析により *Rpd3* をノックダウンするとタンパク質翻訳量が減少していることが分かり、*Rpd3* をノックダウンすることによって飢餓耐性獲得に働くタンパク質の合成不足がおこっている可能性が示唆された。野生型を飢餓条件下におくと、オートファジー活性化に働く *Atg9* の mRNA 量が増加するが、*Rpd3* ノックダウン系統ではその増加は認められなかった。これらの結果から、*Rpd3* は飢餓に応答して発現量が増加し、核小体内に移行後 rRNA の転写量を増加させることにより、オートファジー関連因子等ストレス耐性に関わるタンパク質群の合成誘導を介して飢餓耐性獲得に働くことが結論された。飢餓条件下におけるがん細胞の増殖に *Rpd3* が必要であることが分かっており、今回の発見によりがん細胞が *Rpd3* を介した飢餓ストレス耐性を獲得するメカニズムの解明につながる可能性があるとして述べられている。

論文審査の結果の要旨

申請者はがん遺伝子 *yki* の mRNA が foci を形成して小胞体に隣接する Processing bodies (P-bodies) と共局在することを明らかにした。またこの局在には *yki* mRNA の 3' 非翻訳領域の stem-loop 2 (SL2) のステムの形成及びループ内のピリミジン塩基が必要であることも明らかにした。この SL2 には miR-8 の結合配列が存在し、*yki* mRNA は miR-8 依存的に分解され、この miR-8 を介した分解は P-bodies への局在化を必要としないことも明らかにした。また興味深いことに P-bodies への局在及び miR-8 の結合配列を同時に破壊した *yki* mRNA をシロウジョウバエ複眼で特異的に発現させると複眼の増殖異常を伴う著しい形態異常が引き起こされることを見出した。本研究で申請者が明らかにした *yki* mRNA の分解と翻訳抑制を介したタンパク質量の制御機構は、ヒトがん細胞で見られる *yki* のヒトホモログである YAP タンパク質の高発現メカニズムの解明にもつながり、大きな学問的意義と社会的意義を持つと判断できる。

一方、申請者は種々のエピジェネティック制御遺伝子のノックダウンシロウジョウバエ系統で飢餓アッセイを行い、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *Rpd3* をノックダウンした系統で著しく早死にすることを見出した。*Rpd3* は飢餓条件に応答して発現量が増加し、核小体内に移行することも明らかにしている。*Rpd3* をノックダウンすると飢餓条件下で rRNA の転写量が減少し、クロマ

チン免疫沈降法により、*Rpd3* が rRNA プロモーターを含むゲノム領域に結合していることを明らかにしている。さらにポリソーム解析によるタンパク質翻訳量の測定と、オートファジー活性化に働く *Atg9* の mRNA 量の定量を行なった結果から、*Rpd3* は飢餓に応答して発現量が増加し、核小体内に移行後 rRNA の転写量を増加させることにより、オートファジー関連因子等ストレス耐性に関わるタンパク質群の合成誘導を介して飢餓耐性獲得に働くと結論した。これらの知見はがん細胞が *Rpd3* を介した飢餓ストレス耐性を獲得するメカニズムの解明にもつながり、学術的意義はもとより社会的意義も大きい。

これらの研究の成果は、申請者が筆頭著者である 1 編を含む、査読性のある下記の国際科学雑誌 2 編に掲載または印刷中である。

- 1) Takanari Umegawachi, Hideki Yoshida, Hiromu Koshida, Momoko Yamada, Yasuyuki Ohkawa, Tetsuya Sato, Mikita Suyama, Henry M Krause, Masamitsu Yamaguchi: Control of tissue size and development by a regulatory element in the *yorkie* 3'UTR. Am. J. Cancer Res. in press.
- 2) Ei Nakajima, Kouhei Shimaji, Takanari Umegawachi, Saki Tomida, Hideki Yoshida, Nana Yoshimoto, Shingo Izawa, Hiroshi Kimura, Masamitsu Yamaguchi: The Histone Deacetylase Gene *Rpd3* Is Required for Starvation Stress Resistance. PLoS One, 11 (12), e0167554, 2016.

また参考論文として査読性のある下記の国際科学雑誌 1 編に掲載されている。

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, 15, 11., 2014.